

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①① N° de publication : **3 038 606**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **15 56400**

⑤① Int Cl⁸ : **C 07 F 9/09 (2017.01)**

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ GLYCEROPHOSPHOCHOLINES, POUR LEUR UTILISATION DANS LE TRAITEMENT D'UNE INFLAMMATION INTESTINALE OU D'UN CANCER INTESTINAL.

②② Date de dépôt : 06.07.15.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 13.01.17 Bulletin 17/02.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention : 05.10.18 Bulletin 18/40.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON , INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE , INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) , UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I et CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE — FR.*

⑦② Inventeur(s) : LAGARDE MICHEL, BERNOUD-HUBAC NATHALIE, GUICHARDANT MICHEL, PICQ MADELEINE et PLAISANCIE PASCALE.

⑦③ Titulaire(s) : *INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON, INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE, INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) , UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE .*

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

FR 3 038 606 - B1

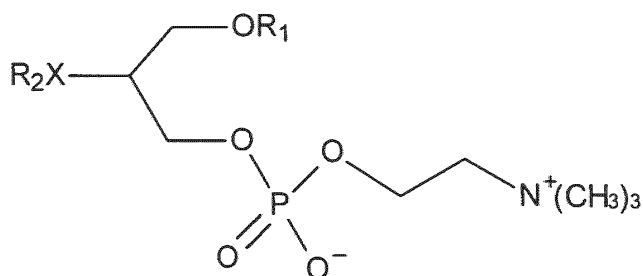


La présente invention concerne une nouvelle utilisation thérapeutique de glycérophosphocholines spécifiques connues.

Les maladies inflammatoires intestinales et les cancers intestinaux touchent une grande partie de la population. A titre d'exemples de composés connus pour leur applications intestinales anti-inflammatoires et/ou antitumorales, on peut citer, notamment, l'aspirine à faibles doses (ce dernier étant hémorragique à fortes doses), l'acide 5-amino-salicylique (dérivé de l'aspirine) et les corticoïdes qui agissent selon des mécanismes d'action différents. Seule l'aspirine inhibe la cyclooxygénase II (COX II également nommée COX-2) en acétylant le site actif, ce qui empêche l'accès de l'acide arachidonique, donc la production de prostaglandines pro-inflammatoires. Par ailleurs, l'acide 5-amino-salicylique inhibe le chimiotactisme des leucocytes et la synthèse de l'interleukine-8. Les corticoïdes, quant à eux, inhibent l'inflammation *via* une régulation négative de la transcription des cytokines pro-inflammatoires. L'action des corticoïdes se situe en amont, et sont donc susceptibles d'effets secondaires, notamment sur le système immunitaire.

Un des objectifs de l'invention est de fournir une alternative aux traitements déjà proposés pour les maladies inflammatoires intestinales et les cancers intestinaux qui ne présenterait pas, notamment, les risques d'effets secondaires sur le système immunitaire que présentent les corticoïdes.

Dans le cadre de l'invention, les inventeurs ont mis en évidence, de façon totalement inattendue, que la 1-acétyl-2-docosaénoyl-glycérophosphocholine (AceDoPC), et plus généralement qu'un composé de formule (I) :



Formule (I)

dans laquelle :

- R₁ représente un groupe acyle, en particulier un acétyle,
 - X représente O, S ou NH, et
- 5 - R₂ représente un acyle gras insaturé comprenant au moins deux doubles liaisons carbone-carbone,
- ou un de ses hydrates, sels ou solvats pharmaceutiquement acceptables, sous la forme d'un isomère pur ou d'un mélange d'isomères en toutes proportions,
- 10 pourrait être utilisé pour lutter et/ou prévenir une inflammation intestinale ou un cancer intestinal. A titre d'exemple d'inflammation intestinale, on peut citer les maladies inflammatoires intestinales chroniques, dont les colites ulcéreuses et la maladie de Crohn, les diverticuloses coliques,....

De tels composés étaient connus dans l'art antérieur et notamment

15 décrits dans les demandes WO 2013/037862 et WO 94/12170, mais pour des applications thérapeutiques toute autre, notamment pour une activité d'anti-agrégation plaquettaire, et en particulier pour leur effet contre les maladies cardiovasculaires, y compris l'athérosclérose et contre les insuffisances ou déficiences en acides gras essentiels, en particulier dans le cerveau, ou pour

20 une activité modulant ou inhibant l'activité du PAF.

Dans le cadre de l'invention, les inventeurs ont mis en évidence que les composés de formule (I), ou un de leurs hydrates, sels pharmaceutiquement acceptables ou solvats pharmaceutiquement acceptables, sous la forme d'un isomère pur ou d'un mélange d'isomères en toutes proportions, pouvaient

être utilisés, en tant que médicament pour le traitement d'une inflammation intestinale ou d'un cancer intestinal.

Dans la définition des composés utilisés dans le cadre de l'invention, les termes utilisés ont les significations classiques reprises ci-après.

5 Par « isomère », on entend aussi bien un isomère optique, qu'un isomère géométrique. Dans la suite de la description, pour des questions de simplicité, on nommera composé de formule (I), un composé de formule (I) qu'il soit sous la forme d'un isomère pur ou d'un mélange d'isomères en toutes proportions, en moins qu'il n'en soit spécifié autrement notamment
10 dans la définition du groupe acyle gras. Si besoin, les composés de formule (I) sont isolés sous forme d'isomères purs ou sous une forme enrichie en un isomère par les techniques classiques de séparation : on pourra utiliser, par exemple des recristallisations fractionnées, les techniques classiques de chromatographies.

15 Par « solvats », on entend une forme du composé associé à une ou plusieurs molécules de solvant, notamment utilisé lors de sa synthèse ou lors de sa purification, sans pour autant être en solution dans ce dernier. Le solvant en question sera pharmaceutiquement acceptable.

Les sels des composés de formule (I) selon la présente invention
20 comprennent ceux avec des acides ou des bases, en fonction des substituants présents. On peut citer les sels pharmaceutiquement acceptables, tels que des sels de sodium, de potassium, de calcium.

Par « hydrates », on entend un composé sous forme hydratée. On peut citer, à titre d'exemple, les semi-hydrates, monohydrates et polyhydrates.

25 Par « acyle gras », on entend un acyle correspondant à un acide gras, c'est à dire à un acide carboxylique ayant une chaîne aliphatique linéaire, non-ramifiée, qui dans la définition des composés de formule (I) est insaturée. L'acyle gras dans la formule (I) peut, en particulier, comprendre de 4 à 28 atomes de carbone, en particulier de 12 à 28 atomes de carbone,
30 de préférence de 16 à 26 atomes de carbone, et préférentiellement de 18 à 24 atomes de carbone.

Par « acyle gras polyinsaturé », on entend un acyle gras comprenant au moins 2 doubles liaisons carbone-carbone non conjuguées, en particulier au moins 2 doubles liaisons carbone-carbone séparées par un atome de carbone, et plus particulièrement dans lequel toutes les doubles liaisons sont
 5 séparées par un atome de carbone. Tout particulièrement, un acyle gras polyinsaturé comprend au moins 3 doubles liaisons carbone-carbone.

Par « acyle gras diène ou triène conjugué », on entend un acyle gras comprenant, en particulier :

- dans le cas des diènes, 2 doubles liaisons carbone-carbone
 10 conjuguées qui ont une configuration EE, EZ, ZE ou ZZ ou

- dans le cas des triènes, 3 doubles liaisons carbone-carbone conjuguées qui ont une configuration EZE, EEZ, ZEE, ZZE, ZEZ, EZZ, EEE ou ZZZ ; en particulier, l'acyle gras peut comprendre la structure $-\text{CH}(\text{OR}_5)-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{OR}_6)-$, dans laquelle :

15 * les doubles liaisons ont une configuration EZE, EEZ, ZEE, ZZE, ZEZ, EZZ, EEE ou ZZZ, en particulier EZE, et

* R_5 et R_6 représentent, indépendamment l'un de l'autre, H ou un groupe alkyle comprenant de 1 à 3 atomes de carbone.

Selon un mode de réalisation particulier, l'acyle gras insaturé présent
 20 dans la formule (I) des composés utilisés dans le cadre de l'invention, comprend au moins trois doubles liaisons carbone-carbone qui peuvent être conjuguées, tout particulièrement l'acyle gras comprend 3 doubles liaisons carbone-carbone ayant une configuration EZE.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'acide gras insaturé
 25 présent dans la formule (I) des composés utilisés dans le cadre de l'invention, comprend au moins deux, en particulier au moins trois, doubles liaisons carbone-carbone qui sont séparées par un atome de carbone. En particulier, l'acyle gras insaturé correspond à la chaîne acyle d'un acide gras n-3 (également nommé omega 3) ou n-6 (également nommé omega 6). Tout
 30 particulièrement, l'acyle gras est choisi parmi les acyles correspondant au DHA (acide docosahexaénoïque), EPA (acide eicosapentaénoïque), DPA

(acide docosapentaénoïque), ARA (acide arachidonique), LNA (acide alpha-linolénique) ou LA (acide linoléique).

Dans la formule (I), R_1 représente un groupe acyle, qui comprend de préférence de 2 à 6 atomes de carbone. En particulier, R_1 est un groupe
5 $-\text{COR}_3$, avec R_3 qui représente un groupe méthyle, éthyle, n-propyle, iso-propyle, n-butyle, sec-butyle, ou ter-butyle.

Dans la formule (I), R_2 est, de préférence, choisi parmi :

* les diènes ou triènes conjugués, notamment choisi parmi les diènes EE, ZZ, ZE et EZ, les diènes ZZ étant préférés, et les triènes EZE, EEZ, ZEE,
10 ZZE, ZEZ, EZZ, EEE et ZZZ, les triènes EZE et ZZZ étant préférés,

* les acyles gras polyinsaturés comprenant 2, 3, 4, 5 ou 6 doubles liaisons carbone-carbone séparées par un atome de carbone, en particulier dans lesquels les doubles liaisons carbone-carbone sont toutes de configuration Z, et plus particulièrement l'acyle gras correspondant à un
15 acide gras n-3 ou n-6,

* leurs dérivés, et leurs métabolites ;

en particulier, R_2 représente un acyle gras triène EZE conjugué ou correspond à un acyle gras n-3 ou n-6, en particulier correspond à la partie acyle du DHA, aussi appelé acide docosahexaénoïque, à la partie acyle de
20 l'EPA, aussi appelé acide eicosapentaénoïque, à la partie acyle du DPA, aussi appelé acide docosapentaénoïque, à la partie acyle de l'ARA, aussi appelé acide arachidonique, à la partie acyle du LNA, aussi appelé acide alpha-linolénique, ou à la partie acyle du LA, aussi appelé acide linoléique.

On choisira, de préférence, d'utiliser, dans le cadre de l'invention, un
25 composé de formule (I) ou un de ses hydrates, sels ou solvats pharmaceutiquement acceptables, présentant en combinaison un groupe R_1 et un groupe R_2 précédemment définis.

Par « dérivés » d'un composé, on entend ledit composé substitué, en particulier par au moins un substituant choisi parmi les halogènes (chlore, brome, iode ou fluor), les groupes alkyle, en particulier les groupes alkyle en
30 C_1 - C_{10} , les groupes aryle, en particulier les groupes aryle en C_6 - C_{10} , les alkyléthers, les aryléthers, les alkylamines, les arylamines, les alkylthioéthers,

les arylthioéthers, les alkylesters, les arylesters, les alkylamides et les arylamides.

Par « alkyle », on entend une chaîne hydrocarbonée, saturée, linéaire ou ramifiée. A titre d'exemple de groupe alkyle comprenant de 1 à 6 atomes
5 de carbone, nommés C₁-C₆, on peut citer, notamment, les groupes méthyle, éthyle, *n*-propyle, *iso*-propyle, *n*-butyle, *tert*-butyle, *sec*-butyle, *n*-pentyle, *n*-hexyle.

Par « aryle », on entend un carbocycle mono-, bi- ou polycyclique, comportant de préférence de 6 à 12 atomes de carbone, comprenant au
10 moins un groupe aromatique, par exemple, un groupe phényle, cinnamyle ou naphyle. Le phényle est le groupe aryle particulièrement préféré.

Par « métabolite », on entend un composé provenant du métabolisme, dans le corps d'un animal ou d'un être humain, ou au niveau cellulaire, de l'acide gras insaturé correspondant à un acyle gras insaturé tel que décrit
15 dans le cadre de l'invention, ou d'un de ses dérivés.

Tout particulièrement, le composé de Formule (I) utilisé dans le cadre de l'invention est l'AceDoPC ou 1-acétyl-2-docosahexaénoyl-glycérophosphocholine, correspondant à la formule (I) dans laquelle X = O,
20 R₁ = COCH₃ et R₂ est l'acyle de l'acide docosahexaénoïque.

Les composés de formule (I) pourront être préparés selon la méthode décrite dans la demande WO 94/12170, ou selon le procédé décrit dans la demande WO 2008/068413 ou des méthodes qui en dérivent.

La présente invention a pour objet les composés de formule (I) tels que définis dans le cadre de l'invention, ainsi que leurs sels, solvats
25 pharmaceutiquement acceptables et hydrates, pour leur utilisation en tant que médicament pour le traitement d'une inflammation intestinale ou d'un cancer intestinal. En particulier, de tels médicaments ou compositions sont destinés au traitement de l'être humain.

Le terme « traitement » désigne toute mesure thérapeutique, prophylactique, curative ou suppressive d'une maladie, affection ou désordre
30 conduisant à un effet clinique souhaitable ou à tout effet bénéfique, incluant notamment la suppression ou la diminution d'un ou plusieurs symptômes, la

régression, le ralentissement ou la cessation de la progression de la maladie ou du désordre qui y est associé.

De par leur activité, les composés de formule (I) tels que définis dans le cadre de l'invention, ainsi que leurs sels, solvats pharmaceutiquement acceptables et hydrates, peuvent être utilisés pour la fabrication d'un médicament destinés à traiter une inflammation intestinale ou un cancer intestinal.

L'invention concerne également les méthodes de traitement d'une inflammation intestinale ou d'un cancer intestinal dans lesquelles une quantité efficace, et en particulier thérapeutiquement efficace, d'un composé de formule (I) tel que défini dans le cadre de l'invention, ou d'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, solvats ou hydrates, est administré à un patient humain ou animal nécessitant un tel traitement.

Les composés de formule (I) ne sont pas cytotoxiques. De par leur activité, les composés de formule (I) tels que définis dans le cadre de l'invention, ainsi que leurs sels, solvats pharmaceutiquement acceptables et hydrates, peuvent être utilisés pour la fabrication d'un médicament destiné à traiter une inflammation intestinale ou un cancer intestinal.

Les compositions pharmaceutiques et médicaments, pour leur utilisation dans le traitement d'une inflammation intestinale ou d'un cancer intestinal, comprenant un composé de formule (I) tel que défini dans le cadre de l'invention, ou un de ses sels, solvats pharmaceutiquement acceptables ou hydrates, en association avec au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable, font également partie intégrante de l'invention. Dans de telles compositions, le composé de formule (I) tel que défini dans le cadre de l'invention, ou un de ses solvats ou sels pharmaceutiquement acceptables ou hydrates est présent en quantité thérapeutiquement efficace.

En particulier, le composé de Formule (I) ou un de ses solvats ou sels pharmaceutiquement acceptables ou hydrates est la substance active de la composition pharmaceutique ou du médicament, c'est-à-dire la substance utilisée pour obtenir l'activité thérapeutique ou prophylactique sur l'inflammation intestinale ou le cancer intestinal concerné.

Par « quantité efficace », on désigne toute quantité d'une composition qui permet d'éviter l'apparition d'un ou plusieurs signes de l'affection que l'on souhaite prévenir (dans le cas d'un traitement prophylactique) ou améliore un ou plusieurs des paramètres caractéristiques de l'affection traitée (dans le cas d'un traitement curatif).

Par « quantité thérapeutiquement efficace », on désigne toute quantité d'une composition qui améliore un ou plusieurs des paramètres caractéristiques de l'affection traitée.

Afin d'obtenir l'effet souhaité, le composé selon l'invention sera présent dans la composition ou le médicament à une dose efficace, et en particulier thérapeutiquement efficace. La dose de principe actif varie, par exemple, entre un nanogramme et un dixième de gramme par kg de poids du corps du patient auquel elle est administrée, et par jour.

De telles compositions pharmaceutiques administrables aux animaux et, en particulier à l'homme, contiennent une dose efficace d'un composé de formule (I), ou d'un sel, d'un solvat ou d'un hydrate pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, et un ou des excipients convenables selon notamment la Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition. Les excipients présents dans les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont choisis selon la forme pharmaceutique et le mode d'administration souhaités. Dans les compositions pharmaceutiques de la présente invention pour l'administration orale, sublinguale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, intracartilage, topique, intratrachéale, intranasale, transdermique, rectale ou intraoculaire, les principes actifs de formule (I), ou leurs solvats ou sels pharmaceutiquement acceptables ou hydrates éventuels, peuvent être administrés sous formes unitaires d'administration, en mélange avec des supports pharmaceutiques classiques, aux animaux et aux êtres humains pour le traitement du cancer intestinale ou de l'inflammation intestinale ciblée. Les formes unitaires d'administration appropriées comprennent les formes par voie orale, telles que les comprimés, les gélules, les poudres, les granules et les solutions ou suspensions orales, les formes d'administration sublinguale, buccale, intra

trachéale, intra nasale, les formes d'administration sous-cutanée, intramusculaire, intra cartilage ou intraveineuse et les formes d'administration rectale. Pour l'application topique, on peut utiliser les composés selon l'invention dans des crèmes, pommades, patches ou lotions.

5 La composition ou le médicament peut comprendre outre le composé de Formule (I), éventuellement un autre principe actif, au moins un excipient et/ou un support pharmaceutiquement acceptable, en particulier de l'eau. En particulier, la composition ou le médicament comprend un ou des excipient permettant d'obtenir la formulation sous la forme souhaitée, par exemple de
10 gélule, de granule, de comprimé, de gel, de suppositoire, de solution, de suspension, d'émulsion, de crème ...

En particulier, la composition, le médicament, l'utilisation ou la méthode selon l'invention peut impliquer une administration parentérale, en particulier par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, une administration orale et donc
15 les compositions pharmaceutiques et médicaments adaptés à un tel mode d'administration sont préférés.

Lorsque l'on prépare une composition solide sous forme de comprimés, on mélange l'ingrédient actif principal avec un véhicule pharmaceutique, tel que la gélatine, l'amidon, le lactose, le stéarate de magnésium, le talc, la
20 gomme arabique ou analogues. On peut enrober les comprimés de saccharose, d'un dérivé cellulosique, ou d'autres matières appropriées ou encore on peut les traiter de telle sorte qu'ils aient une activité prolongée ou retardée et qu'ils libèrent d'une façon continue une quantité prédéterminée de principe actif.

25 On obtient une préparation en gélules en mélangeant l'ingrédient actif avec un diluant et en versant le mélange obtenu dans des gélules molles ou dures.

Les compositions pharmaceutiques contenant un composé de formule (I), ou un de ses sels ou solvats pharmaceutiquement acceptables ou
30 hydrates, peuvent aussi se présenter sous forme liquide, par exemple, des solutions, des émulsions, des suspensions ou des sirops. Les supports liquides appropriés peuvent être, par exemple, l'eau, les solvants organiques

tels que le glycérol ou les glycols, de même que leurs mélanges, dans des proportions variées, dans l'eau.

Une préparation sous forme de sirop ou d'élixir ou pour l'administration sous forme de gouttes peut contenir l'ingrédient actif conjointement avec un
5 édulcorant acalorique, un antiseptique, ainsi qu'un agent donnant du goût et un colorant approprié. Les poudres ou les granules dispersibles dans l'eau peuvent contenir l'ingrédient actif en mélange avec des agents de dispersion ou des agents mouillants, ou des agents de mise en suspension, comme la polyvinylpyrrolidone, de même qu'avec des édulcorants ou des correcteurs
10 de goût.

Selon un autre de ses aspects, l'invention a pour objet un composé de Formule (I), ou un de ses sels ou solvats pharmaceutiquement acceptables ou hydrates, une composition pharmaceutique ou médicament, comprenant un composé de formule (I) ou un de ses sels ou solvats pharmaceutiquement
15 acceptables ou hydrates tel que défini dans le cadre de l'invention, en association avec au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable, pour son utilisation dans le traitement d'une maladie ou affection intestinale :

- où une diminution de l'expression et/ou de l'activité de la cyclooxygénase II (COX II) est souhaitée, et/ou
- 20 - où une diminution de l'expression de la BCL-2 et/ou de la HSP-27 est souhaitée, et/ou
- dans laquelle l'expression et/ou de l'activité de la cyclooxygénase II (COX II), et en particulier une forte expression et/ou activité de la COX II, contribue à l'état pathologique et/ou aux symptômes de la maladie ou de
25 l'affection ;

ainsi que les composés de formule (I) tels que définis dans le cadre de l'invention, et leurs sels et solvats pharmaceutiquement acceptables et hydrates, pour leur utilisation dans la fabrication d'un médicament pour le traitement, en particulier chez l'être humain, d'une telle pathologie ou
30 affection ;

et les méthodes de traitement d'une telle pathologie ou affection dans lesquelles une quantité efficace, et en particulier thérapeutiquement efficace,

d'un composé de formule (I) tel que défini dans le cadre de l'invention, ou d'un de ses solvats ou sels pharmaceutiquement acceptables ou hydrates, est administré à un patient humain ou animal nécessitant un tel traitement.

D'une façon générale, toutes les variantes indiquées précédemment pour les composés (I) sont applicables *mutatis mutandis* aux médicaments, compositions, méthodes et utilisations mettant en œuvre ces composés.

Selon des modes de réalisation particuliers des composition, médicaments, méthodes et utilisations selon l'invention, ladite composition, ledit médicament, ladite méthode ou ladite utilisation exclura l'utilisation de ladite composition ou dudit médicament pour une activité d'anti-agrégation plaquettaire, et en particulier pour son effet contre les maladies cardiovasculaires, y compris l'athérosclérose et contre les insuffisances ou déficiences en acides gras essentiels, en particulier dans le cerveau, notamment décrite dans la demande WO 94/12170, et pour une activité modulant ou inhibant l'activité du PAF, en particulier décrite dans la demande WO 3013/037862.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, mais n'ont aucun caractère limitatif.

20 **Tests réalisés**

L'AceDoPC est préparé selon le procédé décrit dans la demande WO 2008/068413, par trans-estérification de la position *sn-1* de 1-palmitoyl,2-docosahexaénoyl-glycérophosphocholine (PC-DHA), par une lipase en présence d'acétate de vinyle et en absence d'eau, permettant l'obtention directe d'AceDoPC. L'AceDoPC a été soumis aux tests suivants :

1. Cellules en culture.

La lignée cellulaire HT29 parentale (HT29p), dérivant d'un adénocarcinome colique, a été cultivée en monocouche jusqu'à 80% de confluence en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF) décomplémenté et 1% de Pénicilline-Streptomycine.

2. Tests avec la molécule AceDoPC.

La molécule a été testée en solution dans l'éthanol à 0,2%, comparativement aux contrôles cellulaires incubés avec la même concentration d'éthanol.

5

3. Prolifération cellulaire.

Elle a été testée par le taux d'incorporation du BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine), nucléoside synthétique de la thymidine, dans l'ADN nouvellement synthétisé par les cellules en cours de réplication.

10

4. Expressions protéiques.

L'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et HSP-27 ont été mesurées par immuno-empreinte (western blotting) avec un anticorps commercial spécifique fourni par la société Sigma-Aldrich selon la méthodologie recommandée par ce fournisseur.

15

L'activité anti-apoptotique de ces protéines a été établie dans la littérature :

pour Bcl-2 :

Expression of cell survival/death genes: Bcl-2 and Bax at the rate of colon cancer prognosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1741 (2005) 25–29 Monika Paul-Samojedny¹, Danuta Kokocińska, Arkadiusz Samojedny, Urszula Mazurek, Robert Partyka, Zbigniew Lorenz, Tadeusz Wilczok,

20

The Bcl 2 family: regulators of the cellular life-or-death switch *Nat. Rev., Cancer*, 2 (9) (2002), pp. 647–656. S. Cory, J.M. Adams,

25

Bcl-2 constitutively suppresses p53-dependent apoptosis in colorectal cancer cells. *Genes & Dev.* 2003. 17: 832-837. Ming Jiang and Jo Milner,

Pour HSP27 :

Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer Res.* 1998 Dec 1;58(23):5495-9. Garrido C1,

30

Fromentin A, Bonnotte B, Favre N, Moutet M, Arrigo AP, Mehlen P, Solary E,

Apoptosis Versus Cell Differentiation: Role of Heat Shock Proteins HSP90, HSP70 and HSP27. Prion 2007, 1 (1), p53-60. David Lanneau, Aurelie de Thonel, Sebastien Maurel, Celine Didelot & Carmen Garrido.

- 5 L'expression de l'iso-forme inductible cyclo-oxygénase-2 (COX II) a été mesurée de la même manière avec un anticorps fourni par la société Abcam.

5. Mesure des prostaglandines.

10 Les prostaglandines D₂ et E₂ (nommées également PGE2 et PGD2) représentatives de la voie générale de biosynthèse des prostaglandines *in situ*, et prostaglandines pro-inflammatoires issues de (COX II), ont été mesurées par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), méthodologie utilisée par la plateforme IBISA de Lipidomique Fonctionnelle (IMBL-INSA de Lyon).

- 15 Ces prostaglandines ont été mesurées sur les cellules en culture et en présence des iso-formes de cyclo-oxygénases constitutive et inductible pures.

Résultats obtenus

20 La **Figure 1** présente l'évolution de l'expression protéique de COX II à différentes concentrations d'AceDoPC (1, 2 et 20 µM).

La **Figure 2** présente l'évolution de la sécrétion de PGE2 en l'absence d'AceDoPC et à une concentration de 20 µM en AceDoPC.

25 La **Figure 3** présente l'évolution de la prolifération des cellules HT29P à différentes concentrations d'AceDoPC (1, 2, 20 et 100 µM).

La **Figure 4** présente l'évolution de l'expression protéique de Bcl-2 à différentes concentrations d'AceDoPC (1, 2 et 20 µM).

La **Figure 5** présente l'expression protéique de HSP-27 à différentes concentrations d'AceDoPC (1, 2 et 20 µM).

- 30 Sur ces figures, p : probabilité ou risque ; CT : contrôle qui a été fait sans AceDoPC, c'est-à-dire en présence de son solvant.

Les résultats présentés sur ces figures montrent que sur les cellules intestinales tumorales :

- l'expression protéique de la cyclo-oxygénase inductible COX II est diminuée d'environ 1/3 par 20 μ M d'AceDoPC (**Fig. 1**),

5 - cette diminution par la même concentration d'AceDoPC passe à environ 80% en mesurant la PGE2 issue de COX II (**Fig. 2**).

Ce résultat suggère une inhibition additionnelle de l'activité de COX II, résultat qui est en accord avec ceux présentés plus loin sur la COX II purifiée.

10 Les résultats présentés **Fig. 3 à 5** montrent :

- que la prolifération des cellules cancéreuses est inhibée d'environ 50% à une concentration de 100 μ M d'AceDoPC (**Fig. 3**),

- l'expression protéique des deux protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et HSP-27 est significative aux faibles concentrations d'AceDoPC (1 μ M sur les **Fig. 4 et 5** respectivement).

L'AceDoPC présente donc une activité anti proliférative sur les cellules cancéreuses, certainement liée à la sous expression des deux protéines anti-apoptotiques et à une diminution de l'expression de COX II.

Les essais réalisés sur cyclo-oxygénase purifiée ont été menés pour
20 comparer l'effet d'AceDoPC à son équivalent sans acétyl (1-lyso-2-DHA-PC) et à son analogue acétylé sans DHA (1-acétyl-2oléoyl-PC), étant donné que le DHA est connu pour inhiber les COX purifiés (Rao GH, Radha E, White JG, 1983, 117(2) : 549-555). Les résultats sont présentés dans les **Tableaux 1 et 2** ci-après. Les résultats sont présentés en ng et représentent la somme
25 de PGD2 + PGE2, puis la moyenne des trois mesures réalisées plus ou moins SD (déviation ou erreur standard) est donnée.

Tableau 1 :

Effet des composés : 1-lyso-2-DHA-PC, 1-acétyl-2-oléoyl-PC et AceDoPC sur la protéine COX II recombinante humaine (40 unités de COX II /échantillon)

	Contrôle	1-lyso-2-DHA-PC (100 µM)	1-acetyl-2-oleoyl-PC (100 µM)	AceDoPC (100 µM)
	40.3	20.4	34.8	17.7
	35.9	17.7	23.1	16.2
	37.6	18.2	14.9	10.0
moyenne±SD	37.9±2.2 ^a	18.8±1.4 ^{b**}	24.3±10.0 ^b	14.6±4.1 ^{b**}
Inhibition		50.40%	35.88%	61.48%

5 Tableau 2 :

Effet des composés : 1-lyso-2-DHA-PC, 1-acétyl-2-oléoyl-PC et AceDoPC sur la protéine COX I de mouton (40 unités de COX I/échantillon)

	Contrôle	1-lyso-2-DHA-PC (100 µM)	1-acetyl-2-oleoyl-PC (100 µM)	AceDoPC (100 µM)
	77.1	40.7	71.2	30.8
	71.6	21.7	46.4	22.5
	47.0	25.2	43.7	19.8
moyenne±SD	65.2±1.0 ^a	29.2±10.1 ^{b**}	53.8±15.2 ^b	24.4±5.7 ^{b**}
Inhibition		55.21%	17.48%	62.58%

10 Les nombres portant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différents les uns des autres ; a et b indiquent donc deux valeurs significativement différentes. Les astérisques permettent de préciser le niveau de signification.

* : $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus le contrôle. ANOVA (analyse de variance) suivi par le test de Fischer

Il apparaît :

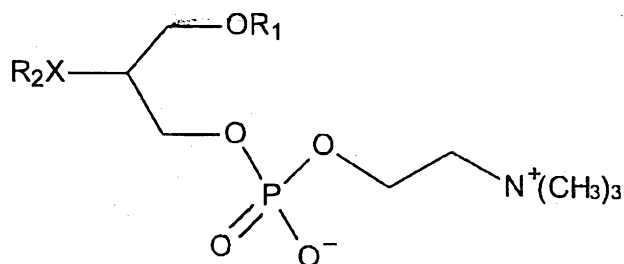
- une plus forte inhibition de COX II avec l'AceDoPC comparativement à la 1-lyso-2-DHA-PC, ce qui suggère un effet propre de l'acétyle. Dans le cas où le DHA est remplacé par un radical oléoyle, une très faible inhibition est constatée comparativement aux deux autres composés testés.

- les résultats sont proches sur COX I (cyclo-oxygénase constitutive), avec cependant un moindre effet de la présence du radical acétyle. On note cependant que l'inhibition est plus forte envers COX II que COX I, ce qui est un avantage pour l'intestin.

Ces résultats suggèrent que l'AceDoPC serait capable d'acétyler des cibles protéiques en raison d'une possible activation du groupement acétyle, présent en position externe sur l'AceDoPC, ou plus généralement du groupement acyle sur les composés de formule (I).

REVENDICATIONS

1 - Composé de formule (I) :

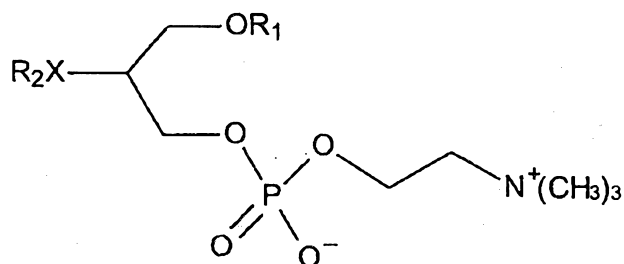


Formule (I)

dans laquelle :

- 5 - R_1 représente un groupe acétyle,
 - X représente O, S ou NH, et
 - R_2 représente un acyle gras insaturé comprenant au moins deux doubles liaisons carbone-carbone,
 ou un de ses hydrates, sels ou solvats pharmaceutiquement acceptables,
 10 sous la forme d'un isomère pur ou d'un mélange d'isomères en toutes proportions,
 ou médicament ou composition pharmaceutique comprenant un tel composé de formule (I) ou un de ses hydrates, sels ou solvats pharmaceutiquement acceptables, sous la forme d'un isomère pur ou d'un mélange d'isomères en
 15 toutes proportions,
 pour son utilisation dans le traitement d'un cancer intestinal ou d'une inflammation intestinale.

2 - Composé de formule (I) :



Formule (I)

dans laquelle :

- R₁ représente un groupe acétyle,
- X représente O, S ou NH, et
- R₂ représente un acyle gras insaturé comprenant au moins deux doubles

5 liaisons carbone-carbone,

ou un de ses hydrates, sels ou solvats pharmaceutiquement acceptables, sous la forme d'un isomère pur ou d'un mélange d'isomères en toutes proportions,

ou médicament ou composition pharmaceutique comprenant un tel composé

10 de formule (I) ou un de ses hydrates, sels ou solvats pharmaceutiquement acceptables, sous la forme d'un isomère pur ou d'un mélange d'isomères en toutes proportions,

pour son utilisation dans le traitement d'une maladie ou affection intestinale :

15 - où une diminution de l'expression et/ou de l'activité de la cyclooxygénase II (COX II) est souhaitée, et/ou

- où une diminution de l'expression de la Bcl-2 et/ou de la HSP-27 est souhaitée, et/ou

20 - dans laquelle l'expression et/ou de l'activité de la cyclooxygénase II (COX II), et en particulier une forte expression et/ou activité de la COX II, contribue à l'état pathologique et/ou aux symptômes de la maladie ou de l'affection.

3 - Composé, médicament ou composition pharmaceutique pour son utilisation, selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que R₂ est, choisi parmi :

25 * les diènes ou triènes conjugués, notamment choisi parmi les diènes EE, ZZ, ZE et EZ, les diènes ZZ étant préférés, et les triènes EZE, EEZ, ZEE, ZZE, ZEZ, EZZ, EEE et ZZZ, les triènes EZE et ZZZ étant préférés,

* les acyles gras polyinsaturés comprenant 2, 3, 4, 5 ou 6 doubles liaisons carbone-carbone séparées par un atome de carbone, en particulier dans

30 lesquels les doubles liaisons carbone-carbone sont toutes de configuration Z, et plus particulièrement l'acyle gras correspondant à un acide gras n-3 ou n-

6,

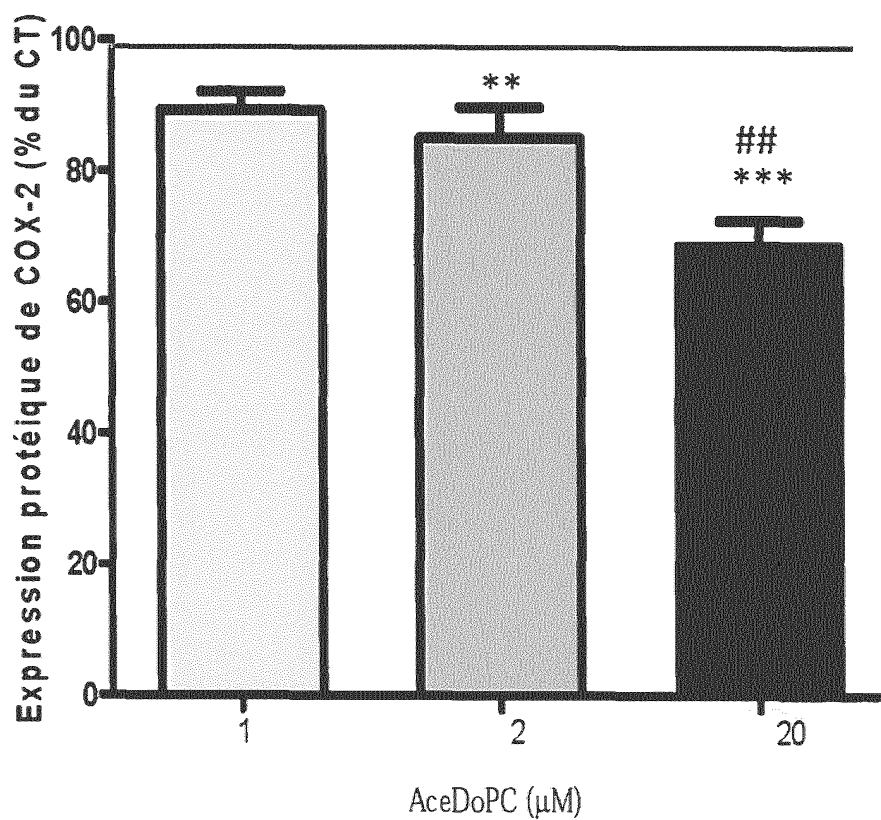
* leurs dérivés, et leurs métabolites.

5 **4** - Composé, médicament ou composition pharmaceutique pour son utilisation, selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que R_2 représente un acyle gras triène EZE conjugué ou correspond à la partie acyle du DHA, EPA, DPA, ARA, LNA ou LA.

10 **5** - Composé, médicament ou composition pharmaceutique pour son utilisation, selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que le composé de formule (I) utilisé est le 1-acétyl-2-docosahexaénoyl-glycérophosphocholine.

15 **6** - Composé, médicament ou composition pharmaceutique pour son utilisation, selon l'une des revendications 1 à 5, dans le traitement d'une maladie inflammatoire intestinale chronique, notamment pour le traitement de colites ulcéreuses ou de la maladie de Crohn, ou dans le traitement de diverticuloses coliques.

1/5



** p<0,01 vs CT

*** p<0,001 vs CT

p<0,001 vs AceDoPC 1 μM

FIG.1

2/5

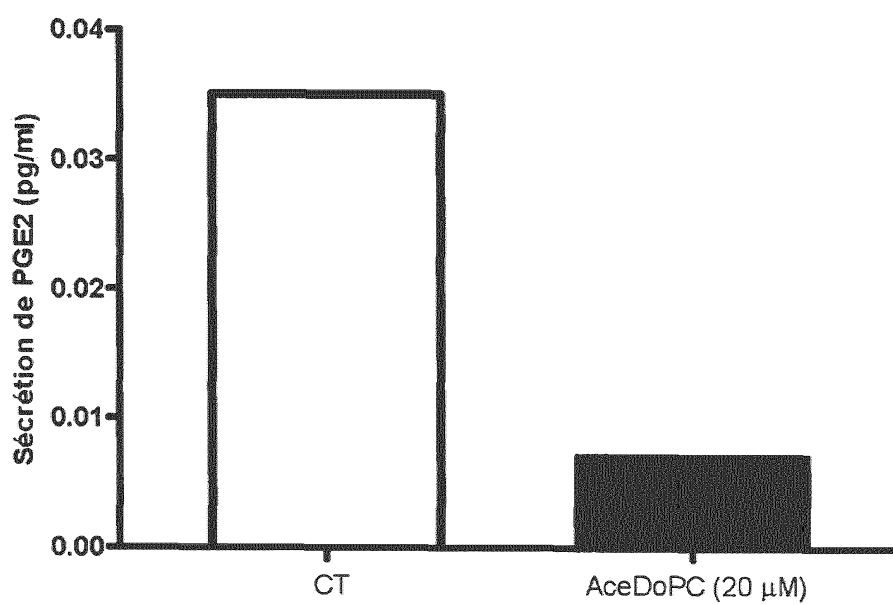
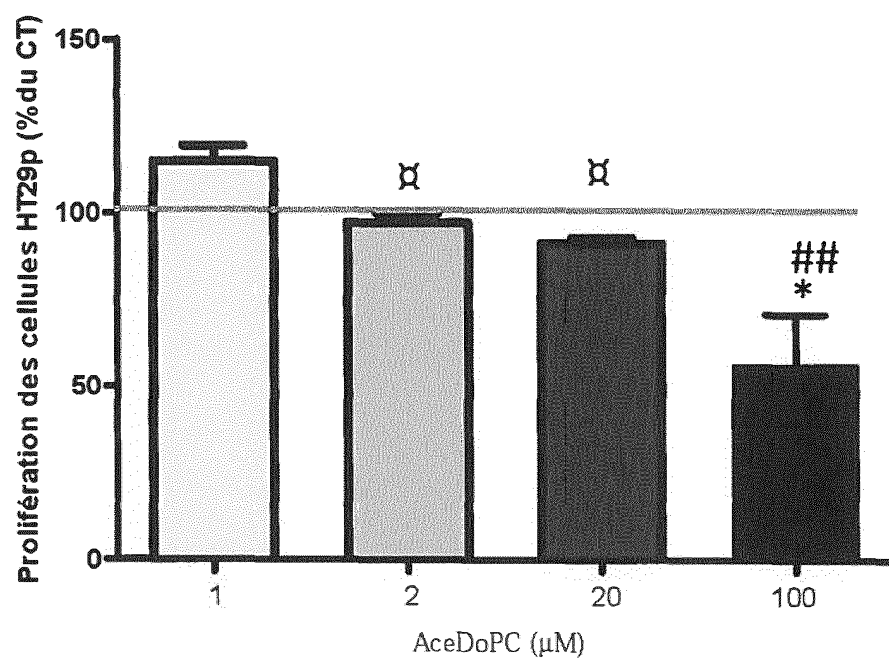


FIG.2

3/5



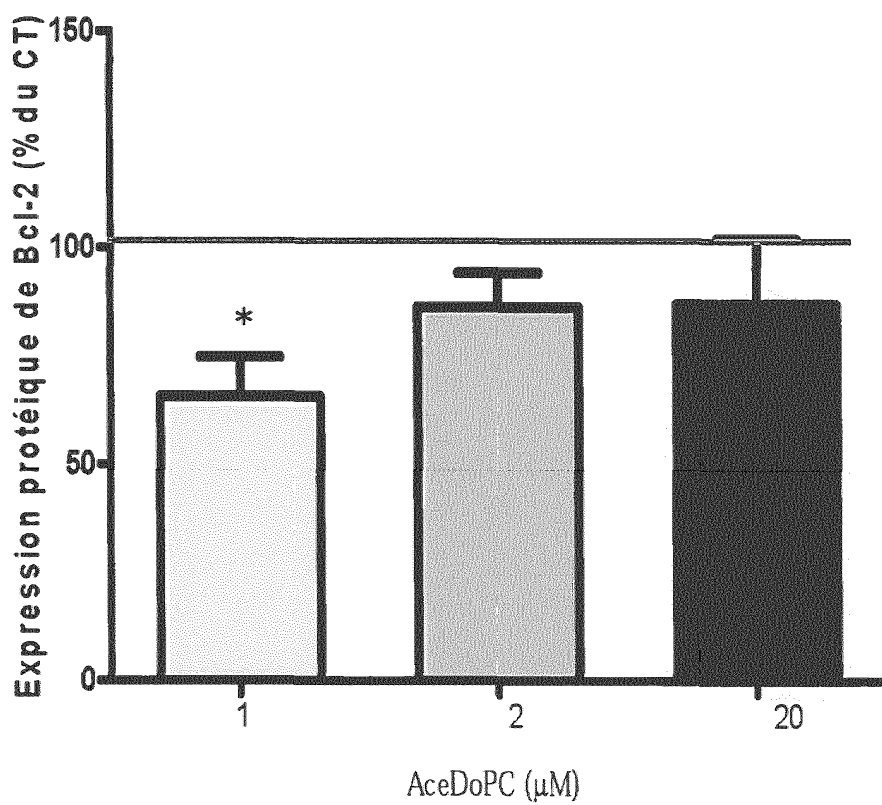
* $p < 0,05$ vs CT

⊠ $p < 0,05$ vs AceDoPC 100 μM

$p < 0,01$ vs AceDoPC 1 μM

FIG.3

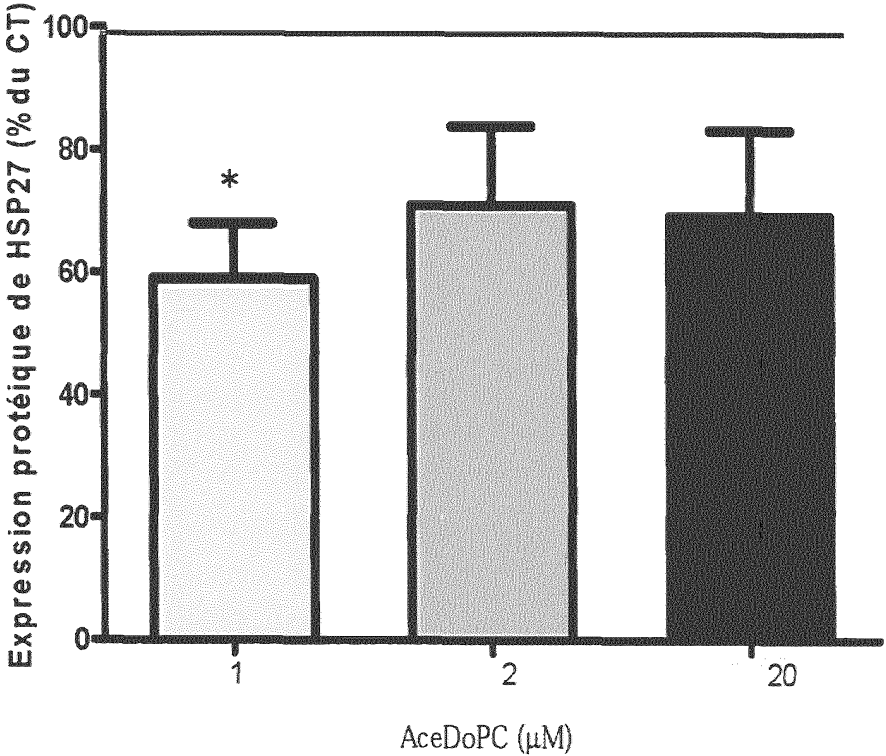
4/5



* $p < 0,05$ vs CT

FIG.4

5/5



* p<0,05 vs CT

FIG.5

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- Le demandeur a maintenu les revendications.
- Le demandeur a modifié les revendications.
- Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

ANGELA C. BAIRD ET AL: "Prostaglandin E2 and Polyenylphosphatidylcholine Protect Against Intestinal Fibrosis and Regulate Myofibroblast Function", DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES., vol. 60, no. 6, 29 janvier 2015 (2015-01-29), pages 1603-1616, XP55267612, US
ISSN: 0163-2116, DOI: 10.1007/s10620-015-3552-9

WO 2009/002719 A1 (UNIV TEXAS [US]; LANDEN CHARLES N [US]; KAMAT APARNA A [US]; SOOD ANIL)
31 décembre 2008 (2008-12-31)

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

NEANT

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT