

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 682 597**

②1 N° d'enregistrement national :

**91 12778**

⑤1 Int Cl<sup>s</sup> : A 61 K 31/12

①2

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②2 Date de dépôt : 16.10.91.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 23.04.93 Bulletin 93/16.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *LABORATOIRES DEBAT Société  
anonyme — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *Berreur-Bonnenfant Josette.*

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : *Cabinet Beau de Loménie.*

⑤4 **Triméthyl-6,10,14-pentadécatriène-5-9,13-one-2-(E,E) pour son application en tant que substance thérapeutiquement active.**

⑤7 La présente invention concerne la triméthyl-6,10,14-pentadécatriène-5,9,13-one-2-(E,E) pour son application en tant que substance thérapeutiquement active. Il a été démontré que ce composé présente une activité tumorale spécifique susceptible d'être appliquée en thérapeutique.

**FR 2 682 597 - A1**



Triméthyl-6,10,14-pentadécatriène-5,9,13-one-2-(E,E) pour son application en tant que substance thérapeutiquement active.

05 La présente invention a pour objet la triméthyl-6,10,14-pentadécatriène-5,9,13-one-2-(E,E) pour son application en tant que substance thérapeutiquement active, notamment antitumorale.

10 La triméthyl-6,10,14-pentadécatriène-5,9,13-one-2-(E,E), connue sous le nom farnésylacétone, est une hormone synthétisée dans la glande androgène de crabes mâles (Carcinus maenas), qui participe au contrôle de la différenciation sexuelle des crustacés.

Ce produit est essentiellement connu comme intermédiaire de synthèse de la vitamine E (voir Kabbe H.J et Heitzen H, Synthesis, 1978, n° 12, pages 888-889).

15 Il a été découvert, et ceci constitue le fondement de la présente invention, que la farnésylacétone (E,E) présente des propriétés pharmacologiques particulièrement intéressantes, et en particulier une activité antitumorale spécifique. Ce composé trouvera donc notamment application dans le traitement de certains cancers et de la leucémie.

20 Ainsi, la présente invention s'étend aux compositions pharmaceutiques, notamment à activité antitumorale, contenant à titre d'ingrédient actif la triméthyl-6,10,14-pentadécatriène-5,9,13-one-2-(E,E) en association avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

25 Ces compositions pharmaceutiques seront généralement préparées selon des procédés classiques et administrées par voie orale ou parentérale, dans un excipient lipidique, par exemple l'huile de soja, ou pour la voie orale, sous forme de comprimés contenant de préférence des quantités comprises entre 50 et 200 mg.

30 On peut aussi utiliser des capsules molles de gélatine comprenant une solution dans l'huile de la farnésylacétone.

La posologie sera ajustée pour assurer la réponse thérapeutique optimale. D'une façon générale, la farnésylacétone (E,E) peut être administrée à des doses comprises entre 50 et 400 mg.

L'invention couvre également un procédé de préparation d'une composition pharmaceutique, notamment à activité antitumorale, caractérisé en ce qu'il consiste à incorporer une quantité pharmaceutiquement efficace de triméthyl-6,10,14-pentadécatriène-5,9-13-one-2-(E,E) dans un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Selon une caractéristique particulière de ce procédé, la composition pharmaceutique est formulée sous formes de solutions huileuses, par exemple sous forme de capsules molles de gélatine dosées de 50 à 200 mg.

Enfin, la présente invention vise encore à couvrir un procédé de traitement thérapeutique des mammifères, caractérisé en ce qu'il comprend l'administration à ce mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de triméthyl-6,10,14-pentadécatriène-5,9,13-one-2-(E,E).

La farnésylacétone peut être obtenue par diverses méthodes de synthèses connues comme par exemple celle décrite dans le document FR 71 23063.

Les propriétés pharmacologiques de la farnésylacétone (E,E) ont été mises en évidence en évaluant par différentes études ses effets sur des cellules tumorales.

Dans ces études, on a utilisé une lignée de fibroblastes FR3T3 isolée à partir d'embryons de rats de Fischer (voir Seif R. et Cuzin F., 1977, Journal of virology, 24, 721-728) et des cellules transformées FR3T3-mTT4 obtenues en introduisant dans cette lignée l'ADN du virus du polyome (800 paires de nucléotides environ) nécessaire à la synthèse de la protéine mT (middle tumor) qui introduit la transformation tumorale. (voir Cuzin F., 1984, Biochimica et Biophysica acta, 781, 1993-204).

Ces lignées cellulaires sont conservées dans l'azote liquide.

#### Etude 1 :

Mesure des effets de la farnésylacétone (E,E) sur la multiplication des cellules FR3T3 et leurs dérivés transformés FR3T3-mTT4.

Des cellules FR3T3 et FR3T3-mTT4 sont cultivées dans un milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) renfermant 10 % de sérum de veau nouveau-né (GIBCO), de la Gentaline (40 µg/ml) et tamponné par de l'HEPES (20 mM).

05 La farnésylacétone est introduite en solution dans l'éthanol, la concentration finale en éthanol dans les milieux de culture n'excédant pas 0,3 %. Des cellules témoins de culture non traitées à la farnésylacétone reçoivent la même dose d'éthanol.

10 Les cellules (environ 30 000) sont mises en culture dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> ou dans des boîtes de Petri de 60 mm de diamètre, à 39°C.

Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours pendant les quatre premières journées, puis tous les jours lorsque la densité de culture dépasse 10 millions de cellules par flacon.

15 En fin de culture, les cellules sont décollées de leur support par incubation dans un milieu renfermant 0,05 % de trypsine.

Les cellules sont dénombrées dans une cellule de Malassez.

20 Les résultats obtenus ont permis de tracer les courbes de croissance de cellules de rat saines (FR3T3) et transformées (FR3T3-mTT4), ces courbes étant représentées à la figure 1.

Il est à noter que sur ces courbes chaque point représente le résultat de la moyenne des mesures effectuées sur trois lots de boîtes ou flacons identiques évoluant simultanément.

25 La figure 1 montre clairement que la farnésylacétone exerce un effet inhibiteur sur la multiplication des cellules transformées, cet effet s'accroissant avec le temps, puisque le titre en cellule mesuré en fin d'expérience est de 40 à 50 % de la valeur concernant les témoins. Dans tous les cas, la farnésylacé-  
30 tone reste sans effet sur les cellules non transformées.

Des essais complémentaires ont montré que pendant la phase exponentielle de croissance, les cellules non transformées sont insensibles à la farnésylacétone utilisée à des concentrations inférieures à 500 ng/ml.

D'autres mesures ont en outre montré que l'effet inhibiteur de la farnésylacétone sur la multiplication des cellules transformées, mesuré au bout de 8 j est maximum par des concentrations comprises entre 80 et 100 ng/ml et que dans toutes ces conditions la farnésylacétone reste sans effet sur le nombre et la morphologie des cellules saines FR3T3.

#### Etude 2 :

Mesure de l'aptitude de la farnésylacétone à engendrer des foyers de multiplication en agar mou ou à faible densité d'ensemencement.

#### Foyers de multiplication en agar mou

L'aptitude à engendrer des colonies en agar mou a été étudiée selon la méthode de Mac Pherson (Mac Pherson I. et Montagnier L., 1964, virology, 23, 291) ; La lecture des résultats intervenant 21 j après la mise en culture.

On sait que l'aptitude à engendrer des foyers de multiplication indépendamment de la présence d'un support solide est une propriété caractéristique des cellules transformées.

On a donc comparé l'aptitude des cellules transformées FR3T3-mTT4 à engendrer des foyers de multiplication lorsqu'elles sont mises en culture dans des milieux renfermant 0,3 % d'agar et 100 ng/ml de farnésylacétone ou dépourvus de farnésylacétone.

Quand la suspension cellulaire d'ensemencement contient 25 000 cellules, on a observé (moyenne de trois expériences) que le nombre de foyers obtenus est 5 800 chez les témoins et 3 600 dans les cultures effectuées en présence de farnésylacétone. La diminution du nombre de foyers de multiplication due à la farnésylacétone atteint 55 %.

#### Multiplication à faible densité d'ensemencement

On sait également qu'une propriété caractéristique des cellules transformées est leur aptitude à engendrer des colonies à faible densité d'ensemencement.

Dans le cas de la lignée FR3T3, il est nécessaire d'introduire 100 cellules par flacon pour obtenir une trentaine de foyers de multiplication.

05 Dans les mêmes conditions, le nombre de colonies obtenues à partir d'un inoculum de 50 cellules transformées FR3T3-mTT4 est de 40 sans farnésylacétone et de 23 lorsque la farnésylacétone est introduite à une concentration de 40 ng/ml 2 h après la mise en culture.

10 A partir d'un inoculum de 100 cellules, 85 colonies se développent en l'absence de farnésylacétone et 44 en présence de farnésylacétone.

15 Avec un ensemencement de 250 cellules, le nombre de colonies au bout de 8 j de culture est en moyenne de 93 pour les cellules saines et de 195 pour les cellules transformées. Avec une concentration constante de farnésylacétone (40 ng/ml), le nombre de foyers n'est pas affecté par la farnésylacétone pour les cellules saines alors qu'il est en moyenne de 40 % inférieur à celui des témoins pour les cellules transformées.

20 On a également étudié l'action de la farnésylacétone à très faible concentration ( $8 \cdot 10^{-9}$  M ; 2 ng/ml) sur la multiplication des cellules à faible densité d'ensemencement.

25 On a ainsi observé que, pour un ensemencement de 250 cellules et en faisant varier la concentration de la farnésylacétone en fonction du nombre de cellules contenues dans le flacon de culture, on obtient une inhibition de 90 % de la croissance des cellules transformées cultivées en présence de farnésylacétone, tandis que les cellules non transformées restent insensibles à l'action de la farnésylacétone.

30 Etude 3 :

Mesure des effets de la farnésylacétone sur les synthèses des protéines hydrosolubles cytoplasmiques analysées par électrophorèse en gel bidimensionnel.

35 La méthode utilisée est celle décrite par O'Farrel P. H, 1975, J. biol. chem., 250, 4007-4021.

Les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM dépourvu de méthionine. La méthionine 35S (Amersham) est ajoutée, et après 4 h les cellules sont décollées, lavées dans un tampon PBS et homogénéisées dans le tampon de lyse d'0'Farrel saturé en urée.

05 L'homogénat est centrifugé pendant 10 min à 10 000 g. Une fraction du surnageant contenant environ 20 µg de protéine est déposée à la surface du gel d'électrofocalisation (ampholynes porteuses LKB, gradient de pH 3,5-10).

10 La deuxième séparation est réalisée sur gel d'acrylamide en gradient exponentiel de concentration (7,5 %-14,5 %).

L'appareil à électrophorèse est construit pour permettre la séparation simultanée des protéines d'un échantillon expérimental et de son témoin sur un gel de 16 X 16 cm de 0,9 mm d'épaisseur. Les gels séchés impressionnent un film photographique  
15 Kodak ou Valca.

Les résultats obtenus ont permis de confirmer l'action spécifique de la farnésylacétone sur la synthèse de certaines protéines de fibroblastes de rat.

20 Ainsi, les études 1 à 3 rappelées précédemment ont permis de démontrer qu'à une concentration de  $10^{-7}$  M la farnésylacétone modifie l'expression de trois propriétés essentielles des cellules tumorales et qu'à la même concentration la farnésylacétone est sans effet sur les cellules homologues non transformées.

25

#### Etude 4 :

Etude comparée de l'action de la farnésylacétone à d'autres composés antitumoraux.

30 L'activité antitumorale de la farnésylacétone a été comparée à celle de composés cités dans la littérature comme antitumoraux et présentant une analogie structurale avec la farnésylacétone.

Pour cette comparaison, on a retenu l'acide rétinoïque, le  $\beta$ -carotène, l'acide linoléique et la vitamine E.

35

On a complété cette étude en étudiant également l'activité de la fluorouracile, substance utilisée dans la chimiothérapie du cancer chez l'homme.

05 On a comparé les effets de ces composés antitumoraux connus à ceux obtenus avec la farnésylacétone sur les cellules transformées FR3T3-mTT4 (ci-après désignées "mTT4") et leurs précurseurs normaux, c'est-à-dire les cellules FR3T3 définies précédemment.

10 Les essais ont été réalisés en milieu liquide, et la croissance des cellules (ensemencées à  $3 \times 10^4$  cellules/25 cm<sup>2</sup>) a été mesurée en présence de différentes concentrations de composés. Les valeurs d'inhibition données en pourcentage sont calculées par rapport au nombre de cellules déterminées en phase de croissance exponentielle, au bout de 4 j de traitement.

15 On a reporté aux tableaux I à V ci-après les résultats obtenus, tandis que le tableau VI présente les résultats permettant une comparaison directe de l'action de la farnésylacétone à celle de ses analogues structuraux.

20 Ces résultats montrent que, mis à part la vitamine E et la farnésylacétone, toutes les substances testées peuvent inhiber non seulement la multiplication des cellules transformées, mais aussi celle des cellules saines. Les cellules saines sont généralement plus sensibles que leurs dérivés transformés lorsque la concentration des substances employées est élevée ( $> 3 \times 10^{-6}$  M).

25 En revanche, la farnésylacétone, comme la vitamine E, à des concentrations inférieures à  $3,8 \times 10^{-6}$  M et  $3,7 \times 10^{-5}$  M respectivement, ne sont actives que sur les cultures des cellules transformées. Dans ces zones de concentration les cellules saines ne présentent aucune réponse décelable à l'introduction de ces deux composés dans le milieu de culture.

30 Par conséquent, aux doses indiquées, l'activité de la farnésylacétone ou de la vitamine E est donc spécifique et ne s'exerce que sur des cellules tumorales.

35 On observera cependant qu'à des concentrations de l'ordre de  $10^{-7}$  M, la farnésylacétone est beaucoup plus active (environ 100 fois plus) que la vitamine E. En effet, à  $3,8 \times 10^{-7}$  M par exemple,

Le pouvoir inhibiteur de la farnésylacétone sur la multiplication des cellules transformées mTT4 au bout de 4 j de culture est de l'ordre de 30 %. Avec la vitamine E, cette valeur n'est atteinte qu'à une concentration de  $3,7 \times 10^{-5}$  M.

05 On observera également à la lumière du tableau V que la fluorouracyle est relativement très active à des concentrations faibles, mais son action n'est pas spécifique vis-à-vis des cellules saines.

10 L'ensemble de ces résultats démontre donc que, comparée à l'action d'une large variété de substances reconnues pour leur activité anti-cancéreuse, l'inhibition de la multiplication cellulaire par la farnésylacétone est une activité caractérisée par une spécificité dépendante de la nature des cellules.

15 Bien que ce résultat ne s'exerce que lorsque la concentration de la farnésylacétone appartient à une gamme définie (entre environ  $0,38 \times 10^{-8}$  M et  $0,38 \times 10^{-5}$  M) l'activité de la farnésylacétone, en plus de son caractère spécifique, reste toutefois la plus importante lorsqu'elle est considérée comparativement aux autres substances employées. A des concentrations supérieures à  
20  $0,38 \times 10^{-5}$  M, la farnésylacétone reste environ deux fois plus active sur les cellules transformées qu'elle ne l'est sur les cellules saines.

Tableau I

Action de différentes concentrations de l'acide rétinolique sur la croissance des FR3T3 ou des mTT4.

[Acide rétinolique] ( $\times 10^{-6}$ M)	0,1			0,3			1			20			40		
Durée de traitement (jours)	2	4	5	2	4	5	2	4	5	2	4	5	2	4	5
FR3T3	22	25		36			40	46		68			36	66	78
Inhibition (%) -----	-----			-----			-----			-----			-----		
mTT4	36	26		54			20	46	56	70			46	53	75

Tableau II

Action du  $\beta$ -carotène sur la croissance des FR3T3 ou des mTT4.

05

	[ $\beta$ -carotène] ( $\times 10^6$ M)	3	6
10	Inhibition (%)	FR3T3 ----- mTT4	24 68 28 45

15

20

Tableau III

Action de l'acide linoléique sur la croissance des FR3T3 ou des mTT4.

25

	[Acide linoléique] ( $\times 10^{-4}$ M)	0,75	1,5
30	Inhibition (%)	FR3T3 ----- mTT4	0 52 0 24

30

Tableau IV

Action de la vitamine E sur la croissance des FR3T3 ou des mTT4.

05

[Vit-E] ( $\times 10^{-5}$ M)		0,37	1,88	3,76	7,53	11,29
Inhibition (%)	FR3T3	0	0	0	11	73
	mTT4	19	23	29	47	82
			18		47	

15

Tableau V

20

Action de la fluoro-5-uracile (FU) sur la croissance des FR3T3 ou des mTT4.

25

[FU] ( $\times 10^{-7}$ M)		1		2	
Durée de traitement (jours)					
		3	5	3	5
Inhibition (%)	FR3T3	37	10	40	35
	mTT4	21	34	63	65

30

Tableau VI

Comparaison de l'action de la FA à celles de certains de ces analogues structuraux sur la croissance des FR3T3 ou des mTT4.

Substance	$\beta$ -carotène	Ac. Rétinoïque	Vitamine E	FA	Ac. Linoléique
$[C] \times 10^{-6} M$	3	0,1	4	0,38	75
FR3T3	22	22	0	0	0
mTT4	28	36	19	30	0
Inhibition (%)	68	40	0	0	54
	45	46	29	0	92
		53	47	30	0
					24

Etude 5 :

Effet de la farnésylacétone sur les cellules K562.

05 Les cellules K562 proviennent d'une leucémie humaine et poussent en suspension. Elles sont cultivées en flacon de 25 cm<sup>2</sup> contenant 7 ml de culture.

10 La farnésylacétone est diluée dans l'éthanol pour être distribuée dans les cultures. L'éthanol est sans effet aux concentrations utilisées sur la croissance de K562, jusqu'à 0,5 %. Les résultats obtenus montrent que la dose d'inhibition de la croissance des cellules K562 par la farnésylacétone est d'environ 20 µg/ml. Cette dose détruit une faible proportion des cellules en 24 h. La dose de 30 µg/ml détruit une proportion plus forte, sur les cellules à densité élevée notamment.

REVENDICATIONS

05 1. Triméthyl-6,10,14-pentadécatriène-5,9,13-one-2-(E,E)  
pour son application en tant que substance thérapeutiquement  
active.

2. Triméthyl-6,10,14-pentadécatriène-5,9,13-one-2-(E,E)  
pour son application en tant que principe actif antitumoral.

10 3. Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce  
qu'elles contiennent à titre d'ingrédient actif la triméthyl-6,10,  
14-pentadécatriène-5,9,13-one-2-(E,E) en association avec un exci-  
pient pharmaceutiquement acceptable.

15 4. Compositions pharmaceutiques à activité antitumorale,  
caractérisées en ce qu'elles contiennent à titre d'ingrédient actif  
la triméthyl-6,10,14-pentadécatriène-5,9,13-one-2-(E,E) en associa-  
tion avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

20 5. Procédé de préparation d'une composition pharmaceu-  
tique, notamment à activité antitumorale, caractérisé en ce qu'il  
consiste à incorporer une quantité pharmaceutiquement efficace de  
triméthyl-6,10,14-pentadécatriène-5,9,13-one-2-(E,E) dans un exci-  
pient pharmaceutiquement acceptable.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce  
que la composition pharmaceutique est formulée sous formes de  
solutions huileuses, par exemple sous forme de capsules molles de  
gélatine, dosées de 50 à 200 mg.

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

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

FR 9112778  
FA 463763

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	LEUKEMIA RESEARCH, vol. 8, no. 5, 1984, pages 843-852, Pergamon Press, Oxford, GB; H. ISHIKURA et al.: "Differentiation of mouse leukemic M1 cells induced by polyprenoids" ----	1,3-5
A	C.R. ACAD SC., vol. 285, no. 7, 3 octobre 1977, Paris, FR; A. TEKITEK et al.: "Biochimie. - Inhibition de méthylations biologiques par la t.t-farnésylacétone, constituant de la viande androgène du Crabe mâle Carcinus menas" ----	
A	NATURWISSENSCHAFTEN, vol. 67, no. 12, décembre 1980, pages 607-608, Springer, Verlag, Berlin, DE; M. ROJAS et al.: "Inhibition of transmethylases by unsaturated carbonyl derivatives" -----	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		A 61 K
Date d'achèvement de la recherche 17-03-1992		Examineur KLAVER T.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)