



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1011077A3

NUMERO DE DEPOT : 09700294

Classif. Internat. : A61K

Date de délivrance le : 06 Avril 1999

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 28 Mars 1997 à 24H00 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN
Halles Universitaires, place de l'Université 1, B-1348 LOUVAIN-LA-NEUVE(BELGIQUE)

représenté(e)(s) par : VAN MALDEREN Eric, OFFICE VAN MALDEREN, Place Reine Fabiola
6/1 - B 1083 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes
annuelles, pour : COMPOSITION PHARMACEUTIQUE, COSMETIQUE ET/OU ALIMENTAIRE AUX
PROPRIETES ANTI-OXYDANTES.

INVENTEUR(S) : Rees Jean-François, rue des Tilleuls 29, B-1435 Hevillers (BE);
Dubuisson Marlène, rue Joseph Lepage 21, B-4250 Geer (BE); Trouet André,
Predikherenberg 20, B-3020 Herent (BE)

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité
de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de
la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 06 Avril 1999
PAR DELEGATION SPECIALE :


L. WUYTS
CONSEILLER

5

10 COMPOSITION PHARMACEUTIQUE, COSMETIQUE ET/OU ALIMENTAIRE
 AUX PROPRIETES ANTI-OXYDANTES

Objet de l'invention

 La présente invention concerne une
composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire
15 destinée en particulier à la prévention et/ou le traitement
de pathologies liées aux agents pro-oxydants.

 La présente invention concerne également
l'utilisation de la composition pharmaceutique, cosmétique
et/ou alimentaire selon l'invention.

20

Arrière-plan technologique et état de la technique

 La demande de brevet WO96/28160 décrit une
composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire
ayant des propriétés anti-oxydantes, et comprenant un
25 dérivé de pyrazine ou un précurseur de celle-ci, les
dérivées étant des imidazolopyrazines telles que la
coelentérazine.

 Ce document décrit également l'utilisation
d'une telle composition pharmaceutique, cosmétique et/ou
30 alimentaire pour le traitement de pathologies liées à
l'action des agents pro-oxydants telles que les pathologies
inflammatoires, ou l'application de ladite composition pour

le traitement de tumeurs cancéreuses.

Des molécules antioxydantes telles que des vitamines comme la vitamine E (soluble dans des lipides) ou des dérivés de cystéine (soluble dans l'eau) sont également
5 déjà utilisés dans des applications cosmétiques, pharmaceutiques et/ou alimentaires. Cependant, de telles molécules antioxydantes sont caractérisées soit par une faible solubilité dans l'eau, soit par une toxicité élevée, par une efficacité trop faible ou par une faible stabilité
10 vis-à-vis de d'oxygène.

Buts de l'invention

La présente invention vise à obtenir une composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire
15 permettant la fixation d'agents pro-oxydants qui ne présenterait pas les inconvénients de l'état de la technique.

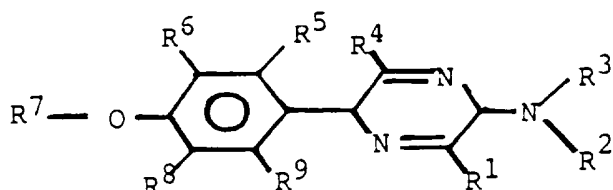
Un but particulier de la présente invention vise à obtenir une composition pharmaceutique, cosmétique
20 et/ou alimentaire permettant avantageusement la prévention et/ou le traitement de pathologies liées aux agents pro-oxydants.

Un autre but de la présente invention vise à fournir une composition pharmaceutique, cosmétique et/ou
25 alimentaire qui soit caractérisée par une stabilité améliorée par rapport aux produits de l'état de la technique, par une faible toxicité ou une absence de toxicité, par une importante solubilité dans un grand nombre de solvants et/ou des lipides.

Eléments caractéristiques de la présente invention

La présente invention concerne une composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire comprenant un dérivé de pyrazine de formule

5



- 10 dans lequel les radicaux R^1 à R^9 sont H, des radicaux choisis parmi le groupe constitué par alkyle, alkényle, alkynyle, aryle, arylalkyle, alkylaryle, hétéroaryle, hétéroalkyle et hétéro-(alkylaryle et arylalkyle), de préférence constitués de 1 à 20 atomes de carbone
- 15 comprenant éventuellement 1 à 10 hétéroatomes et dont les atomes de carbone peuvent être éventuellement substitués par un quelconque élément du tableau de Mendeleev, de préférence un élément choisi parmi le groupe constitué par H, B, N, O, F, P, S, Cl, As, Se, Br, Te et I, ou des
- 20 chaînes de formule $(R^5 \times R^6)_n$, où $n \geq 1$, x représente un ou plusieurs hétéro-atomes et R^5 et R^6 sont des radicaux choisis parmi le groupe constitué par alkyle, alkényle, alkynyle, aryle, arylalkyle, alkylaryle, hétéroaryle, hétéroalkyle et hétéro-(alkylaryle et arylalkyle),
- 25 constitués de 1 à 20 atomes de carbone comprenant éventuellement 1 à 10 hétéroatomes et dont les atomes de carbone peuvent être éventuellement substitués par un quelconque élément du tableau de Mendeleev, de préférence un élément choisi parmi le groupe constitué par H, B, N, O,
- 30 F, P, S, Cl, As, Se, Br, Te et I; et éventuellement un véhicule pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire

adéquat.

De préférence, dans le dérivé de pyrazine selon l'invention, les radicaux R^2 à R^9 sont H et le radical R^1 est un radical de formule CH_3  et éventuellement un véhicule pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire adéquat.

Un autre aspect de la présente invention concerne l'utilisation de la composition selon l'invention pour la fixation d'agents pro-oxydants (formes activées de l'oxygène) tels que peroxydes, superoxydes, ...

La présente invention concerne également un procédé de fixation d'agents pro-oxydants dans lequel on met en contact la composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire avec lesdits agents pro-oxydants.

La présente invention concerne également un procédé de traitement et/ou de prévention de pathologies liées à l'action d'agents pro-oxydants, en particulier des pathologies inflammatoires, ainsi qu'un procédé de traitement et/ou de prévention de l'athérosclérose, dans lesquels on administre à un patient (homme ou animal) la composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire selon la présente invention.

Dans lesdits procédés, la composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire est associée à un effet thérapeutique. Cependant, ladite composition peut aussi être caractérisée comme étant une composition alimentaire "fonctionnelle".

Une "composition alimentaire fonctionnelle" est caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs ingrédients susceptibles d'avoir un effet physiologique bénéfique sur le consommateur, tel que la prévention d'une

maladie, le traitement d'une maladie, l'activation du biorythme ou du système immunitaire. Une telle composition alimentaire fonctionnelle peut être englobée dans la diète normale du consommateur, de manière à procurer une
5 amélioration générale de la santé du patient ou pour obtenir le traitement ou la prévention d'une maladie particulière, pour autant que ladite composition alimentaire fonctionnelle ait un effet significatif tant du point de vue préventif que thérapeutique sur le
10 consommateur.

Ladite composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire comprendra une quantité suffisante du dérivé de pyrazine selon l'invention de manière à obtenir une prévention ou un effet thérapeutique significatif sur
15 le consommateur.

La proportion du dérivé de pyrazine selon l'invention dans la composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire selon l'invention variera en fonction des quantités journalières de produit absorbé, suivant la
20 législation alimentaire, cosmétique et pharmaceutique adéquate, les appréciations organoleptiques et les effets secondaires susceptibles d'exister avec les dérivés selon l'invention et/ou leurs véhicules pharmaceutiques, cosmétique et/ou alimentaires utilisés.

25 Les véhicules pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires des compositions selon l'invention sont des véhicules adéquats notamment pour l'administration orale, par exemple sous forme de tablettes, enrobées ou non enrobées, de pilules, de capsules, de solutions, d'huiles
30 essentielles et/ou de sirops.

D'autres véhicules pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires adéquats peuvent être

utilisés selon le mode d'administration choisi.

En particulier, ces véhicules pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires peuvent être des crèmes ou des huiles solaires bien connues de l'Homme du Métier, qui peuvent enduire différentes parties du corps humain ou animal en combinaison avec d'autres agents protecteurs de la peau.

En outre, les produits de l'invention peuvent être aisément incorporés dans des solvants (milieux aqueux, alcools, ...) ou des lipides (par exemple en combinaison avec des huiles alimentaires ou des huiles de bronzage).

Les compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires selon l'invention sont préparées selon des procédés généralement utilisés par l'Homme du Métier, en particulier par les pharmaciens, et peuvent comprendre tout véhicule ou tout adjuvant pharmaceutiquement adéquat, solide ou liquide, et non toxique.

L'incorporation des dérivés selon l'invention dans un milieu galénique peut également être envisagée.

Le pourcentage de produit actif (dérivés de pyrazine) dans le véhicule pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire peut varier selon de très larges gammes, généralement limitées par la tolérance et le niveau d'acceptation de la composition par le consommateur.

Les limites sont généralement déterminées par la fréquence de consommation de la composition par le consommateur.

Un dernier aspect de la présente invention concerne l'utilisation de la composition selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des pathologies liées à l'action d'agents pro-oxydants.

En particulier, la présente invention concerne l'utilisation de la composition selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des pathologies inflammatoires ou cancérigènes, à la prévention de l'athérosclérose et/ou au traitement des tumeurs cancéreuses.

Brève description des figures

La figure 1 représente le pourcentage de survie cellulaire d'hépatocytes de rats en fonction de doses croissantes (Molaires) de coéluentéramine.

La figure 2 représente l'oxydation de "low-density lipoproteins" (LDL) avec un initiateur radicalaire hydrosoluble (AAPH) en présence de coéluentéramine.

La figure 3 représente le suivi de l'oxydation de "low-density lipoproteins" humaines par du Cu^{2+} en fonction du temps.

La figure 4 illustre le pourcentage de survie d'hépatocytes soumis à l'action de la nitrofurantoïne.

La figure 5 illustre l'accroissement de la résistance de fibroblastes soumis à l'action d'un stress oxydatif (concentration croissante en t-BHP) en présence ou en l'absence de coéluentéramine.

La figure 6 illustre la réduction de la libération de lactate-déshydrogénase par des hépatocytes de rats lorsque des doses croissantes de coéluentéramine sont additionnées au milieu de culture.

Exemples

La coéluentéramine (CLM) est un produit naturel présent chez les organismes marins, et qui dérive de l'oxydation de la coéluentérazine.

- 5 La structure du la coéluentéramine est illustrée ci-dessous. Cette structure présente les caractéristiques suivantes :

Exemple 1 : stabilité

- 10 La coéluentéramine est caractérisée par une excellente stabilité vis-à-vis de l'oxygène, aussi bien sous forme de poudre qu'après solubilisation dans des solvants aqueux et organiques. En effet, cette molécule n'est pas altérée par un séjour de plusieurs jours en
15 solvant aqueux exposé à l'air. Après plusieurs jours, aucun produit de dégradation de la coéluentéramine n'a été identifié après analyse chromatographique en HPLC et TLC.

Exemple 2 : toxicité

- 20 La coéluentéramine est caractérisée par une absence de toxicité tant sur les cellules hépatiques que sur les cellules intestinales ou les fibroblastes. La coéluentéramine a été appliquée sur des cultures primaires d'hépatocytes de rats ensemencées en microplaques (20000
25 cellules par puits, 200 µl). Les doses en CLM allaient de $1.3 \cdot 10^{-5}$ à $5 \cdot 10^{-4}$ M. Après une période de 24 heures, leur survie a été évaluée par une mesure des contenus en protéines totales dans chaque puits (méthode de Bradford). Les résultats, représentés dans la figure 1, exprimés en
30 pourcentage de la survie des contrôles non traités par la CLM, démontrent que cette dernière n'est pas du tout toxique pour les hépatocytes à ces concentrations. Des

résultats similaires ont été obtenus sur des fibroblastes humains (MRC-5) ainsi que des cellules intestinales humaines (CACO2).

5 Exemple 3 : activité protectrice des lipoprotéines

L'athérosclérose constitue une cause majeure de mortalité cardio-vasculaire. Des études épidémiologiques ont permis de montrer qu'un développement accéléré de l'athérosclérose est associé à un taux plasmatique élevé en "low-density lipoproteins" (LDL). Il est connu que les LDL contiennent différents agents anti-oxydants, dont l'élément majeur est l' α -tocophérol (vitamine E). L'acide ascorbique (vitamine C), l'ubiquinone et le β -carotène représentent les autres principales molécules anti-oxydantes des LDL. Il a été mis en évidence in vitro que la transformation des macrophages en cellules spumeuses chargées en lipides (qui sont les principaux constituants de la plaque d'athérosclérose) est liée à une modification de nature oxydative des LDL. L'oxydation des LDL est un processus médié par des radicaux libres et initié par la peroxydation des acides gras polyinsaturés après consommation des agents anti-oxydants. L'oxydation des LDL augmente fortement les propriétés athérogènes. Des études épidémiologiques ont montré une relation inverse entre la mortalité cardio-vasculaire et la concentration plasmatique en anti-oxydants (tels que la vitamine E). Par conséquent, les anti-oxydants hydro- et liposolubles peuvent protéger les LDL et retarder ou empêcher leur processus d'oxydation. Dès lors, afin d'estimer l'effet protecteur de la coéluentéramine contre l'athérosclérose, on compare l'oxydation in vitro des LDL en l'absence ou en présence de concentrations variables en coéluentéramine.

L'oxydation des acides gras polyinsaturés des LDL s'accompagne de la formation de diènes conjugués qui présentent une absorbance maximale à 234 nm. Ces diènes conjugués résultent du réarrangement des doubles liaisons d'acides gras polyinsaturés suite à l'abstraction d'un hydrogène malonique. L'augmentation de l'absorption des diènes conjugués peut être directement mesurée en solution sans avoir recours à l'extraction des lipides. On observe successivement une phase de latence pendant laquelle peu de diènes sont produits, une phase de propagation durant laquelle l'absorbance à 234 nm augmente rapidement pour atteindre un plateau et une phase de décomposition où les aldéhydes formés absorbent aussi dans la région de 210-240 nm, produisant ainsi une nouvelle augmentation de l'absorbance à 234 nm. La mesure des diènes conjugués apparaît actuellement comme le meilleur indicateur de l'oxydabilité des LDL lorsque l'on dispose de préparations pures de LDL (Esterbauer et al. (1989)).

En milieu acellulaire, l'oxydation des LDL peut être catalysée par des ions métalliques tels que le cuivre ou déclenchée par un initiateur radicalaire hydrosoluble tel que le 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH).

Pour la mesure des diènes conjugués, une solution de LDL (concentration finale de 50 μ g protéine / ml de tampon PBS, pH 7,4) est incubée en présence de 5 μ M de cuivre ou de 2 μ M d'AAPH et en absence ou en présence de concentrations variables en CLM dans une cuvette en quartz ayant un chemin optique de 1 cm. On mesure en fonction du temps les absorbances à 234 nm des différents échantillons sur un spectrophotomètre UV-visible (DU-8, Beckman). Un blanc est obtenu au moyen d'une solution phosphate sans LDL

mais contenant 5 μM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 2,5 μM de CLM. Les tests sont réalisés à 30° C pour l'oxydation des LDL en présence de cuivre et à 37 °C en présence d'AAPH.

Les résultats indiquent que la CLM exerce une importante action protectrice des LDL vis-à-vis de leur oxydation par l'AAPH ou le cuivre. L'action de la CLM sur l'oxydation des LDL par l'AAPH est illustrée à la figure 2, dans laquelle on observe le ralentissement important de l'apparition des diènes conjugués avec des concentrations croissantes de CLM. Des résultats similaires sont observés lorsque l'oxydation des LDL est réalisée par le cuivre. La figure 3 illustre le retard dans l'apparition des TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), correspondant essentiellement en malonalaldéhyde (MDA), produit de l'oxydation des lipides contenus dans les LDL.

Exemple 4 : action protectrice vis-à-vis de cellules soumises à un stress oxydatif

Des cultures primaires d'hépatocytes ont été soumises à l'action du tert-butyl-hydroperoxyde (t-BHP) et de la nitrofurantoïne (NF). L'action du t-BHP est liée à son pouvoir oxydant direct tandis que l'action de la NF résulte de la production d'anions superoxydes lors de sa métabolisation par le cytochrome P450 des cellules.

La figure 4 illustre la survie d'hépatocytes soumis à l'action de la NF 3 10^{-4} M pendant 6 heures. Au terme de ce traitement, la survie (estimée par la méthode MTT) était de 18% chez les groupes contrôles. Lorsque la CLM est additionnée au milieu de culture, la survie des hépatocytes augmente régulièrement pour atteindre 70% des contrôles à 5 10^{-5} M CLM.

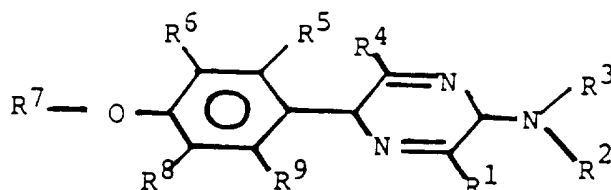
La figure 5 illustre l'accroissement de la résistance de fibroblastes sujets à l'action du t-BHP par la CLM 10^{-5} M. Dans ce cas, on observe un déplacement significatif de la courbe de cytotoxicité (mesurée par test 5 MTT) du t-BHP vers de plus fortes concentrations en présence de CLM.

Des résultats similaires sont observés chez les hépatocytes traités par le t-BHP. La figure 6 illustre la réduction de la libération de lactate déshydrogénase 10 (LDH), indicatrice d'une cytotoxicité, par les cellules lorsque la CLM (10 et 50 μ M) est additionnée au milieu de culture. La mortalité, qui est de 75% chez les contrôles, n'atteint plus que quelques % en présence de CLM 50 μ M.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire comprenant un dérivé de pyrazine de formule

5



caractérisée en ce que les radicaux R^1 à R^9 sont H, des radicaux choisis parmi le groupe constitué par alkyle, alkényle, alkynyle, aryle, arylalkyle, alkylaryle, hétéroaryle, hétéroalkyle et hétéro-(alkylaryle et arylalkyle), éventuellement substitués, ou des chaînes de formule $(R^5 \times R^6)_n$, où $n \geq 1$, x représente un ou plusieurs hétéro-atomes et R^5 et R^6 sont des radicaux choisis parmi le groupe constitué par alkyle, alkényle, alkynyle, aryle, arylalkyle, alkylaryle, hétéroaryle, hétéroalkyle et hétéro-(alkylaryle et arylalkyle), éventuellement substitués.

2. Composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire selon la revendication 1, caractérisée en ce que les radicaux R^2 à R^9 sont H et que le radical R^1 est un radical de formule $-\text{CH}_3$ 

3. Utilisation de la composition pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire selon la revendication 1 ou 2, pour la fixation d'agents pro-oxydants.

4. Utilisation de la composition pharmaceutique selon la revendication 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des pathologies liées à l'action des agents

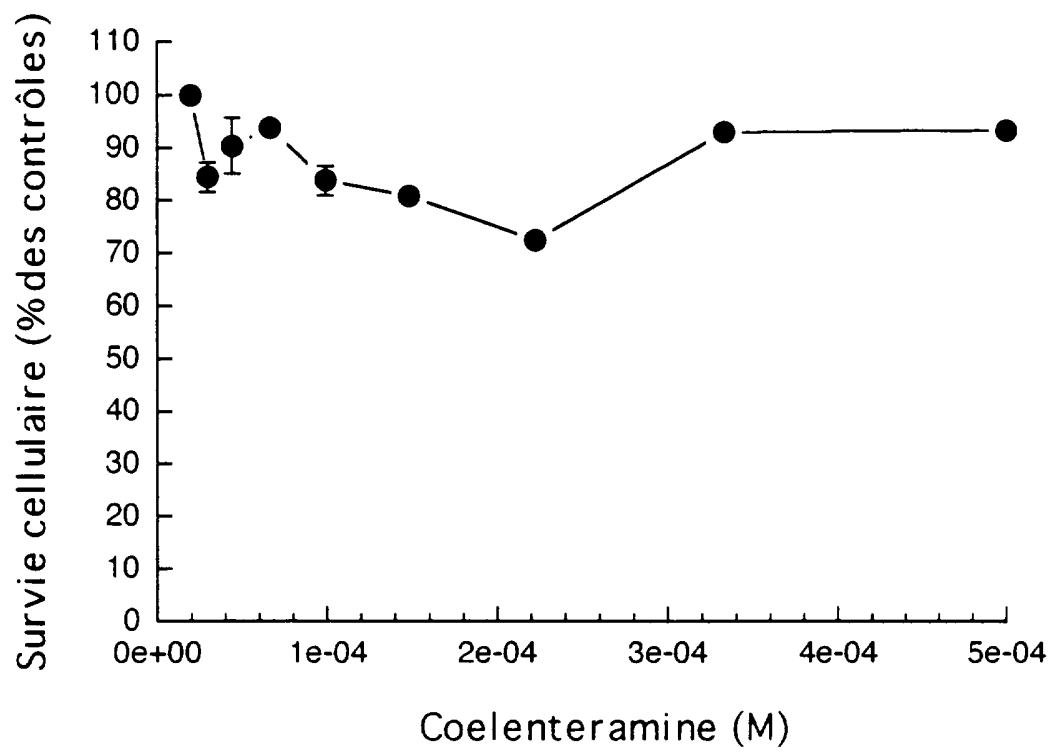
pro-oxydants.

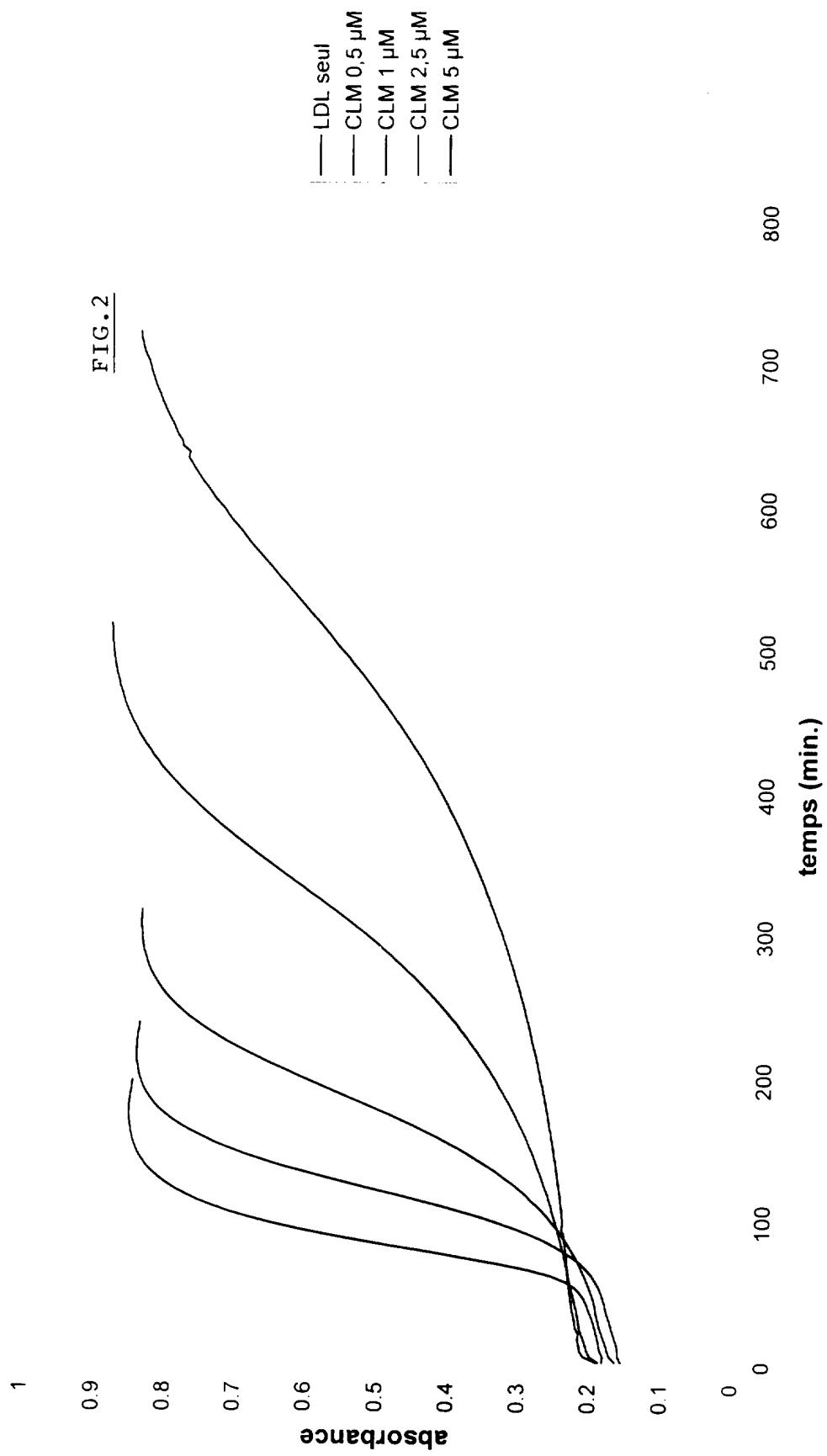
5. Utilisation de la composition pharmaceutique selon la revendication 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou
5 au traitement des pathologies inflammatoires.

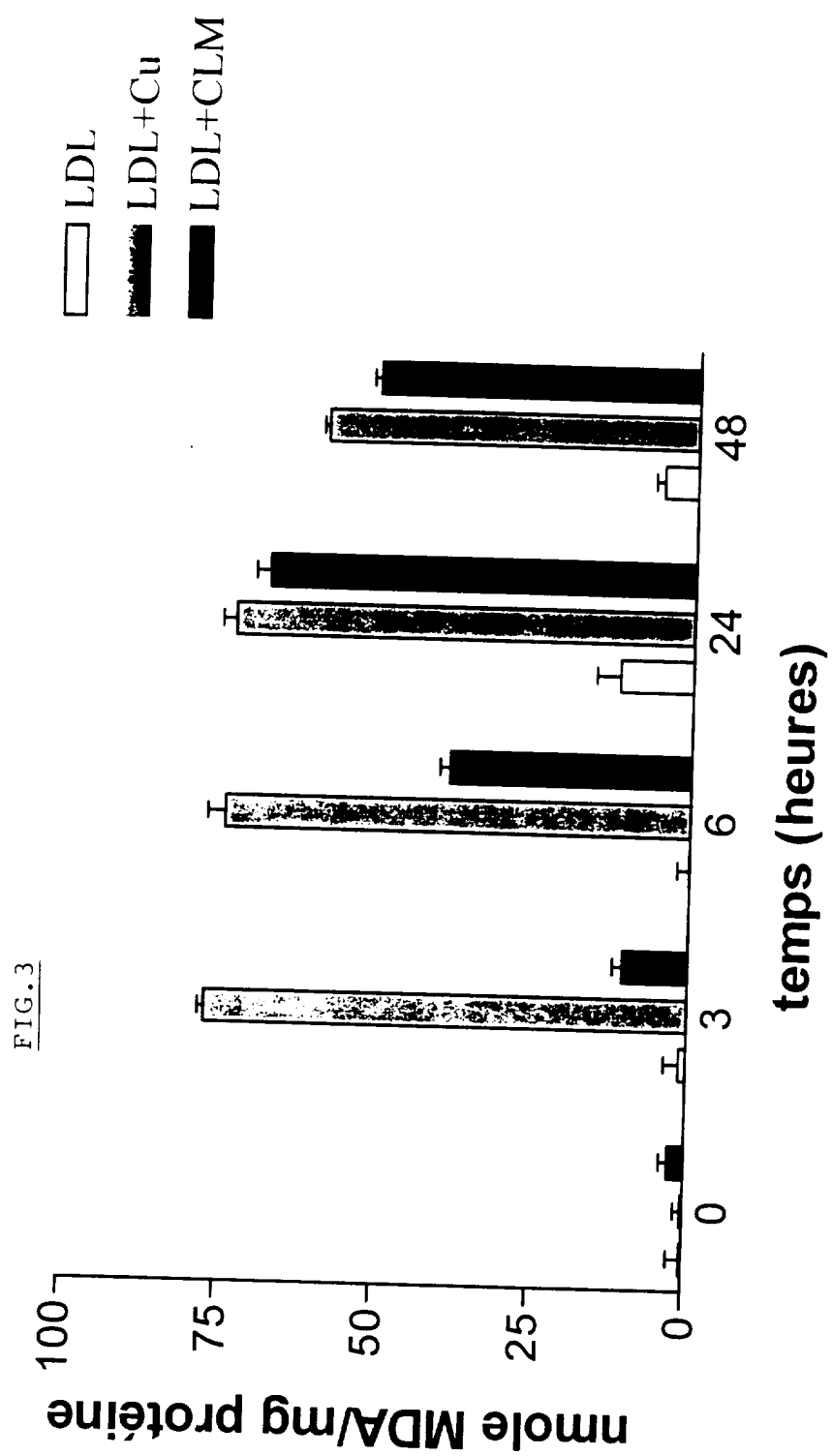
6. Utilisation de la composition pharmaceutique selon la revendication 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des pathologies cancérigènes.

10 7. Utilisation de la composition pharmaceutique selon la revendication 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement de l'athérosclérose.

8. Utilisation de la composition
15 pharmaceutique selon la revendication 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des tumeurs cancéreuses.

FIG.1





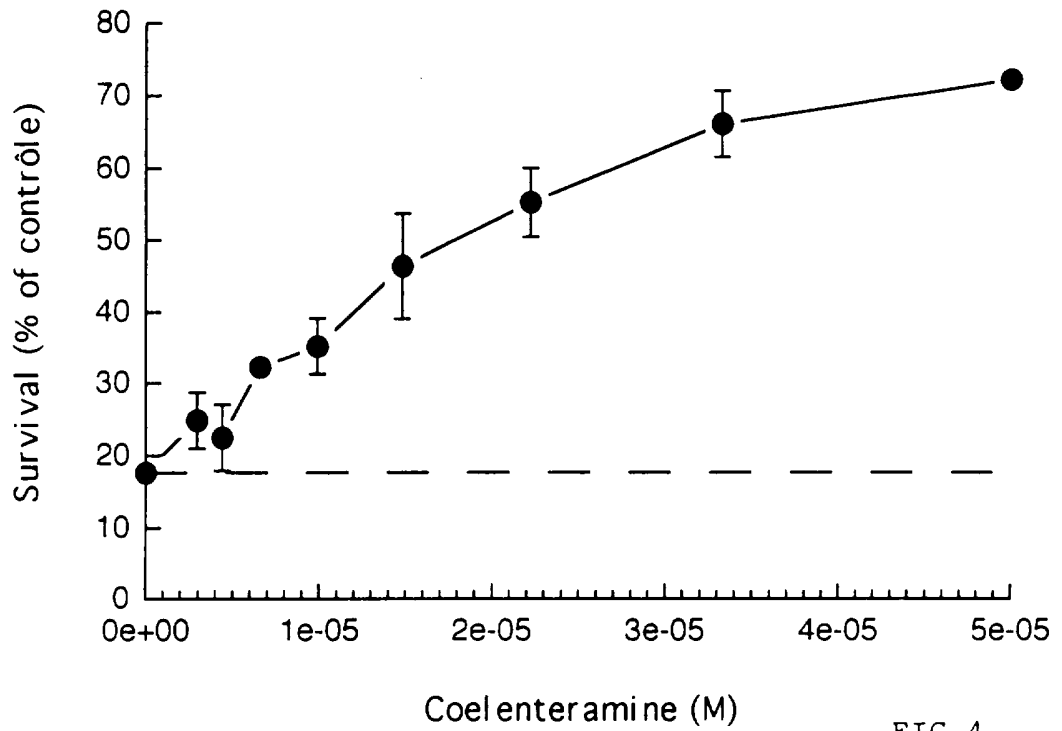


FIG.4

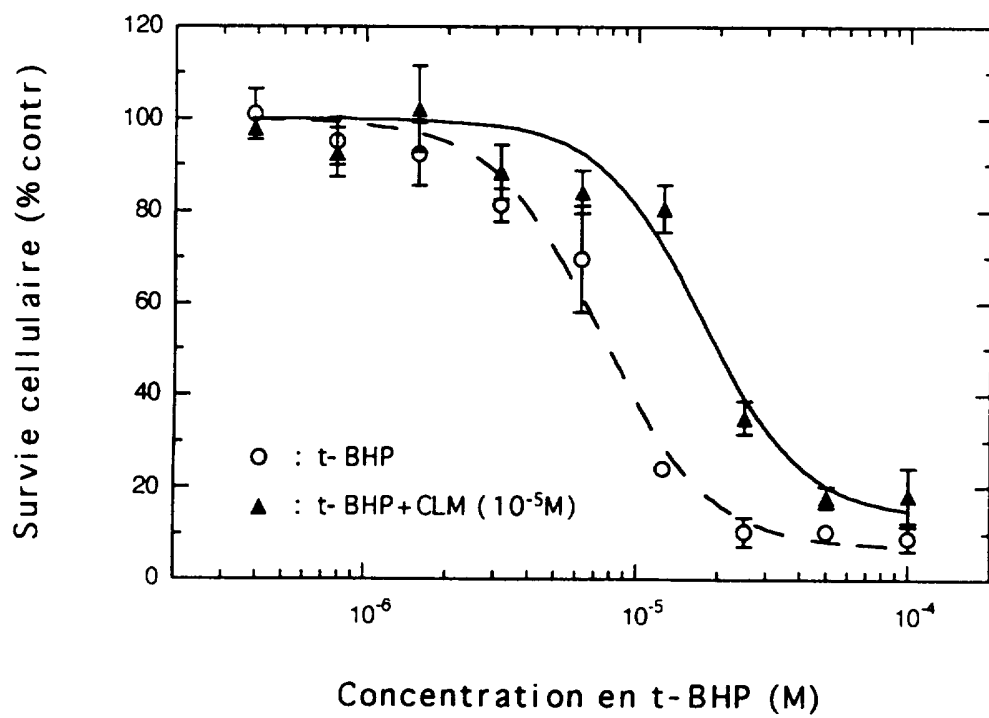
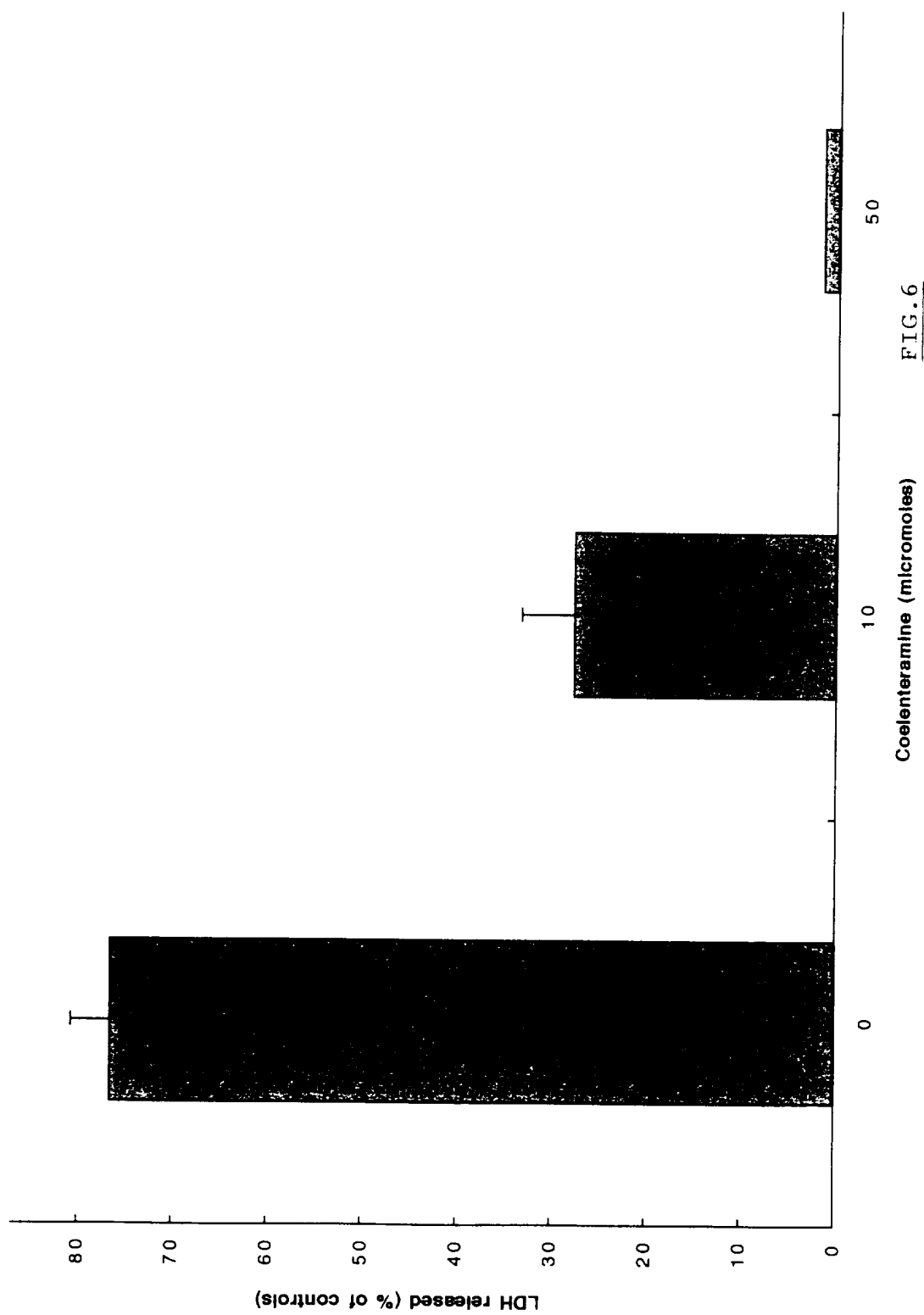


FIG.5





Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BO 6666
BE 9700294

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
A	WO 96 28160 A (UNIV LOUVAIN ; REES JEAN FRANCOIS (BE)) * le document en entier *	1-8	A61K31/495
A	NAKONA M.: "Determination of Superoxide Radical and Singlet Oxygen Based on Chemiluminescence of Luciferin Analogs." METHODS ENZYMOLOGY, vol. 186, 1990, pages 585-592, XP002045627 * le document en entier *	1-3,5	
A	LUCAS ET AL.: "Coelenterazine Is a Superoxide Anion-Sensitive Chemiluminescent Probe: Its Usefulness in the Assay of Respiratory Burst in Neutrophils" ANAL. BIOCHEM., vol. 206, 1992, pages 273-277, XP002045628 * le document en entier *	1-4	
A	INOUE ET AL.: "A new synthesis of Watasenia pre-luciferin by cyclisation of 2-amino-3-benzyl-5-(p-hydroxyphenyl)pyrazine with p-hydroxyphenylpyruvic acid." CHEM. LETT., vol. 3, 1980, POC038, pages 299-300, XP002045630 * le document en entier *	1,2	A61K
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
10 novembre 1997		A. Jakobs	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

BO 6666
BE 9700294

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9628160 A	19-09-96	BE 1009196 A	03-12-96
