

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 13.10.89.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 19.04.91 Bulletin 91/16.

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) : *MEDAFOR société anonyme — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *Borg Jacques.*

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : *SC Gutmann Ernest Plasseraud Yves.*

⑤4 Dérivés des alcools gras à longue chaîne, leurs applications, notamment en tant que molécules cytotrophiques et cytoprotectrices, et compositions pharmaceutiques les contenant.

⑤7 L'invention a pour objet des dérivés des alcools gras à longue chaîne ainsi que leurs modes d'obtention.

Elle concerne également des compositions pharmaceutiques contenant des dérivés et leurs utilisations notamment pour le traitement ou la prévention des maladies neurodégénératives, des phénomènes liés au vieillissement de la peau, des phénomènes de thrombose et d'athérosclérose, des déficits immunitaires.

FR 2 653 117 - A1



5

La présente invention concerne des dérivés des alcools gras à longue chaîne hydrocarbonée, ainsi que des compositions pharmaceutiques comprenant ces dérivés, et l'utilisation de ces dernières, notamment en tant que médicaments cytotrophiques et cytoprotecteurs.

Il est généralement admis que le tissu nerveux des mammifères adultes ne se régénère pas à la suite d'une lésion. Cette absence de régénérescence peut être due soit à un défaut de signaux capables d'induire la régénérescence, soit à une lésion irréversible qui a conduit à la mort neuronale (A.J. AGUAYO, in : A. BIGNAMI, F.E. BLOOM, C.L. BOLIS et A. ADELOYE eds, CNS Plasticity and Repair, Raven Press (N.Y.) (1985) pp 31-40). Cependant, on peut éviter la mort neuronale en protégeant le tissu nerveux des conséquences de l'ischémie ou en lui fournissant un micro-environnement favorable, en particulier des composés neurotrophiques ou neuroprotecteurs ; ces composés pourraient également favoriser la régénérescence du tissu nerveux s'ils sont administrés avant que la mort ne soit intervenue.

Les facteurs neurotrophiques sont des agents capables de favoriser la survie des neurones et de stimuler la différenciation neuronale (J.R. PEREZ-POLO, in J.E. BOTTENSTEIN et G. SATO eds, Cell Culture in the neurosciences, Plenum Publishing Corp. (1985) pp

35

95-123). L'activation du métabolisme cellulaire peut avoir pour conséquence la formation d'un réseau de neurites orienté vers la cible à innerver. La mise en évidence de facteurs neurotrophiques peut se faire in vitro à l'aide de cultures de cellules nerveuses. (G. BARBIN, I. SELAK, M. MANTHORPE, et S. VARON ; NEUROSCIENCE 12 : 33-43 (1984)). Des cultures de cellules dissociées de diverses régions du système nerveux central (SNC) ont permis de montrer l'effet de ces facteurs neurotrophiques sur la survie des neurones et sur leur maturation.

Par ailleurs, la lésion expérimentale du septum médian chez le rat entraîne une perte importante de neurones cholinergiques (D. M. ARMSTRONG et al, COMP. NEUROL. 264 : 421-436 (1987) ; F.H. GAGE et al, BRAIN RES. 268 : 27-37 (1983)). Certaines maladies, comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, la chorée de Huntington ou la sclérose latérale amyotrophique sont la conséquence de la disparition progressive de certains neurones (J.T. COYLE et al, SCIENCE, 219 : 1184-1190 (1983) ; J.B. MARTIN, NEUROLOGY 34 : 1059-1072 (1984) ; M.D. YAHR et K.J. BREGMANN, NEUROLOGY vol., Raven Press (N.Y.) (1985)). Certaines études ont suggéré que cette perte de neurones pouvait être évitée par l'administration par voie intracérébroventriculaire de facteurs neurotrophiques comme le NGF (Nerve Growth Factor) ou le FGF (Fibroblast Growth Factor) (L.F. KROMER, Science 235 : 214-216 (1987) ; K.J. ANDERSON et al, Nature 332-360-361 (1988) ; T. HAGG et al, Exp. Neurol. 101 : 303-312 (1988)).

La mort neuronale pourrait également être liée à la présence de composés neurotoxiques. Certains acides aminés excitateurs ont une action excitotoxique sur les neurones ; quand on les injecte dans le cerveau de rats, ils provoquent une dégénérescence de certaines zones (J.T. COYLE et R. SCHWARCZ, in : Handbook of Chemical Neuroanatomy, Elsevier, Amsterdam (1983) pp 508-527). Ce phénomène est proche de celui de la dégénérescence neuronale observée dans la zone de l'hippocampe chez l'homme et qui est appelée sclérose de la corne d'Ammon (Meldrum, Clin. Sci. 68 : 112-113 (1985)). On peut reproduire ce type de lésion par des injections intracérébrales de composés excitotoxiques, comme l'acide iboténique. Il a été suggéré que la perte de neurones hippocampiques qu'on observe dans la maladie d'Alzheimer, et à la suite d'une ischémie cérébrale, pourrait être liée à la forte densité de récepteurs au glutamate présente sur ces neurones (S.M. ROTHMANN et J.W. OLNEY, Ann. Neurol. ; 19 : 105-111 (1986)). Les acides aminés neurotoxiques peuvent aussi induire des lésions à distance par l'intermédiaire des projections glutamatergiques et qui ressemblent aux lésions observées dans l'épilepsie (J.V. NADLER et al, Nature 271 : 676-677 (1978) et la chorée de Huntington (J.T. COYLE et R. SCHWARCZ, Nature 263 : 244-246 (1976)). Les excitotoxines pourraient aussi intervenir dans la genèse des lésions ischémiques ; l'ischémie augmente la concentration extra-cellulaire en acides aminés excitateurs provoquant une hyperstimulation, un gonflement neuronal, puis une lyse cellulaire (Meldrum, Adv. Neurol.; 44 : 849-855 (1986) ; S.M. ROTHMANN et

J.W. OLNEY, Ann. Neurol. 19 : 105-111 (1986)). De même au cours de l'épilepsie une libération accrue de neurotransmetteur pourrait produire des lésions neurodégénératives du même type (Y. BENARI, Neuroscience 14 : 375-403 (1985)).

Les inventeurs ont démontré que l'alcool gras à longue chaîne, le n-hexacosanol, possède des activités neurotrophiques et neuroprotectrices in vitro. Cet alcool gras à longue chaîne a été isolé de la plante tropicale, Hygrophila erecta, Hochr. (Acanthacées) (Borg et al, Neuroscience Lett. 213 : 406-410 (1987)). Si on l'ajoute à une concentration de 500 nM à des neurones de rat foetaux en culture, il augmente la croissance neuritique par un facteur de 4 à 6 ainsi que le nombre de collatérales, en particulier pour les neurones multipolaires. Ce composé augmente également de façon importante la différenciation biochimique des neurones en culture : il augmente le taux de protéines et double les activités spécifiques de deux enzymes neuronales, la glutaminase activée par le phosphate et l'énolase neurospécifique, de 32 et 78 % respectivement.

Cependant, les résultats de l'étude in vitro des propriétés du n-hexacosanol ne permettent pas de juger de son éventuelle activité in vivo, compte tenu des différences existant entre les conditions d'environnement in vitro et in vivo.

Par ailleurs, le n-hexacosanol administré par voie périphérique atténue de façon significative dans le cerveau la dégénérescence neuronale après axotomie. Il réduit également de façon importante la perte de

neurones consécutive à une injection de neurotoxines dans le cerveau. Cet effet confirme les propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices du n-hexacosanol.

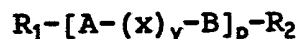
5 L'invention a pour objet des dérivés d'alcools gras à longue chaîne, issus de composés terpéniques, présentant de puissantes propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices in vitro et in vivo sur divers

10 tissus nerveux.
Ces dérivés sont capables de traverser la barrière hématoencéphalique et ont une biodisponibilité bien supérieure aux autres facteurs neurotrophiques actuellement connus.

15 De manière avantageuse, les dérivés de l'invention atteignent des cibles cellulaires spécifiques, ce qui en fait des outils thérapeutiques de première importance.

20 L'invention a également pour objet des dérivés d'alcools gras à longue chaîne présentant des propriétés cytotrophiques et cytoprotectrices à l'égard d'une grande diversité de cellules de l'organisme.

L'invention concerne des dérivés d'alcools gras répondant à la formule générale suivante :



25 dans laquelle

- p est égal à 1 ou 2,

- R₁ et R₂, identiques ou différents, représentent :

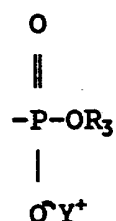
. un atome d'hydrogène,

30 . un atome d'halogène, notamment un atome de fluor,

35

. un groupe -OR, dans lequel R représente un atome d'hydrogène ou un dérivé de l'acide monophosphorique de formule :

5

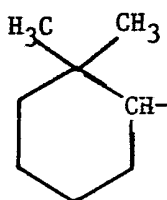


10

dans laquelle R_3 représente un atome d'hydrogène, un atome d'halogène, notamment de fluor, un nucléotide, du glucose, du galactose, un acide aminé ou un peptide ou une protéine, et Y représente un ion métallique, de préférence Na^+ , K^+ , NH_4^+ ,

15

. un groupe de formule :



20

le cas échéant substitué par un, ou plusieurs, atome d'halogène, notamment de fluor, ou un, ou plusieurs, groupe $-\text{CH}_3$, et/ou $-\text{OH}$ et/ou $-\text{OR}$, R étant tel que défini ci-dessus, et/ou un groupe oxy (représenté par la formule $= \text{O}$),

25

- $y = 0$ ou 1 ,

- $\text{A}-(\text{X})_y-\text{B}$ est une chaîne hydrocarbonée comprenant de 20 à 28 atomes de carbone dans laquelle A et B, respectivement identiques ou différents sont des chaînes aliphatiques saturées ou non, le cas échéant substituée

30

par un, ou plusieurs atomes d'halogène, notamment de fluor, ou par un, ou plusieurs groupes alcoyles de 1 à 3 atomes de carbone, et X est également une séquence

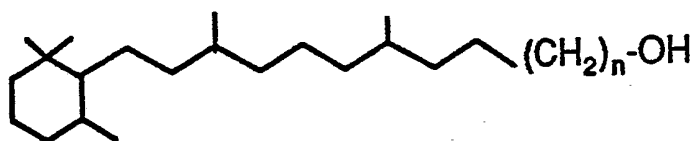
35

lesdits dérivés comportant au moins un groupe -OR, R ayant la signification indiquée ci-dessus.

- l'uracile, la cytosine, la guanine, l'adénosine ou la thymine, lorsqu'il s'agit d'un nucléotide,

Les dérivés fluorés de l'invention sont particulièrement avantageux notamment sur le plan de la biodisponibilité et de la stabilité chimique.

Une catégorie de dérivés préférés de l'invention est représentée par les analogues saturés et insaturés de la vitamine A (ou rétinol) répondant à la formule suivante :

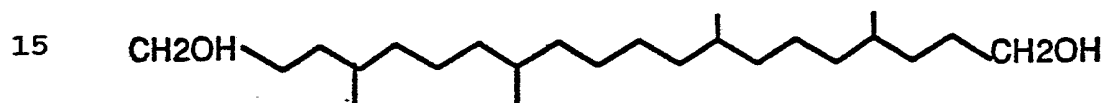


30

35

comportant, le cas échéant, 1 à 10, et de préférence 1 à 5 double(s) liaison(s), et dans laquelle n est un nombre entier variant de 1 à 10. Les poids moléculaires des analogues saturés et insaturés de la vitamine A de l'invention sont de l'ordre de 280 à 447.

Une autre catégorie particulièrement avantageuse de dérivés de l'invention est représentée par les homologues du squalène (composé terpénique de 30 atomes de carbone) répondant aux formules suivantes :



comportant respectivement, le cas échéant, 1 à 10 et 1 à 9 double(s) liaison(s), et de préférence 1 à 5 doubles(s) liaison(s). Les poids moléculaires des homologues du squalène selon l'invention sont de l'ordre de 361 à 395.

Les dérivés plus ou moins saturés du géranylgéraniol (C25) et du géraniol (C20) représentent des dérivés préférés de l'invention. Parmi ceux-ci, on distinguera ceux répondant aux formules suivantes :

9



5

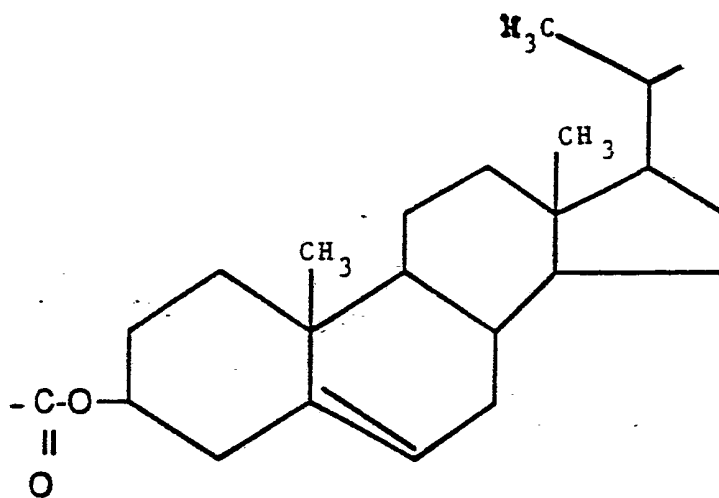


10

comportant respectivement, le cas échéant, 1 à 5 et 1 à 4 double(s) liaison(s). Les poids moléculaires de ces dérivés selon l'invention sont de l'ordre de 240 à 368.

15

Des dérivés particulièrement préférés de l'invention sont tels que $y = 1$ et X représente le groupe de formule :



20

25

30

35

Les esters du cholestérol de formule :

l'invention. Les poids moléculaires des dérivés du cholestérol selon l'invention sont de l'ordre de 445 à 643.

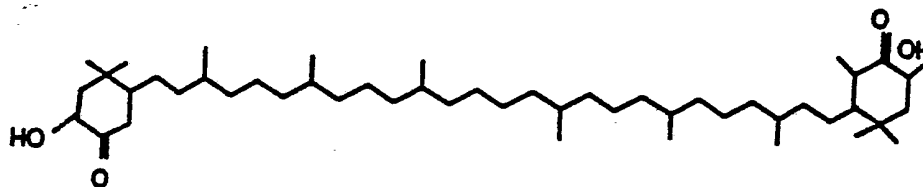
5 Les terpènes étant par définition des polymères de l'isoprène, structure à 5 atomes de carbone, le cholestérol fait également partie des terpènes dans la mesure où son précurseur, le lanostérol est un triterpène. La présence des cycles du cholestérol
10 augmente la rigidité des dérivés de l'invention, ce qui leur confère une meilleure intégration dans la membrane cellulaire.

L'invention concerne plus particulièrement encore les dérivés dimériques répondant à la formule générale
15 des dérivés de l'invention dans laquelle $p = 2$.

Ces dérivés dimériques possèdent une taille leur permettant de traverser de part et d'autre la membrane cellulaire, modifiant ainsi les propriétés physico-chimiques de cette membrane, ce qui leur confère une
20 particulièrement bonne activité.

Les dimères de l'invention comportent 1 à 20, de préférence 1 à 10, double(s) liaison(s).

Parmi ces dérivés, on citera notamment ceux de formule :



30 comportant, le cas échéant, 1 à 14 double(s) liaison(s), de préférence 1 à 7 double(s) liaison(s).

35

Les poids moléculaires des composés dimériques selon l'invention sont de l'ordre de 572 à 914.

Les dérivés de la présente invention sont obtenus à partir de composés terpéniques, ou de structure cyclique dérivant des terpènes, d'origine synthétique ou naturelle, ayant subi :

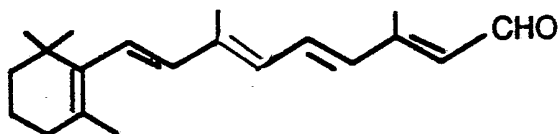
- soit une ozonisation partielle, à l'aide de l'ozone, ce qui a pour effet de réduire la longueur de la chaîne hydrocarbonée du composé terpénique

- soit une addition d'une, ou plusieurs, fonction(s) - OH sur l'une ou les deux extrémités de ces composés terpéniques, notamment selon la méthode de Wittig à l'aide d'un diol ou d'un acide alcool (qui sera plus particulièrement développée dans la description détaillée qui suit),

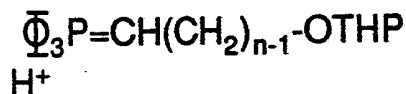
- soit une hydrogénation totale ou partielle,

- soit une combinaison de plusieurs des opérations sus-mentionnées.

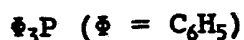
Les dérivés saturés et insaturés de la vitamine A selon l'invention sont obtenus, notamment en couplant, par la réaction de Wittig, le rétinol de formule :



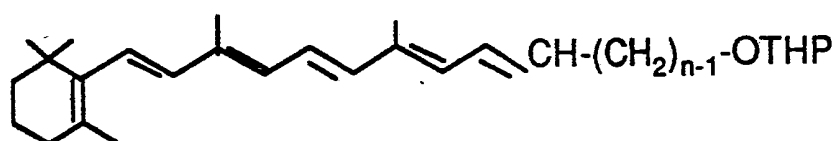
avec un ylure de dérivé de bromure de tetrahydropyranne (bromure-THP) de formule :



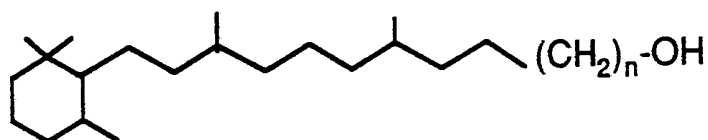
dans laquelle n est un nombre entier variant de 1 à 10,
ce dernier composé étant lui-même obtenu par action
d'un sel de bromure de tetrahydropyranne de formule :
Br-CH₂-(CH₂)_{n-1}-OTHP (THP = tetrahydropyranne)
sur un triphenylphosphine de formule :



L'ylure alors obtenu est mis en contact avec le
rétinal en présence de butyllithium, ce qui conduit à
l'obtention d'un dérivé de formule :



Ce dernier est ensuite hydrogéné pendant une durée
déterminée ce qui conduit au dérivé de formule

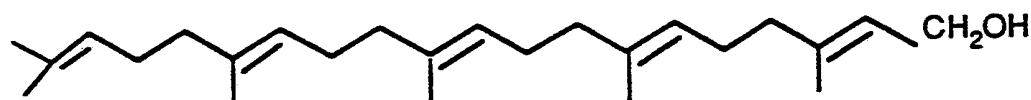


dans lequel n = 1 à 10, totalement saturé ou comportant
1 à 10 double(s) liaison(s) en fonction du temps
d'hydrogénation.

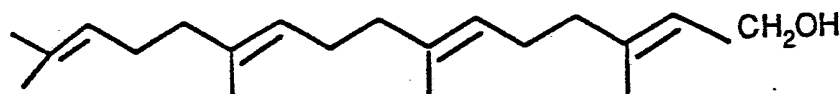
Les dérivés du squalène selon l'invention sont
obtenus de la manière suivante. Le squalène, composé
terpénique de 30 atomes de carbone étant de trop grande
taille pour avoir une bonne activité biologique, les
doubles liaisons terminales de ce dernier sont clivées
par ozonisation partielle, notamment pendant 2 heures.

Puis une fonction hydroxyle est introduite sur l'une ou l'autre, ou sur les deux extrémités du dérivé alors obtenu, notamment selon la méthode de Wittig précédemment décrite. Le dérivé est par la suite hydrogéné pendant un temps déterminé pour conduire à un dérivé final totalement saturé ou comportant 1 à 10 double(s) liaison(s).

Les dérivés du géranylgéraniol et du géraniol sont obtenus, notamment suivant un procédé de synthèse identique à celui des dérivés de la vitamine A susmentionnés, à savoir la méthode de Wittig pour allonger la chaîne et introduire une, ou deux fonctions hydroxyles aux extrémités de ladite chaîne carbonée du géranylgéraniol ou du géraniol dont les formules sont respectivement les suivantes :



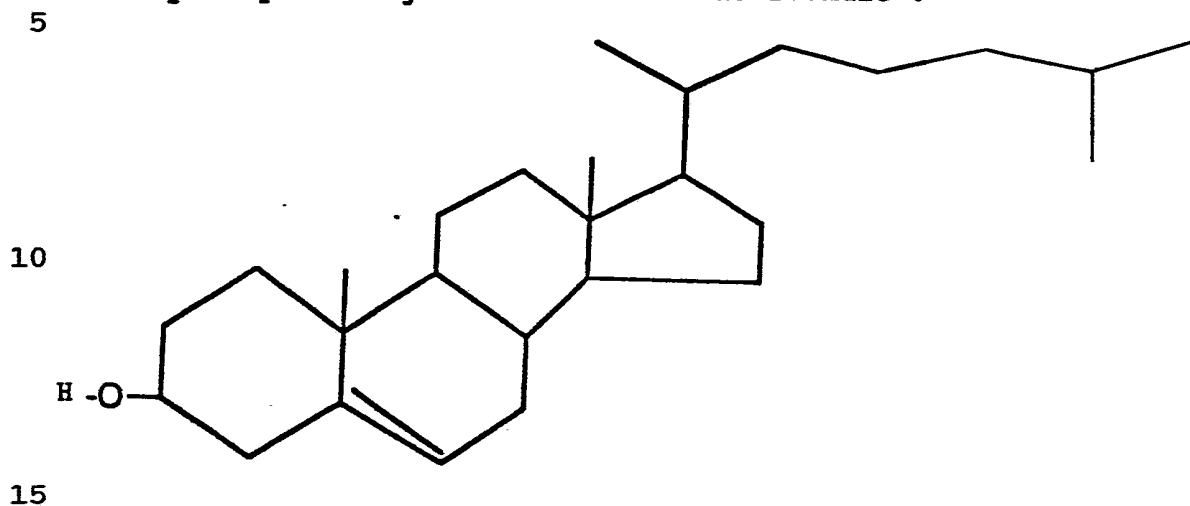
geranylgéraniol



géraniol

suivie d'une hydrogénation permettant d'obtenir des dérivés plus ou moins saturés.

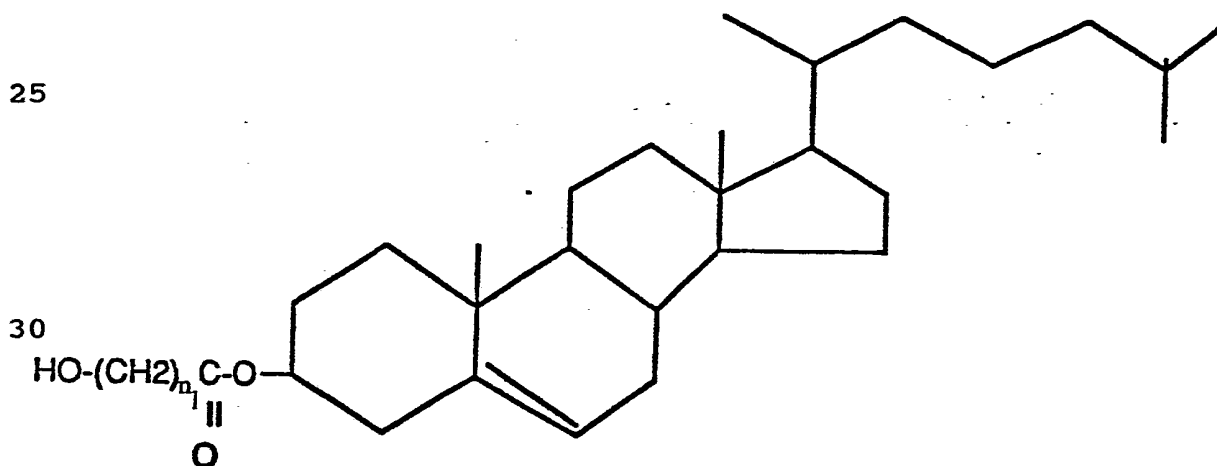
les dérivés du cholestérol de l'invention sont
obtenus par formation d'une liaison ester entre
l'hydroxyle en C₃ du cholestérol de formule :



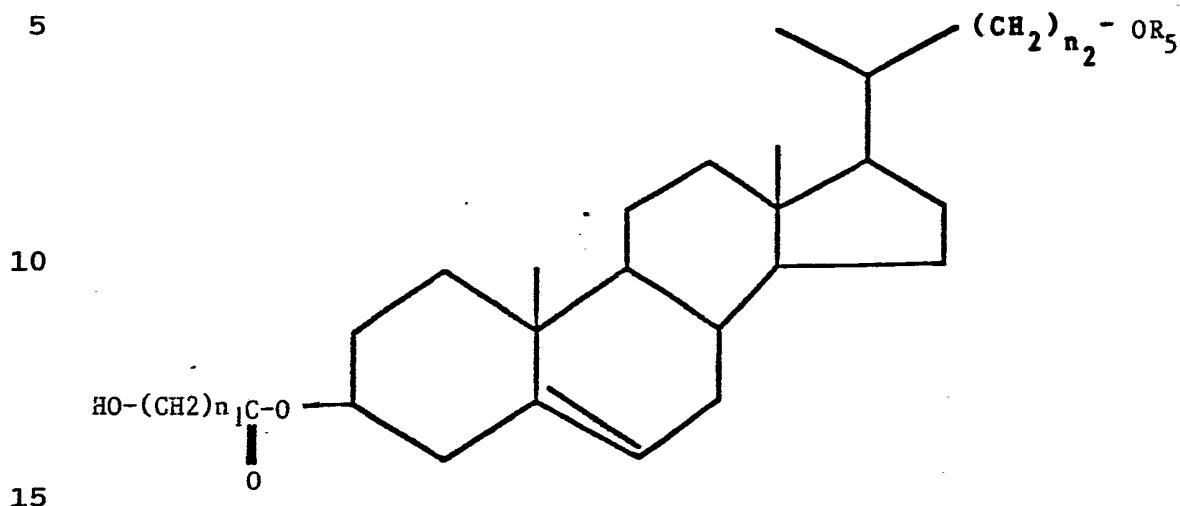
et un alcool-acide de formule $\text{HO}-(\text{CH}_2)_{n_1}-\text{C}-\text{OH}$

20

dans laquelle n_1 a la signification indiquée ci-dessus,
ce qui conduit à l'obtention d'un dérivé du cholestérol
dont la formule est indiquée ci-dessous :



Le dérivé du cholestérol de l'invention de formule:



comportant, le cas échéant, 1 à 14 double(s) liaison(s), et dans laquelle n_1 et n_2 sont des nombres entiers variant de 1 à 15, et R_5 a la signification indiquée ci-dessus,

est obtenu selon la méthode de Wittig précédemment décrite, réalisée à partir de prégnénolone qui comporte une fonction hydroxyle, ou du type $-OR_5$ (R_5 ayant la signification indiquée ci-dessus), en bout de chaîne.

Les composés dimériques de l'invention sont obtenus soit à partir de composés traités de manière identique à celle décrite ci-dessus pour les monomères de l'invention (par exemple des caroténoïdes naturels de sources diverses, ou synthétiques, contenant 40 à 60 atomes de carbone, et qui sont linéaires, ou possèdent un cycle dans leur structure), soit par couplage de

deux unités monomères, notamment par hydrogénation sur Pd/C dans l'éthanol.

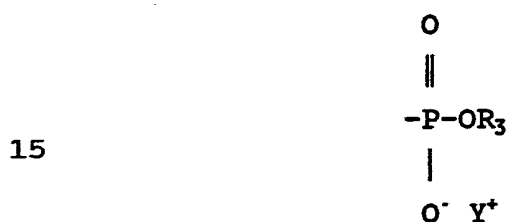
5 Les dérivés d'alcools gras de l'invention
précédemment décrits étant peu solubles en milieu
aqueux, leur emploi pour des études biologiques ou pour
des applications thérapeutiques peuvent présenter des
difficultés méthodologiques. Pour remédier à ces
10 inconvénients, des prodrogues hydrosolubles
représentées par les esters de l'acide monophosphorique
ont été synthétisés. Ces composés sont hydrolysés dans
l'organisme pour donner les produits de départ à savoir
les dérivés de l'invention pour lesquels $R = H$.

15 Ces composés sont particulièrement hydrosolubles
(plus de 10 % dans l'eau selon les cas), donc les
solutions obtenues sont compatibles avec des injections
intraveineuses. Ils améliorent la biodisponibilité des
dérivés de l'invention, ce qui permet de potentialiser
20 les effets biologiques observés. Ainsi la présence du
groupe phosphate a permis d'administrer une solution
aqueuse de corticostéroïdes sans perte de l'activité
biologique (R.J. W. CREMLYN et I. Khattak, Chemistry of
steroid phosphates. Phosphorus 27 (1976) 237-246).

25 Le radical représenté par R_3 permet un meilleur
ciblage du dérivé de l'invention. Il peut favoriser la
pénétration du dérivé à travers des membranes (membrane
bactérienne) ou la diffusion à partir des capillaires
du tractus digestif, de la membrane méningée ou
d'autres tissus (F. IGLESIAS-GUERRA, J.M. NEUMANN et T.
30 HUYNH-DINH, Synthetic 6-glutamatecosyl phospholipid as
a drug transport system/Tetrahedron Lett. 28 (1987)
3581-3584). Ce radical permet également au dérivé de

se fixer sur un récepteur spécifique ; le dérivé agira donc spécifiquement sur les cellules qui présentent un tel récepteur. Un raisonnement similaire a conduit à la
 5 synthèse de dérivés phosphatés de certaines hormones stéroïdes (L. LEBEAU, C. MIOSKOWSKI et P. OUDET, Synthesis of phospholipids linked to steroid hormone derivatives. Chemistry and Physics of Lipids, 46 (1988) 57-62).

10 Les dérivés hydrosolubles de l'invention pour lesquels R représente le groupe



dans lequel R_3 et Y^+ sont tels que définis ci-dessus, sont obtenus par phosphorylation d'un dérivé monomère
 20 ou dimère de l'invention, pour lequel $\text{R} = \text{H}$, avec l'o-phenylènegphosphochloridate, ou avec le bis-phosphochloridate suivie d'une hydrolyse oxydative, notamment par le tétracétate de plomb.

Les conditions opératoires de l'ensemble des
 25 réactions décrites ci-dessus seront plus particulièrement développées dans la description détaillée qui suit :

Les dérivés de l'invention favorisent la
 30 régénérscence nerveuse et ont un effet neuroprotecteur; ils présentent notamment les propriétés suivantes.

35

Ils augmentent l'extension de neurites in vitro et in vivo, et facilitent la réparation à la suite de lésions traumatiques du SNC et du SNP (système nerveux périphérique), en favorisant l'extension de neurites et la formation de nouveaux contacts cellulaires et donc la récupération fonctionnelle. Ils atténuent l'effet de l'ischémie, favorisent la survie neuronale et réduisent la dégénérescence wallérienne après une lésion.

Ils protègent les neurones de la mort cellulaire consécutive à la présence de composés neurotoxiques, comme des métaux lourds ou des composés neuroexcitateurs, comme le glutamate et ses analogues.

Les dérivés de l'invention sont des facteurs cytotrophiques, notamment, pour les cellules de la peau et les cellules endothéliales. Ils favorisent la réparation des lésions de certaines couches cellulaires comme les cellules de la peau ou les cellules de l'endothélium vasculaire. Ces dérivés augmentent la différenciation des cellules du derme, de l'épiderme ou les cellules endothéliales ; ils augmentent la formation de prolongements et le comblement de la lésion par les cellules qui la bordent.

Les dérivés de l'invention ont un effet cytoprotecteur qui s'exerce, notamment, sur les cellules hépatiques, les cellules musculaires striées cardiaques et les cellules glomérulaires rénales. Ils protègent ces cellules contre des lésions chimiques ou liées à une ischémie. Ces dérivés permettent également de protéger le tissu cardiaque contre les conséquences d'une interruption du flux sanguin, en particulier dans les artères coronaires. Les dérivés de l'invention

permettent donc de protéger les cellules hépatiques, rénales et musculaires cardiaques contre leur dégénérescence d'origine chimique ou ischémique.

5

Les dérivés de l'invention présentent également en effet trophique sur les cellules du glomérule rénal. Ils permettent une meilleure synthèse et la sécrétion de facteurs fibrinolytiques, comme les activateurs du plasminogène. Ils favorisent donc la fibrinolyse et empêchent la formation de thrombi, en particulier à la suite de néphropathies aiguës ou chroniques, de glomérulonéphrites ou de coagulation intra-vasculaire.

10

Les dérivés de l'invention ont un effet cytotrophique sur les cellules qui participent aux défenses immunitaires de l'organisme, en particulier les macrophages, les monocytes et les lymphocytes. Ces dérivés favorisent la différenciation des lymphocytes, macrophages et monocytes ; ils augmentent la production des facteurs de l'immunité, favorisent l'acquisition de caractères différenciés et permettent de renforcer les défenses naturelles ou induites de l'immunité.

15

20

Les dérivés de l'invention ont un effet cytotrophique sur les mastocytes et les leucocytes basophiles qui jouent un rôle primordial dans les phénomènes inflammatoires. Ces dérivés favorisent l'acquisition de caractères différenciés de ces cellules, modifient leur réponse à la stimulation par un antigène et par les IgE et diminuent la production consécutive d'histamine. Ils modifient également la réponse des cellules musculaires lisses aux médiateurs de l'inflammation, comme l'histamine, les leucotriènes et les prostaglandines.

25

30

35

Les dérivés de l'invention ont un effet cytotrophique et différenciateur sur des cellules qui participent à la défense de l'organisme contre la néoplasie. Ils augmentent l'activité phagocytaire des macrophages, des lymphocytes et des monocytes et augmentent la sécrétion de facteurs tumoricides, comme le TNF (tumor necrosis factor). Ils ont aussi un effet différenciateur sur des cellules cancéreuses ou précancéreuses, comme les promyélocytes.

Les dérivés de l'invention ont également un effet bactériostatique. Ils empêchent la prolifération bactérienne, en particulier celle des bactéries gram⁺ et des mycoplasmes. Lorsque l'on ajoute les dérivés de l'invention à une culture contenant des bactéries gram⁺, comme par exemple *Streptococcus mutans*, *Clostridium butyricum* ou *Streptococcus sanguis* ou des mycoplasmes comme *Mycoplasma pneumoniae* ou *Mycoplasma gallisepticum*, on observe un ralentissement de leur prolifération que l'on peut mesurer par l'évolution de la turbidité du milieu de culture au cours du temps, ou par une variation de pH du milieu. On note que dans la culture contenant des alcools gras à longue chaîne de l'invention, l'augmentation de la densité optique est nettement ralentie par rapport au milieu témoin, de même que l'acidification du milieu.

Le rôle important de ces composés est conforté par le fait que l'inhibition de leur synthèse dans *Clostridium butyricum* entraîne un ralentissement significatif de la croissance (GILBERTSON et coll., J. Lipid. Res., 19 (1978) 757-762). Par ailleurs, la présence d'alcools gras à longue chaîne de l'invention

dans le milieu est susceptible de permettre l'action bactéricide de certains antibiotiques. Ainsi, la combinaison du tridecanol et de la gentamycine entraîne une inhibition de la croissance de *Streptococcus mutans* (GILBERTSON et coll., Antimicrob. Agents Chemother., 26 (1984) 306-309).

Par ailleurs, les dérivés de l'invention possèdent une action anti-virale qui s'exerce principalement sur les virus à enveloppe comme le virus de l'herpès, VSV (Virus de la Stomatite Vésiculeuse), le virus rabique, les virus de type HIV (virus responsable du SIDA). Le modèle expérimental permettant de démontrer l'activité anti-virale des alcools gras selon l'invention varie selon le virus considéré. Il s'agira de sélectionner les types cellulaires sensibles au virus étudié ; on choisira donc des fibroblastes, des cellules rénales, des érythrocytes ou des cellules nerveuses.

Dans tous les cas, on observe une inhibition de l'effet cytopathogène du virus lorsqu'on ajoute des alcools gras de l'invention au milieu de culture. On mesure cet effet par des critères morphologiques ou biochimiques de dégénérescence cellulaire. On note qu'avec une même dose infectieuse, les cellules en culture sont sensiblement plus résistantes au virus lorsque le milieu contient des alcools gras à longue chaîne de l'invention. L'action anti-virale peut s'exercer soit directement au niveau de la réplication du virus à l'intérieur de la cellule, soit par un mécanisme d'inactivation qui diminue les propriétés infectieuses du virus (SNIPES et coll., Antimicrob. Agents Chemother., 11 (1977) 98-104).

L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques comprenant au moins un des dérivés sus-mentionnés en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, et l'utilisation de ces compositions, notamment, dans les domaines thérapeutiques suivants :

- le traitement ou la prévention de la dégénérescence neuronale, en particulier au cours des maladies neurodégénératives et la perte neuronale liée à des composés chimiques ou à des acides aminés excitateurs, comme l'acide glutamique,

- le traitement ou la prévention des lésions du tissu nerveux chez les mammifères, qu'il s'agisse de lésions traumatiques, de lésions chimiques, de lésions dues à une maladie ou à un déficit congénital,

- le traitement ou la prévention de la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, la chorée de Huntington et autres maladies neurodégénératives, la dégénérescence wallérienne, le vieillissement cérébral et des maladies génétiques comme le syndrome de Down,

- le traitement et la prévention des lésions cérébrales liées à la neurochirurgie (l'administration de ces compositions se faisant concomitamment à la chirurgie).

- la cicatrisation de lésions cutanées, ainsi que le traitement et la prévention des phénomènes liés au vieillissement de la peau,

- la réparation de lésions vasculaires (d'origine traumatique ou chimique), ainsi que le traitement et la prévention des phénomènes de thrombose et d'athérosclérose,

- le traitement et la prévention de la dégénérescence du tissu hépatique, rénal ou cardiaque, en particulier lorsqu'elle est due à des composés chimiques ou médicamenteux toxiques pour ces organes,
 - le traitement et la prévention des ulcères gastriques et duodénaux,
 - le traitement des déficits acquis (tels que le SIDA, les maladies auto-immunes) ou héréditaires de l'immunité,
 - le traitement des processus inflammatoires et allergiques aigus, comme l'asthme, la rhinite allergique, le choc anaphylactique ou l'urticaire,
 - le traitement et la prévention de la néoplasie et de de tumeurs, telles que les tumeurs hépatiques ou celles des os, et la prévention de la propagation de métastases provenant de tumeurs cancéreuses,
 - le traitement et la prévention de toutes les pathologies liées aux bactéries gram⁺ et aux mycoplasmes, en particulier les infections pulmonaires, uro-génitales et buccales,
 - le traitement et la prévention des pathologies liées aux virus à enveloppe, comme l'Herpès, la rage, le SIDA.
- Avantageusement, le traitement des maladies et troubles sus-mentionnés avec les dérivés de l'invention, en tant que composés neurotrophiques et neuroprotecteurs, est réalisé en combinaison avec l'utilisation de greffes de tissu nerveux au niveau de la lésion, en particulier de greffes de tissu foetal ou de placenta.

Cette combinaison permet de favoriser la récupération fonctionnelle ou de protéger le tissu nerveux par divers mécanismes, comme : un effet
5 trophique sur le tissu nerveux ; la libération de neurotransmetteurs ou d'hormones ; ou la réinnervation de certains éléments du tissu nerveux. On peut également associer à cette combinaison de greffes nerveuses et de dérivés de l'invention, des greffes de
10 cellules gliales ou de tissu capable de produire des facteurs neurotrophiques (tels que le facteur de croissance (GF) neuronale, ou le facteur de croissance de fibroblaste (FGF), le facteur de croissance des dérivés des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance
15 insulinique (IGF ou somatomédines).

Les compositions pharmaceutiques sus-mentionnées comprennent de préférence des doses efficaces de dérivés de l'invention qui sont de l'ordre de
20 0,01 mg/kg à 100mg/kg, notamment de 0,5 mg/kg à 10 mg/kg.

Des compositions pharmaceutiques de l'invention comprennent avantageusement une dose unique comprise entre 0,5 mg et 500 mg de dérivé de l'invention, en
25 association avec un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, notamment pour les voies parentérale ou orale.

La concentration optimale de ces molécules varie selon l'importance de la lésion ou la présence d'effets
30 secondaires.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention sont administrées par voie parentérale, notamment par
voie intraveineuse, intramusculaire, intracérébrale ou
35

intrapéritonéale ; elles sont également administrées par voie orale, sublinguale, vaginale ou par des implants ou des pompes.

5 Les préparations parentérales sont préparées par stérilisation à travers un filtre avec des pores de 0,22 μm ; on prépare des flacons de 1 ml bouchés stérilement contenant 100 mg de ces molécules. On peut également utiliser un lyophilisat qui sera reconstitué avant injection intraveineuse.

10 Les compositions de l'invention adaptées pour la voie orale, se présentent avantageusement sous forme de pilules, gélules, suspensions, poudres, émulsions ou capsules.

15 Avantageusement, les compositions pharmaceutiques sus-mentionnées, utilisées dans le domaine de la neuroprotection, comprennent au moins un dérivé de l'invention en association avec d'autres facteurs neurotrophiques ou neuroprotecteurs, comme le NGF le FGF, les somatomédines, les benzodiazépines, les antagonistes des récepteurs kappa, les bloqueurs du canal calcium et des antagonistes des récepteurs des acides aminés excitateurs.

20 Des compositions pharmaceutiques particulièrement avantageuses dans le cadre de greffes cellulaires, notamment de greffes de cellules nerveuses, comprennent un, ou plusieurs dérivés de l'invention en association avec des cellules ayant les propriétés de celles originellement contenues dans la, ou les, partie(s) lésée(s) où la greffe doit être effectuée. A titre d'exemple, de telles compositions pharmaceutiques, selon l'invention, se présentent sous forme de

préparations injectables comprenant une quantité déterminée d'un ou plusieurs des dérivés de l'invention en association avec des cellules provenant du septum ou de l'hippocampe (ces cellules étant prélevées sur un autre organisme que celui recevant la greffe).

Dans le cadre de l'utilisation bactériostatique, des compositions pharmaceutiques particulièrement avantageuses, comprennent un, ou plusieurs dérivés de l'invention en association avec un, ou plusieurs antibiotiques.

L'ensemble des compositions pharmaceutiques de l'invention est destinée au traitement et/ou à la prévention des pathologies décrites ci-dessus chez les mammifères.

L'invention a également pour objet des milieux de culture comprenant au moins un des composés de l'invention en association avec des produits appropriés pour la culture de cellules. Ces milieux de culture sont plus particulièrement destinés à la culture de cellules telles que les cellules humaines ou animales provenant de tissu dissocié embryonnaire d'animal nouveau-né, adulte ou âgé. Les dérivés de l'invention favorisent la survie et la différenciation de ces tissus in vitro. A titre d'exemples de cellules susceptibles d'être mises en culture dans les milieux de l'invention, on peut citer : les cellules nerveuses, les macrophages, les hépatocytes, les cellules rénales, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les lymphocytes et les cellules de la moelle osseuse. Ces cellules peuvent être administrées à un patient dans un but thérapeutique, éventuellement après avoir subi un

traitement in vitro avec un ou plusieurs dérivés de l'invention dans les milieux de culture sus-mentionnés.

5 A ce titre, l'invention vise également des compositions pharmaceutiques comprenant des cellules telles qu'indiquées ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, issues d'une culture de cellules selon l'invention, ces cellules étant de préférence exemptes des autres constituants de ces milieux de culture.

10 A titre illustratif, des exemples de milieux de culture de l'invention sont plus particulièrement décrits dans la description détaillée qui suit.

15 D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit d'exemples de synthèse et des propriétés biologiques des dérivés de l'invention. Il va de soi que ces exemples ne revêtent aucun caractère limitatif.

20 I EXEMPLES DE SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS DE L'INVENTION

1) Dérivés saturés et insaturés de la vitamine A

Réaction

a) Préparation du sel de bromure de phosphonium

25 Pour éviter des réactions secondaires, les bromures d'alcool primaire de longueur de chaîne convenable $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$ sont traités par le 4 méthoxy-3-4 dihydropyrane afin de protéger l'hydroxyle primaire.

30 Le sel de bromure de phosphonium est préparé par l'addition de 0.4 moles de triphenylphosphine dans une solution de 0.4 moles de bromure de méthoxytetrahydropyrane dans 100 ml de toluène.

La solution est ensuite chauffée à 60°C pendant 1 nuit. Le sel de bromure de phosphonium précipite au cours du refroidissement, il est filtré et lavé avec 100 ml de toluène.

b) Réaction de Wittig

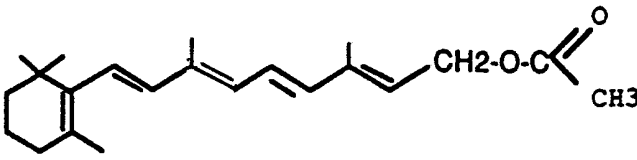
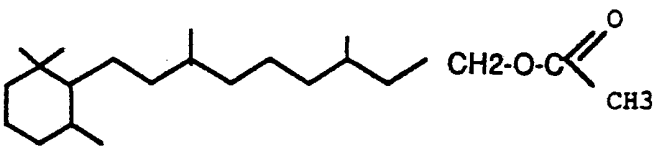
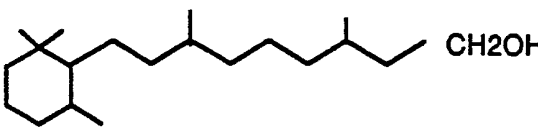
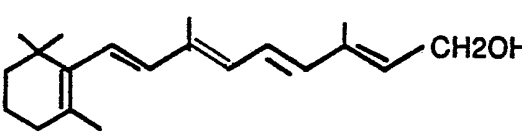
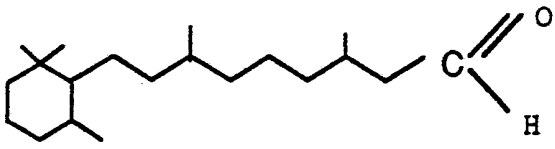
A une suspension de 2 mmoles de sel de bromure de phosphonium obtenu de la manière indiquée ci-dessus, dans 9 ml d'hexane anhydre, on ajoute goutte à goutte 0,8 ml (1,26 mmoles) de n-butyllithium (hexane); on laisse réagir à la température ambiante pendant 1 nuit.

On ajoute ensuite goutte à goutte 0,6 mmoles de rétinol dissous dans 2 ml d'hexane. Après 1 heure de réaction, on refroidit avec un bain de glace et on filtre pour enlever le triphénylphosphate formé. Après évaporation on obtient l'oléfine formée avec un rendement de 80 %.

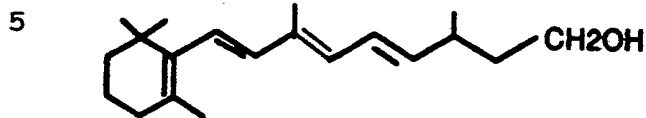
L'oléfine (0,5 mmoles) dissous dans 30 ml de méthanol est hydrogénée en présence de 50 mg de Palladium sur charbon (Pd/c) à 5 %. On obtient quantitativement le produit désiré lié au méthoxytetrahydropyrane. Le groupe protecteur est éliminé par un simple traitement avec une solution de HCl à 0,1 N.

Le nombre de liaisons hydrogénées est déterminé par la durée de la réaction. On peut également protéger certaines double-liaisons que l'on ne désire pas saturer, notamment par la méthode de protection au dibromure.

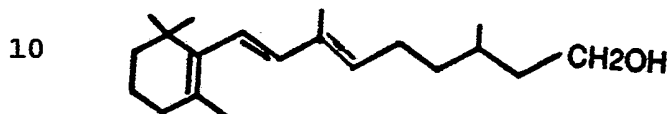
Des dérivés de la vitamine A ainsi synthétisés présentent les caractéristiques analytiques suivantes :

	<u>Produit</u>	<u>PM</u>	<u>Rf</u>	<u>solvants d'élution</u>
5				
				
10	n° 1	330	0,42	(TEA, Et ₂ O, Hexane) (1, 10, 90)
15				
				
	N° 2	340	0,547	(" " ") (" ")
20				
				
	n° 3	298	0,573	(TEA, Et ₂ O, Hexane) (1, 60, 40)
25				
				
	n° 4	288	0,28	(TEA, Et ₂ O, Hexane) (1, 60, 40)
30				
				
	n° 5	296	0,8	(TEA, Et ₂ O, Hexane) (1, 50, 50)
35	TEA : triéthylamine			

Les deux dérivés hydrogénés de la molécule n°4 définie ci-dessus, répondent aux formules suivantes :



PM 290



PM 292

sont des dérivés particulièrement actifs dans le cadre de la présente invention, notamment dans le test décrit dans l'exemple 1 (effet trophique sur des neurones in vitro du Chapitre 2) qui suit)

2) Dérivés du squalène

Réaction : Ozonisation du squalène

20 Une solution de 4 mmoles de squalène dans 100 ml de CH_2Cl_2 et 1 ml de pyridine est traitée par O_3 à -70°C pendant 2 heures. Après addition de 1 ml de $(\text{CH}_3)_2\text{S}$, le mélange de réaction est laissé réagir pendant 1 heure à -70°C puis 1 heure à 0°C puis est
25 extrait avec CHCl_3 . Après l'évaporation du solvant, le résidu est chromatographié sur SiO_2 . On obtient en particulier deux produits d'activité biologique désiré: il s'agit d'un alcool à 27 atomes de carbone et un diol à 24 atomes de carbone.

30 3) Dérivé hydrogéné du géraniol (C20)

Le dérivé de formule $\text{C}_{15}\text{H}_{31}-\text{CH}_2\text{OH}$ a été préparé par hydrogénation du géraniol.

Ses caractéristiques analytiques sont les suivantes :

- 5 PM = 242,
Rf = 0,454 dans le solvant d'élution, Et₂O -Hexane (50, 50).

4) Composés dimériques.

10 Un caroténoïde contenant deux groupes hydroxyles sur les deux extrémités de la molécule, le decaprenyl astaxanthine, est hydrogéné sur Pd/C avec l'éthanol comme solvant.

5) Dérivés hydrosolubles des alcools à longue chaîne : esters de l'acide monophosphorique.

15 a) monoester de l'acide monophosphorique

Cette réaction est valable pour les alcools linéaires, comme pour les dérivés et analogues des terpènes et les esters du cholestérol.

20 On utilise un mode de préparation permettant d'obtenir sélectivement le monoester de l'acide monophosphorique. Ce mode opératoire fait intervenir le bis(2,2,2 trichloroethyl) phosphochloridate comme réactif et le couple Zn/Cu comme agent de déprotection pour libérer le sel de phosphate.

25 Préparation du réactif

Le réactif bis(2,2,2 trichloroethyl) phosphochloridate (BTEP) est préparé par addition goutte à goutte pendant 15 minutes à -50°C du trichloroethanol (44,8 g soit 29 ml ou 0,3 mole). Puis
30 le mélange est laissé à réagir à 0°C pendant 2 heures sous argon. Le mélange de réaction est chauffé à 55°C pendant une nuit et distillé pour donner 16,7 g (0,046 mole soit 15,3 %) de bis(2,2,2 trichloroethyl)

phosphochloridate $Pel=98^{\circ}C$ (0,15 mm Hg), $d_4^{15} = 1,75$ g/ml.

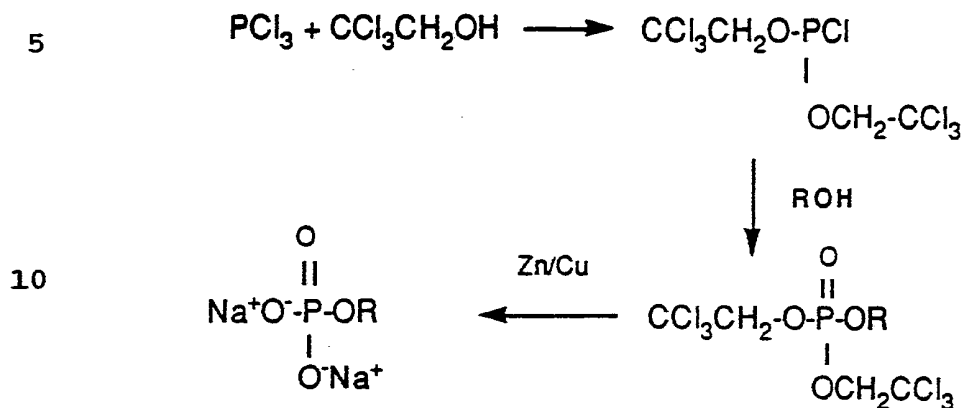
5 Phosphorylation

L'alcool dissous dans 2 ml de THF (0,1 mmol) est refroidi à $-78^{\circ}C$. On ajoute 750 mg de tamis moléculaire 4A puis 43 μl (soit 0,21 mmol) de BTEP. La température est laissée monter à la température ambiante ; puis le
10 tamis moléculaire est éliminé par filtration. Le filtrat est dilué à l'éther éthylique (10 ml). Puis on y ajoute 5 ml d'une solution à 0,5 M de $NaHCO_3$ suivie d'une solution étherée d'iode (38 mg, 0,3 mmol dans 5 ml d'éther éthylique). L'addition se fait lentement
15 goutte à goutte avec une forte agitation. Au bout de 20 minutes de réaction, on ajoute une solution aqueuse de Na_2SO_3 pour détruire l'excès de l'iode. On lave la solution avec une solution aqueuse saturée en NaCl et on évapore sous vide. Une chromatographie sur SiO_2 avec
20 du chloroforme-méthanol (50:1) comme éluant donne le phosphate de triester avec un rendement de 92 %.

Elimination du groupement trichlorethyl.

A une solution du phosphate de triester précédemment obtenu (0,05 mmol) dissous dans 1 ml de
25 DMF, on ajoute 65 mg de Zn/Cu et 50 μl (0,5 mmol) d'acétylacétone. La solution est chauffée à $55^{\circ}C$ pendant 1 heure. Le mélange est agité en présence de la résine Chelex pendant 1 heure ; puis on élimine la résine par filtration. Le filtrat est évaporé à sec. Le
30 résidu est traité par l'acide formique (300 μl) et laissé réagir pendant 24 heures, puis évaporé à sec et enfin chromatographié sur DEAE Sephadex (colonne 0,9 x

12 cm) avec un tampon pH 7,5 comme éluant. On obtient alors le phosphate avec un rendement de 75 %.



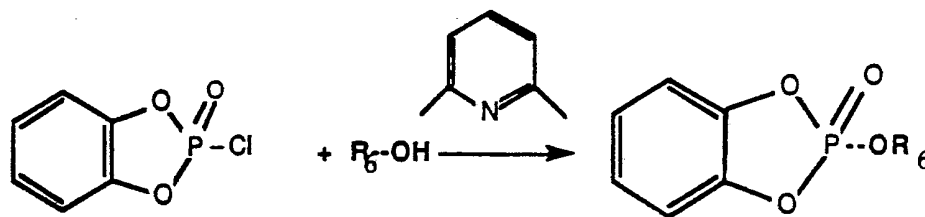
b) diester de l'acide monophosphorique

15 Cette réaction procède par phosphorylation avec l'o-phenylènéphosphochloridate suivie d'une hydrolyse oxydative. Cette réaction est valable pour les alcools linéaires, comme pour les dérivés et analogues des terpènes et les esters du cholestérol. Elle permet d'obtenir les diesters de l'acide monophosphorique.

20 1ère étape : phosphorylation des alcools

Une solution d'alcool contenant 1 mmole de dérivé de l'invention (383 mg dans le cas de l'hexacosanol), représenté par l'expression R_6-OH (R_6 représentant le reste de dérivé de l'invention), et du 2,6 diméthylpyridine (110 mg, 1 mmole) est traitée par une solution de 100 mg (0,5 mmole) d'o-phenylène phosphochloridate dans du THF pendant 24 heures à 40°C. Après addition d'une solution saturée de $NaHCO_3$ (10 ml) l'extraction se fait avec CH_2Cl_2 et la chromatographie sur SiO_2 donne 330 mg de phosphate (85 %).

5



10

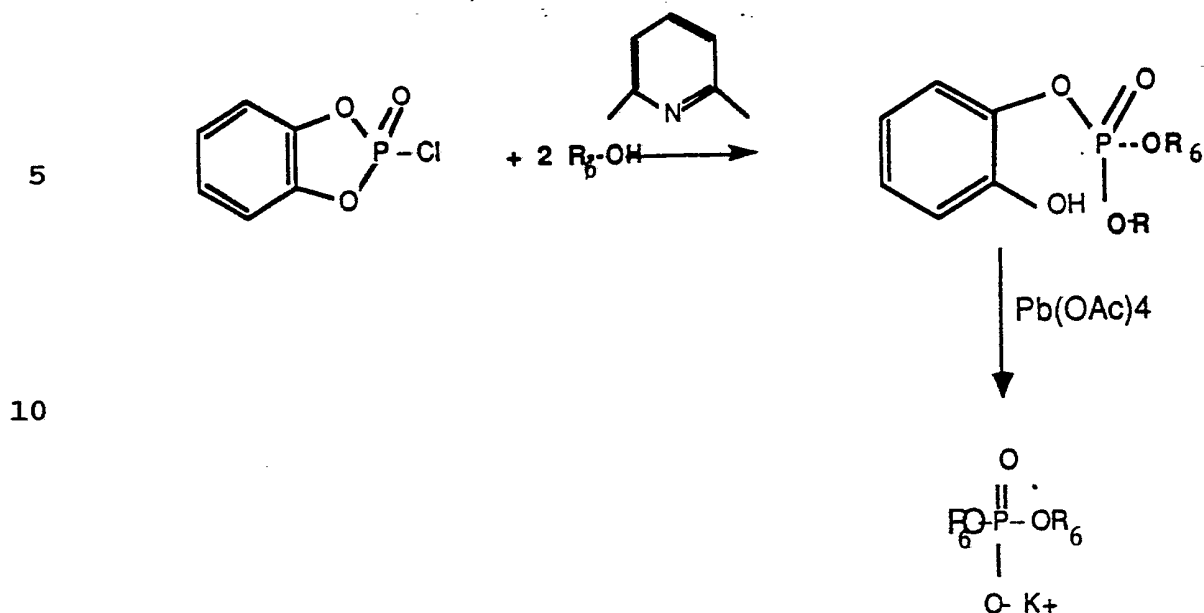
2ème étape : hydrolyse suivie de l'oxydation

Le produit précédemment obtenu (330 mg) dissous dans 6 ml de THF est traité par une solution de 110 mg (1 mmole) de diméthylpyridine dans 200 ml d'eau pendant 5 minutes, puis extrait avec du chloroforme (CHCl₃). L'extrait à CHCl₃ est dissous dans du THF (10 ml) puis traité avec 1g de tétraacétate de plomb (Pb(OAc)₄) ; le mélange est ajusté à pH 10 avec une solution méthanolique 0,1N de potasse (KOH). Après une évaporation du solvant et lavage avec du méthanol (MeOH), le sel de potassium est obtenu sous forme de liquide brun qu'on purifie par chromatographie sur SiO₂ avec comme éluant CHCl₃/MeOH/H₂O 60:25:5.

30

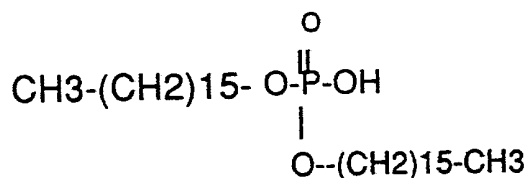
35

36



Les phosphates comportant deux radicaux R_6 sont obtenus en utilisant deux fois plus de réactif, soit 2 mmol d'o-phénylènephosphochloridate et nous les laissons réagir pendant 24 h.

L'ester de l'acide monophosphorique de formule



25

ainsi obtenu possède un PM de 547 et un R_f de 0,375 dans le solvant d'élution : CHCl_3 , Methanol, H_2O (65, 25, 4).

6) Substitution par des atomes de fluor

30

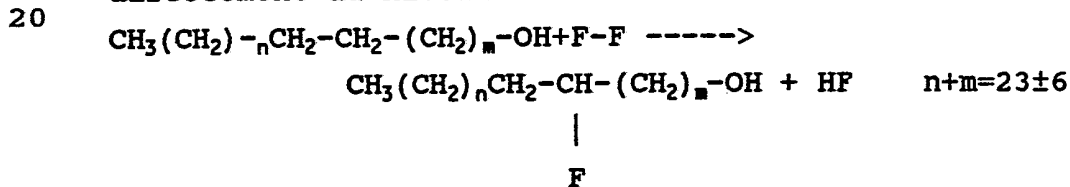
Il a été démontré précédemment que des composés organofluorés peuvent potentialiser l'effet des composés biologiques (Y. KOBAYASHI, I. KUMADOKI et T.

35

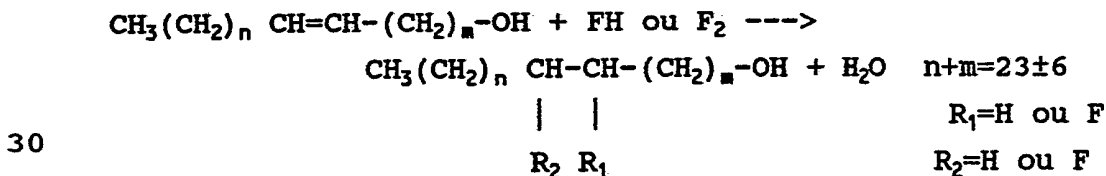
5 TAGUCHI, Synthesis of biologically active fluorine compounds. Synth. Org. Chem., 38 (1980) 1119-1129). Par des techniques déjà décrites d'incorporation d'atomes de fluor (KOBAYASHI et coll., supra; J. T. WELCH, advances in the preparation of biologically active organofluorine compounds. Tetrahedron, 43 (1987) 3123-3197; Biomedical aspects of fluorine compounds, R. FILLER and Y. KOBAYASHI eds, KODANSHA, Tokyo, (1982)), on montre que la substitution de 1 à 5 atomes de fluor sur des alcools gras à 26 atomes de carbone \pm 6 améliore la biodisponibilité des molécules.

La fluorination se fait par un mécanisme électrophilique.

15 La substitution peut se faire sur une liaison saturée C-H (D. BARTON et D. OLLIS, in Comprehensive Organic Chemistry, J.F. STODDART, ed. Pergamon Press (1979) pp504-507). L'attaque électrophilique se situe directement au niveau de la liaison C-H.



25 La substitution peut également se faire en saturant un ou des systèmes dessaturés par des composés contenant un ou plusieurs atomes de fluor.



Les composés fluorés contenant de 1 à 5 atomes de fluor améliorent la biodisponibilité de la molécule et augmentent leur efficacité biologique.

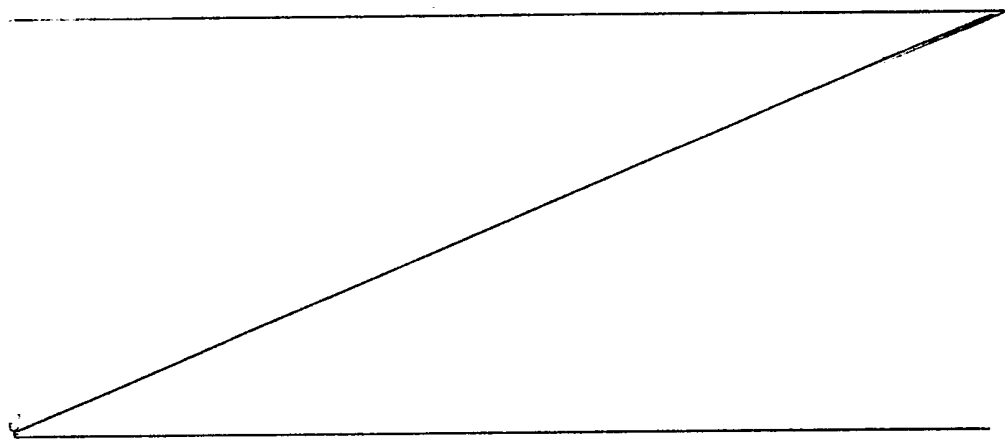
5 Des dérivés difluorés sont particulièrement intéressants sur le plan des activités biologiques (T. MORIKAWA et al, Studies on Organic Fluorine Compounds. Synthesis of 2,2 difluoro arachidonic acid. Chem. Pharm. Bull, 37 (3) 813-815 (1989)). On les obtient de
10 la façon suivante :

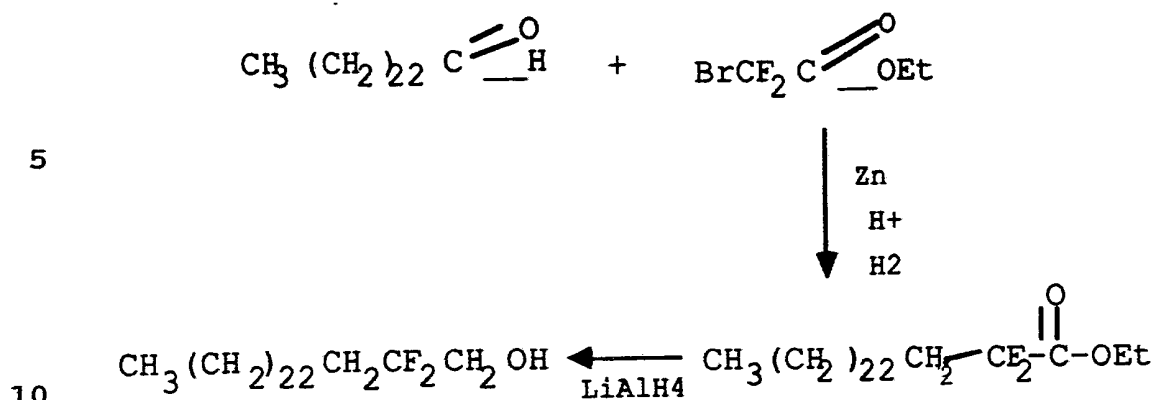
Réaction détaillée :

A un mélange de Zn (33,35 Masse atomique) et de THF (30 ml), on ajoute goutte à goutte une solution
15 d'aldéhyde en C_{24} (32 mmol) et du bromodifluoroacetate d'éthyle (28,04 mmol) dans du THF (33 ml). On chauffe sous reflux pendant 3 heures avec agitation. Après addition d'éther et de NH_4Cl aqueux, le précipité est enlevé par filtration et le filtrat est extrait à
20 l'éther, l'extrait est lavé avec une solution de NaCl puis chromatographié sur SiO_2 . Le composé est ensuite traité par une solution de HCl 1N et hydrogéné en présence de PtO_2 . On obtient l'ester éthylique de l'acide en C_{26} avec un rendement de 57 %. Cet ester est
25 ensuite réduit par $LiAlH_4$ dans l'éther éthylique avec chauffage sous reflux.

30

35





PM = 316 à 502.

II ESSAIS BIOLOGIQUES IN VITRO et IN VIVO

15 1) Régénérescence nerveuse

Les dérivés et analogues des alcools gras à longue chaîne de l'invention jouent un rôle dans le contrôle de la plasticité du tissu nerveux au cours du développement et chez l'adulte. Ils augmentent la survie neuronale au cours de phases de développement qui voient la mise en place de nouvelles connexions neuronales, également chez l'adulte au cours des processus d'apprentissage et de mémoire; Comme nous le décrivons dans l'Exemple 1 qui suit, les dérivés de l'invention favorisent la différenciation neuronale ainsi que la survie des neurones. Cette propriété leur donne la capacité d'augmenter la survie de neurones lésés à la suite d'une traumatisme. Les dérivés et analogues des alcools gras à longue chaîne de l'invention favorisent la survie et la régénérescence de cellules nerveuses à la suite d'un traumatisme du cerveau ou de la moelle épinière. Ces molécules sont

20

25

30

capables de limiter l'extension des lésions, de réduire la dégénérescence wallérienne et favorisent la régénérescence axonale. En particulier, les molécules décrites diminuent la nécrose post-ischémique, réduisent l'oedème autour de la lésion, augmentent la perfusion sanguine du tissu nerveux atteint et limitent la prolifération de fibroblastes ou d'astroblastes au niveau de la lésion.

Ces propriétés sont démontrées à l'aide de neurones maintenus en culture primaire dans différentes conditions, ou in vivo à l'aide de divers modèles de lésion expérimentale chez l'animal (GAGE et al, Brain Res., 268 : 27-37 (1983) ; WILLIAM et al, Proc. Natl. Sci. 83 : 9231-9235 (1986)). Les doses utilisées sont de l'ordre de 0,01 mg/kg, plus particulièrement 0,1 mg/kg à 5 mg/kg. En raison de la meilleure biodisponibilité des molécules que nous décrivons et de leur plus grande efficacité au niveau de la membrane cellulaire, nous améliorons avec des doses moindres les effets précédemment observés avec le n-hexacosanol (BORG et al, Neurosci. Lett, 213 : 406-410 (1987)).

Par ailleurs, les dérivés de l'invention favorisent également la régénérescence des nerfs périphériques. A la suite d'un traumatisme du nerf périphérique, il peut y avoir perte de la continuité nerveuse, suivie de la dégénérescence wallérienne. L'application des dérivés de la présente invention permet dans ce cas de réduire l'importance des lésions et de faciliter la restauration de la continuité nerveuse. Ce résultat est obtenu grâce aux propriétés neurotrophiques et régénérantes de ces dérivés.

EXEMPLE 1 : SURVIE ET REGENERESCENCE DE NEURONES CEREBRAUX EN PRESENCE DE DERIVES ET ANALOGUES DES ALCOOLS GRAS A LONGUE CHAINE DE L'INVENTION.

L'utilisation de neurones cérébraux maintenus en culture primaire permet de mettre en évidence l'activité de facteurs neurotrophiques (G. BARBIN, I. SELAK, M. MANTHORPE et S. VARON ; Neuroscience, 12 (1984) 33-43). On prépare des cultures neuronales à partir du cerveau d'embryons de rat de 13 à 18 jours. Les cellules sontensemencées à faible densité (10 000 à 100 000 cellules par ml) ; elles poussent dans des boîtes de Pétri recouvertes d'un support de polylysine, en présence d'un milieu de culture qui est préparé à partir du milieu de Eagle-Dulbecco (R. DUBELCCO et G. FREEMAN, Virology, 8, (1959) ; 396) auquel on ajoute des suppléments d'insuline, de transferrine, de progestérone, de sélénium et de putrescine (BORG et al, Develop Brain Res. 18 : 37-49 (1985)). Les dérivés testés sont ajoutés au début de la culture à des doses variant de 10^{-8} à 10^{-5} M.

On suit l'évolution de la culture à l'aide d'un microscope à contraste de phase. La coloration au bleu trypan permet de mesurer le nombre de neurones qui émettent des prolongements. On observe que dans les cultures contrôles le nombre de neurones vivants et de neurones avec prolongements diminue à partir d'une certaine durée de culture. Au contraire, dans les cultures traitées avec les dérivés de l'invention, le nombre de ces neurones reste constant avec le temps et la longueur des prolongements est beaucoup plus importante que dans les témoins. On note également un

grand nombre de ramifications à partir de ces prolongements et la présence de nombreux contacts cellulaires. In vivo, ces observations correspondent à la mise en place de nouveaux circuits neuronaux et à la formation de jonctions intercellulaires ou synaptiques.

L'augmentation de la survie de neurones placés dans des conditions critiques et l'amélioration de leur maturation morphologique se traduit également par une maturation accrue sur le plan biochimique.

On peut mesurer la présence de certaines protéines spécifiques de ces neurones, comme les protéines des neurofilaments, l'énolase neurospécifique ou la glutaminase par des méthodes immunocytochimiques ou des méthodes enzymatiques. Après fixation on incube les cultures avec un anticorps spécifique contre un neurofilament ou contre l'énolase, à différents temps de culture. On révèle la présence de ces protéines par une méthode à la peroxydase ou avec des anticorps fluorescents. L'apparition de ces protéines est plus précoce et plus intense dans les cultures contenant les dérivés de l'invention.

On peut aussi mesurer l'activité enzymatique de l'énolase ou de la glutaminase qui sont de bons marqueurs de la maturation neuronale. (BORG et al, Neurosci. Lett., 213 :406-410 (1987)). L'activité enzymatique rapportée à la quantité de protéine permet de comparer l'effet neurotrophique des différents dérivés de l'invention. Cette mesure quantitative montre que l'effet s'observe de façon précoce et continue ; elle permet également de faire des corrélations entre la dose utilisée et l'effet observé.

Dans tous les cas, les neurones traités par les dérivés et analogues des alcools gras à longue chaîne de l'invention induisent une activité accrue des marqueurs de la maturation par rapport aux contrôles.

Les dérivés de l'invention ont un effet plus important que les autres facteurs neurotrophiques déjà connus, en raison de leur meilleure biodisponibilité et d'une meilleure efficacité au niveau cellulaire. Ces résultats montrent que les dérivés et analogues des alcools gras à longue chaîne favorisent la survie de neurones cérébraux et augmentent leur degré de maturation.

2) Neuroprotection

Une autre application intéressante des dérivés de l'invention est liée à leur propriété de protéger les neurones de lésions dues à la présence de neurotoxiques, comme le glutamate, l'acide iboténique, l'AF-64, la scopolamine ou le N-méthylD-aspartate. Le neurotransmetteur excitateur, le glutamate, et les excitotoxines en général, produisent des effets neurotoxiques en relation avec leur action dépolarisante au niveau de leurs récepteurs. Certains analogues du glutamate, comme l'acide iboténique ou le quisqualate ont des effets excitateurs plus puissants et produisent également des effets neurotoxiques. Les propriétés neuroprotectrices des dérivés et de l'invention sont démontrées à la suite d'une injection de neurotoxique, l'acide iboténique, dans le nucleus basalis chez le rat (Exemple 2). Normalement, cette injection entraîne une diminution de la production d'acétylcholine et de l'activité de la choline acétyl

transférase dans le néocortex ipsilatéral, ainsi que des lésions morphologiques dans cette zone de cerveau. Rappelons que ce type de lésions se retrouve chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer (WENK et al, Brain Res., 293 : 184-186 (1984)). Ces lésions sont sensiblement réduites chez les animaux qui ont reçu des injections intrapéritonéales à une dose de 1 mg/kg/jour de dérivés de l'invention.

Les dérivés et analogues des alcools gras à longue chaîne de l'invention peuvent donc être utilisés dans le traitement de maladies neurodégénératives, comme la chorée de Huntington, la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson. Ils permettent également d'améliorer le traitement de l'épilepsie et d'autres troubles du comportement liés au système limbique. De plus, elles sont capables d'induire une protection des neurones vis-à-vis des neurotoxines, de certains ions et de radicaux oxydants. Pour l'ensemble de ces applications, les doses thérapeutiques sont de l'ordre de 0,1 mg/kg/jour à 10 mg/kg/jour. L'administration est répétée, par voie parentérale ou orale.

EXEMPLE 2 : PROTECTION VIS-A-VIS DE LÉSIONS DUES AUX NEUROTOXIQUES

On utilise les propriétés excitotoxiques d'un acide aminé, l'acide iboténique, pour étudier la survie des neurones cholinergiques du noyau basalis, selon une méthode précédemment décrite (WENK et al, Brain res., 293 : 184-186 (1984)). Après avoir anesthésié des rats mâles Long-Evans on les place dans un appareil stéréotaxique ; puis on injecte 25 nmole d'acide iboténique dans le noyau basalis du côté gauche.

Un groupe de rats est traité avec un dérivé d'alcool gras à longue chaîne, à raison d'une injection par jour (1 mg/kg) par voie intrapéritonéale à partir de deux jours avant l'injection d'acide iboténique.

On peut partir de deux jours avant l'injection d'acide iboténique.

On peut utiliser plusieurs types de tests cognitifs et de comportement au cours de l'expérience, en particulier le labyrinthe radial à 8 branches, l'apprentissage du labyrinthe de Hebb-Williams, ou le test de la piscine (ALFORD et al, Exp. Brain Res., 69 (1988) 545-558)). Les animaux traités avec l'acide iboténique montrent un déficit des capacités d'apprentissage et de mémorisation. On observe également un déficit dans la localisation spatiale, similaire à celui observé dans la maladie d'Alzheimer. Pour les animaux traités les déficits sont nettement moindres et les capacités d'apprentissage et de mémorisation sont maintenues.

A l'issue des tests comportementaux, on sacrifie les animaux afin de procéder à une analyse histologique de la zone du noyau basalis. On observe une perte de substance induite par l'acide iboténique qui est nettement plus restreinte pour les animaux traités. La lésion qui pour les témoins s'étend dans toutes les directions à partir du site d'injection vers le globus pallidus est moins étendue après traitement et correspond à une injection de neurotoxine moins importante. Des dosages biochimiques sont également effectués sur le néocortex et l'hippocampe. L'activité de la choline acétyl transférase est diminuée dans le cortex frontal, temporal et pariétal, ainsi que dans l'amygdale deux semaines après l'injection d'acide

iboténique. Le traitement avec les dérivés de l'invention entraîne une réduction sensible de ce déficit dans ces régions et on observe une récupération progressive de l'activité choline acétyl transférase dans les semaines qui suivent l'injection.

Les dérivés de l'invention permettent de protéger certains neurones cérébraux contre des lésions induites par des acides aminés excitotoxiques et contre les conséquence fonctionnelles de ces lésions.

3) Réparation de lésions

La régénérescence cellulaire intervient également au cours de la réparation de lésions vasculaires ou cutanées. Ainsi l'endothélium vasculaire est composé d'une monocouche de cellules qui encadrent la face interne du système cardio-vasculaire. Cette monocouche représente une surface de plusieurs centaines de m² et joue un rôle majeur dans l'intégrité vasculaire. Les cellules endothéliales produisent de nombreuses substances qui participent à la coagulation, à la fibrinolyse et aux phénomènes inflammatoires. L'altération de ces fonctions peut conduire à une augmentation de la perméabilité vasculaire et à une accumulation de protéines et lipoprotéines dans le tissu interstitiel, ou à l'adhésion de plaquettes au sous-endothélium accompagnée de sécrétion de "platelet derived growth factors" (PDGF), ou enfin à la migration et la prolifération de cellules musculaires lisses. Une altération de l'endothélium vasculaire est donc une étape initiale importante dans les phénomènes de thrombose et d'athérosclérose (Cazenave et al. Inter Angio 3:27-32 (1984)). A la suite d'une lésion de

l'endothélium vasculaire, plusieurs phénomènes apparaissent dans le processus de réparation in vivo: tout d'abord la migration et la répllication de cellules endothéliales, l'adhésion plaquettaire sur le sous-endothélium exposé et enfin la prolifération de cellules musculaires lisses qui conduit à la formation de plaques et à l'athérosclérose. Des dérivés permettant de protéger la paroi vasculaire ou d'inhiber l'adhésion plaquettaire peuvent donc empêcher la formation de plaques et l'athérosclérose.

Une des applications de l'invention consiste à utiliser les dérivés décrits ci-dessus pour favoriser la réparation de lésions cutanées ou vasculaires. Les lésions des cellules endothéliales entraînent la formation de dépôts de protéines ou lipoprotéines dans le tissu intersticiel, ainsi que la prolifération de cellules musculaires lisses. Ces phénomènes constituent l'étape initiale dans la formation de thrombose et de l'athérosclérose (R.Ross. Atherosclerosis 1:293-311(1981)). Les dérivés de l'invention augmentent la différenciation des cellules du derme, de l'épiderme et des cellules endothéliales vasculaires. Comme nous le montrons dans l'Exemple 3, ces dérivés accélèrent la réparation d'une lésion mécanique de cellules endothéliales vasculaires. Cette propriété est démontrée à l'aide d'un modèle in vitro de lésion mécanique de cellules endothéliales humaines en culture. Les cultures sont obtenues à partir de veines ombilicales humaines et sont maintenues dans un milieu RPMI plus HEPES plus 30% de sérum humain ; la lésion est réalisée 3 jours après la confluence par

l'application d'un disque de cellulose sur une couche
confluente de cellules endothéliales (C.Klein-Soyer et
al Thrombosis Haemostasis 56:232-235(1986)). La vitesse
5 de régénération dépend de la taille de la lésion
initiale et de la concentration en sérum. De plus
l'addition au milieu de culture des dérivés de
l'invention augmentent significativement la surface de
la lésion initiale recouverte par l'endothélium qui
10 régénère. Les doses utilisées sont de l'ordre de 0,01 à
100 μ M, plus particulièrement 0,1 à 10 μ M. Les doses
correspondantes pour l'utilisation in vivo sont de
l'ordre de 0,01mg/kg à 100mg/kg, plus particulièrement
0,1 à 10mg/kg.

15 L'application des dérivés de la présente invention
permet d'accélérer la réparation de lésions vasculaires
ou cutanées et de retarder la dégénérescence des
cellules de la peau, liée en particulier au
vieillissement, à l'exposition aux rayons U.V et à des
20 agressions chimiques. Cette propriété est démontrée in
vitro à l'aide de cultures de kératinocytes. Les
alcools gras à longue chaîne de l'invention augmentent
la survie de ces cellules placées dans des conditions
défavorables ou en présence de facteurs qui entraînent
25 une dégénérescence de ces cellules. Ils accélèrent leur
différenciation ainsi que la réparation de lésions
tissulaires. Les doses utilisées sont similaires à
celles décrites pour les lésions vasculaires.

30 **EXEMPLE 3 : REPARATION DE LESIONS DE L'ENDOTHELIUM
VASCULAIRE PAR DES ALCOOLS GRAS A LONGUE CHAINE.**

Des modèles de lésion mécanique d'une couche de
cellules endothéliales in vitro permettent d'étudier

les processus de réparation de ce type de lésions (C.Klein-Soyer et al sus-mentionné). Les cellules endothéliales sont isolées à partir de veines ombilicales humaines. On les incube avec de la collagénase 0,1% pendant 15 min à 37°C et on récupère l'effluent dans des tubes contenant du milieu de culture (RPMI, HEPES, glutamine et 5 à 30% de sérum humain). Après centrifugation on ensemence le culot dans des boîtes de Petri prétraitées avec de la fibronectine qui sert de support.

La lésion se fait sur des cultures confluentes par application d'un disque calibré de polyacetate de cellulose. Cette technique détache sélectivement les cellules endothéliales qui se trouvaient dans la zone d'application du disque. Puis on ajoute au milieu de culture les alcools gras à longue chaîne à des doses variant de 0,01 μ M à 100 μ M, et préférentiellement 0,1 à 10 μ M.

Après la lésion on retire des boîtes toutes les 24h afin de mesurer la taille de la lésion. On utilise des grilles adhésives divisées en carrés de 0,5mm² qu'on applique sur le fond de la boîte, en coïncidence avec la lésion. On mesure la surface de la lésion en comptant les carrés avec un microscope inversé. La vitesse de régénération est linéaire pendant 48h, puis se ralentit quand la lésion n'est plus que de 75 à 80% de la lésion initiale. La présence des dérivés de l'invention augmente la vitesse de régénérescence aux temps précoces et même en absence de sérum humain dans le milieu de culture. De plus en l'absence de sérum on observe un début de dégénérescence des cellules

endothéliales, ce qui n'est pas le cas en présence d'alcools gras à longue chaîne.

5 In vivo une lésion de l'endothélium vasculaire
peut entraîner l'adhésion de plaquettes, la
prolifération de cellules musculaires lisses et la
formation de thrombose ou de plaques d'athérosclérose.
A l'aide du modèle de lésion mécanique, on observe que
10 les alcools gras à longue chaîne de l'invention
protègent la paroi vasculaire et améliorent les
capacités de régénérescence de celle-ci. Les propriétés
physico-chimiques de ces dérivés et leur bonne
biodisponibilité en font des outils thérapeutiques
15 particulièrement utiles dans le traitement et la
prévention de la thrombose et de l'athérosclérose.

4) Cytoprotection

Certaines lésions cellulaires sont liées à la
présence de toxiques ou sont la conséquence d'une
20 ischémie, comme dans le tissu nerveux. Ces phénomènes
sont particulièrement importants dans le foie, le
muscle cardiaque et le rein. Un certain nombre de
molécules (xénobiotiques) peuvent altérer les fonctions
des cellules hépatiques soit directement soit après
conversion de ces molécules sous forme plus toxique. La
25 lésion cellulaire peut débuter soit par la formation
d'un complexe stable avec une protéine ou un autre
composé intra-cellulaire, soit par la formation d'une
entité chimique très réactive ou en induisant des
changements physico-chimiques dans la cellule ou dans
30 son environnement (Bridges et al Ann N. Y.
Acad.Sci.407:42-63 (1983)). La lésion cellulaire peut
être limitée ou empêchée par certains systèmes de

défense, comme les enzymes du métabolisme des médicaments, des protéines de liaison ou des antioxydants. On peut utiliser des hépatocytes isolés
5 comme modèle expérimental pour étudier la toxicité de certaines molécules. On mesure la cytotoxicité par la libération d'enzymes cytosoliques, la sécrétion d'albumine, des changements morphologiques observés en
10 microscopie optique et par la détermination de la viabilité cellulaire. La lésion cellulaire est influencée par son environnement, en particulier la pression partielle d'oxygène ou la présence de calcium extra-cellulaire. La toxicité de certaines drogues est
15 potentialisée par la déplétion en glutathion. L'utilisation d'hépatocytes isolés maintenus en culture permet d'étudier la cytotoxicité hépatique et également de mettre en évidence des composés protecteurs vis-à-vis des cytotoxiques. On peut étudier en particulier le
20 maintien des cytochromes P450 et des enzymes du métabolisme des médicaments, comme la glucuronyltransferase et la sulfotransférase.

De même on peut étudier la cytotoxicité de certaines molécules sur les cellules du glomérule ou du
25 tubule rénal à l'aide de cellules mésangiales, épithéliales ou tubulaires isolées. On mesure la cytotoxicité par des changements morphologiques ou par l'expression de fonctions biochimiques propres à ces cellules (sécrétion d'un inhibiteur d'activateur du
30 plasminogène, de PGE₂, d'interleukine 1) (J. D. Sraer et Coll., FEBS Lett.104:420-424(1979)).

En particulier, les alcools gras à longue chaîne de l'invention, augmentent la synthèse et la sécrétion

des activateurs du Plasminogène de l'ordre de 70 à 100 % par rapport au contrôle, dans des cellules
5 mésengiales et épithéliales de rein humain. L'effet maximum est obtenu à des doses allant de 10^{-5} à 10^{-7} M. Ce résultat permet d'envisager une action pharmacologique dans les phénomènes de coagulation et dans la formation des matrices extra-cellulaires. Les
10 molécules de l'invention peuvent également empêcher la propagation de métastases provenant de tumeurs cancéreuses, et s'opposer en cela à l'action de certaines protéines.

En ce qui concerne le muscle cardiaque, les
15 lésions cellulaires sont généralement la conséquence d'une ischémie. Des cellules musculaires cardiaques isolées permettent en particulier de suivre l'évolution de lésions sur le plan des modifications électrophysiologiques (P. Athias et al. In Vitro
20 22:44(1986)).

Les dérivés d'alcools gras à longue chaîne de l'invention jouent un rôle dans la protection contre
des lésions chimiques ou liées à une ischémie qui s'exercent sur des cellules hépatiques, rénales ou
25 musculaires cardiaques.

La présence de composés toxiques ou une ischémie provoque une dégénérescence cellulaire qui se manifeste par une diffusion d'enzymes cytosoliques (LDH), des changements morphologiques, une perte de la viabilité
30 cellulaire. On peut utiliser des cellules en culture pour mettre en évidence cette toxicité et d'éventuels agents protecteurs. Comme nous le démontrons dans l'Exemple 4, les dérivés de l'invention augmentent la

survie et maintiennent la différenciation d'hépatocytes
maintenus en culture. Les cultures sont obtenues par
fractionnement à partir de foie de rats adultes et sont
5 maintenues dans un milieu Ham/F12 additionné
d'albumine, insuline, hydrocortisone et 10% de sérum de
veau foetal. La survie des hépatocytes in vitro est
limitée, ils ont tendance à perdre certains caractères
de différenciation et à dégénérer en présence de
10 composés toxiques. C'est le cas en particulier pour la
galactosamine, le paracétamol, le pentobarbital (Paine
et Hockin. Toxicology 25:41(1982) ou le
cyclophosphamide (ACOSTA et MITCHEL. Bioch. Pharm.
30:3225(1981).

15 L'addition d'alcools gras à longue chaîne dans le
milieu de culture améliore la survie des hépatocytes in
vitro, comme on peut le mesurer par des tests de
viabilité, par le maintien du glutathion et de
20 l'activité cytochrome P450, ainsi que la sécrétion
d'albumine (Le Rumeur et al. Exp.Cell
Res.147:247-254(1983)). Ces dérivés de l'invention
diminuent également la toxicité du pentobarbital ou du
cyclophosphamide, comme on peut l'observer par les
25 changements morphologiques, la diffusion d'enzymes
cytosoliques et l'activité d'enzymes de détoxification,
comme les cytochromes P450, les monooxygénases et les
enzymes de conjugaison. Les doses utilisées sont de
l'ordre de 0,01 à 100 μ M, plus particulièrement 0,1 à
30 10 μ M. Les doses correspondantes pour l'utilisation in
vivo sont de l'ordre de 0,01mg/kg à 100mg/kg, plus
particulièrement 0,1 à 10mg/kg.

L'application des dérivés de la présente invention permet de protéger les cellules hépatiques, rénales ou musculaires cardiaques contre la dégénérescence due à des composés toxiques ou à une ischémie. L'effet protecteur pour des cellules du glomérule rénal est également démontré à l'aide de cellules mésengiales, épithéliales ou tubulaires in vitro. On peut mesurer l'effet sur la dégénérescence cellulaire par des changements morphologiques et par l'expression de fonctions biochimiques spécifiques, comme la sécrétion d'inhibiteur d'activateur du plasminogène, de PGE₂, d'interleukine 1 (J. D. Sraer et al. sus-mentionné). On peut mesurer l'effet sur la dégénérescence de cellules musculaires cardiaques, en particulier après une ischémie, par des changements morphologiques, la diffusion d'enzymes cytosoliques (LDH) ou des modifications des propriétés excitatrices membranaires (P. Athias et al. sus-mentionné). Les doses utilisées sont similaires à celles décrites pour l'effet cytoprotecteur des hépatocytes.

Les dérivés de la présente invention permettent de protéger les cellules intestinales et gastriques vis-à-vis de composés toxiques, comme un excès d'acidité gastrique. Les molécules de l'invention rendent les cellules pariétales et épithéliales de l'estomac plus résistantes vis-à-vis d'un excès d'acidité gastrique ; elles diminuent la sécrétion des ions H⁺ et augmentent la sécrétion de mucus. Cet effet permet de protéger cet organe contre les conséquences d'un stress, de régulariser la motricité intestinale dans une situation de stress et d'empêcher la formation

d'un ulcère gastrique ou intestinal. Les dérivés de l'invention augmentent également la trophicité des villosités intestinales, des cellules épithéliales de l'estomac et des ilots de Langerhans du pancréas. Ils rendent la muqueuse intestinale plus résistante en situation de malnutrition et limitent les conséquences fonctionnelles liées à une pancréatite, en particulier sur la sécrétion d'insuline. Les dérivés de l'invention sont ajoutés avantageusement à des préparations destinées à l'alimentation parentérale ou à des substituts du lait maternel. Ils favorisent la différenciation et la maturation des tissus du tractus digestif au cours du développement ou à la suite d'un traumatisme chimique, mécanique ou chirurgical.

EXEMPLE 4 : PROTECTION DES CELLULES HEPATIQUES VIS-A-VIS DE LA DEGENERESCENCE INDUITE PAR DES COMPOSES TOXIQUES.

Le maintien en culture d'hépatocytes isolés permet d'étudier leur métabolisme et leur sensibilité vis-à-vis de certains composés toxiques. Les hépatocytes sont isolés à partir de foie de rats adultes par perfusion avec de la collagénase, filtration et centrifugation dans du milieu L15. On purifie les hépatocytes par élutriation dans une chambre d'élutriation à un débit de 10 à 40 ml/min qui est centrifugée à 840 tours par min (E.Le Rumeur et al sus-mentionné). Une fraction pure contenant des hépatocytes diploïdes est obtenue à un débit de 15ml/min. On les enseme dans des boîtes de Pétri couvertes d'une couche de fibronectine, dans du milieu Ham F12 contenant de l'albumine bovine, de l'insuline, 10% de sérum foetal de veau et de

l'hydrocortisone. On ajoute dans certaines boites des alcools gras à longue chaîne à des doses variant de 0,01 μ M à 10 μ M, et préférentiellement 0,1 à 10 μ M.

On peut mesurer la différenciation des hépatocytes en mesurant la production d'albumine par immunonéphélométrie et la synthèse protéique par incorporation de leucine marquée. On peut également mesurer le taux de glutathion et l'activité d'enzymes du métabolisme des médicaments comme le cytochrome P450, les glucuronyltransférases et sulfotransférases. Les cellules ont tendance à dégénérer au cours de la culture et perdent en particulier leur activité cytochrome P450 et les enzymes de conjugaison. Par contre les cultures traitées par les molécules que nous décrivons ont un meilleur taux de survie et conservent leurs activités enzymatiques. Ces résultats montrent l'effet cytotrophique de ces molécules.

L'addition de certaines drogues pendant 24h à des doses de 0,1 à 1mM, comme la galactosamine, le paracétamol, le pentobarbital ou le cyclophosphamide entraîne une dégénérescence des hépatocytes, qu'on observe par des changements morphologiques et biochimiques. Les cellules libèrent des enzymes cytosoliques dans le milieu de culture (comme la LDH), la viabilité cellulaire diminue, ainsi que la capacité de sécrétion d'albumine et le taux de glutathion. La dégénérescence est sensiblement atténuée dans les cultures traitées par des alcools gras à longue chaîne, selon l'invention, avec amélioration de la survie et maintien des caractères de différenciation des hépatocytes.

Ces résultats montrent l'intérêt des dérivés de l'invention dans le traitement de la toxicité induite par certaines drogues et comme protecteurs de la dégénérescence des cellules hépatiques.

5) Défenses immunitaires

Un défaut d'expression des fonctions différenciées de certaines cellules peut avoir pour conséquence un déficit dans les défenses immunitaires de l'organisme. Celles-ci reposent en particulier sur les macrophages qui sécrètent des cytokines, qui participent à la régulation de l'immunité. L'interleukine 1 est sécrétée par les macrophages ; elle favorise la prolifération et la différenciation des lymphocytes, en augmentant l'apparition de récepteurs à l'IL2 (Hogan et Vogel. J.Imunol.Immunopharmacol.8:6-15(1988)). Elle favorise également la différenciation des lymphocytes B et la sécrétion d'anticorps. Les macrophages sécrètent également une molécule appelée "Tumor Necrosis Factor"(TNF) qui entraîne la lyse de tumeurs et une autre appelée "Colony Stimulating Factor"(CSF) qui peut favoriser la production d'interféron dans la moelle. Ce CSF est lui-même un agent de différenciation pour les précurseurs des macrophages ; il augmente la réponse des macrophages à certains agents de différenciation comme l'ester de phorbol. Enfin les macrophages produisent l'interféron α et β en réponse à certains stimuli. L'interféron augmente les fonctions phagocytaires des macrophages et donc leur rôle tumoricide.

Les défenses immunitaires reposent également sur les lymphocytes. Ceux-ci peuvent se différencier en

monocytes ou en granulocytes, en réponse à certains agents. Ainsi un diester de phorbol favorise la différenciation de lymphocytes en monocytes (Rovera et
5 al. Proc.Natl.Acad.Sci. 76:2779(1979)) et les rétinoides favorisent la différenciation des lymphocytes en granulocytes (Breitman et al. Proc.Natl.Acad.Sci. 77:2939(1980)).

10 Une autre application intéressante de la présente invention consiste à favoriser la différenciation des cellules qui participent aux défenses immunitaires de l'organisme, comme les macrophages, les monocytes et les lymphocytes. On peut mesurer le degré de
15 différenciation de ces cellules par leur capacité de sécrétion de certaines cytokines, comme l'IL1 (interleukine-1), le CSF ou l'interféron, ainsi que leur réponse aux signaux immunitaires (Waren et Ralph. J.Immunol, 137:2281(1986)). L'addition d'alcools gras à
20 longue chaîne de l'invention a un effet cytotrophique sur ces cellules et augmente la production de CSA (Colony Stimulating Activity) par les monocytes en réponse au PMA, augmente la production d'interféron par les macrophages, augmente leurs fonctions
25 phagocytaires, ainsi que leur réceptivité aux signaux immunitaires. Si l'on incube des monocytes sanguins en présence des dérivés de l'invention, on observe une amélioration de leur survie après 5 jours, une meilleure différenciation en qualité et en nombre de
30 cellules différenciées (apparition d'un antigène de surface spécifique, sécrétion de certaines cytokines). Une production accrue d'IL1 favorise l'activation des lymphocytes B et T, augmente le nombre de récepteur à

l'IL2, induit une granulocytose. Les doses utilisées in vitro sont de l'ordre de 0,01 à 10 μ M, plus particulièrement 0,1 à 5 μ M. Les doses correspondantes pour l'utilisation in vivo sont de l'ordre de 0,01mg/kg à 10mg/kg, plus particulièrement 0,1 à 5mg/kg.

L'action trophique des dérivés de l'invention sur les lymphocytes et les macrophages, leur permet d'être utilisés pour favoriser les défenses immunitaires de l'organisme, en particulier dans le cas de déficit du système immunitaire (SIDA, maladies auto-immunes).

6) Effet anti-inflammatoire et anti-allergique

L'histamine joue un rôle primordial dans la pathologie de l'inflammation ; c'est aussi un des médiateurs des phénomènes allergiques ou anaphylactiques. Elle est libérée par les mastocytes ou les leucocytes basophiles. La libération d'histamine par les mastocytes pourrait également jouer un rôle dans le contrôle de la microcirculation cutanée. En dehors de ce phénomène non immunologique, il est reconnu que la stimulation des basophiles et des mastocytes par un antigène et des IgE est un mécanisme fondamental dans des pathologies allergiques aiguës comme le choc anaphylactique, l'asthme, la rhinite allergique et certaines affections de la peau, comme l'urticaire et la dermatite atopique (J. C. Foreman Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21: 63-81(1981)).

Les anticorps IgE sont sécrétés par des lymphocytes B en réponse à la fixation d'un antigène. Cette sécrétion est contrôlée par d'autres lymphocytes, les lymphocytes T suppresseurs et les lymphocytes T helpers. L'IgE se lie ensuite aux mastocytes et aux

basophiles et entraîne la libération d'histamine plus
d'autres médiateurs de l'inflammation. Le crosslinking
des IgE est nécessaire afin d'obtenir cette réponse et
la quantité d'histamine libérée est liée au nombre de
molécules IgE crosslinkées. La libération d'histamine
nécessite aussi la présence de calcium extra-
cellulaire, ainsi que l'activation du métabolisme des
inositols phosphates et l'intervention de nucléotides
cycliques. Un certain nombre de composés qui
interagissent soit sur le flux de calcium, soit sur le
métabolisme des inositols phosphates, soit sur celui
des nucléotides cycliques, comme la théophylline,
modifient la réponse des mastocytes et des basophiles à
la fixation des IgE.

Enfin la réponse physiologique à la sécrétion
d'histamine et des autres médiateurs de l'inflammation
(leucotriènes, prostaglandines) passe par la fixation
de ces molécules à leur cible, en particulier les
muscles lisses. Citons en exemple la vasoconstriction
bronchique, consécutive à la libération d'histamine et
qui intervient dans la maladie asthmatique.

Les dérivés d'alcools gras à longue chaîne de
l'invention présentent un effet cytotrophique sur des
cellules qui participent aux phénomènes inflammatoires
et allergiques de l'organisme, comme les mastocytes et
les leucocytes basophiles. Les phénomènes
inflammatoires et allergiques sont déclenchés par la
fixation d'un antigène et des IgE sur ces cellules, ce
qui entraîne la libération d'histamine. On peut mesurer
l'histamine libérée par des mastocytes provenant du
liquide péritonéal en les incubant pendant 30 min à

37°C dans un milieu défini. La quantité d'histamine
secrétée augmente avec la concentration en calcium dans
ce milieu ou en présence de l'ionophore A23187 ;
5 l'histamine est également secrétée à la suite de la
fixation d'IgE sur la membrane cellulaire et du
crosslinking de ces molécules (J.C.Foreman sus-
mentionné). Si l'on ajoute des dérivés de l'invention
10 dans le milieu d'incubation, la quantité d'histamine
libérée est significativement diminuée. Ceci suggère
qu'ils agissent sur les flux de calcium ou sur le
mouvement membranaire des récepteurs aux IgE, ou encore
sur les mécanismes secondaires impliqués dans le
15 processus d'exocytose (métabolisme des inositols
phosphates, des nucléotides cycliques), avec pour
conséquence une diminution de la sécrétion d'histamine
et donc un effet anti-inflammatoire. Cet effet est
obtenu in vitro avec des quantités d'alcools gras à
20 longue chaîne de l'ordre de 0,01 à 100 μ M, plus
particulièrement 0,1 à 10 μ M. Les doses correspondantes
pour l'utilisation in vivo sont de l'ordre de 0,01mg/kg
à 100 mg/kg, plus particulièrement 0,1 à 10 mg/kg.

Les dérivés de l'invention permettent donc
25 d'atténuer les processus inflammatoires et allergiques
aigus, consécutifs à la sécrétion d'IgE et à la
fixation d'un antigène sur les mastocytes et les
basophiles, comme on peut les observer dans la maladie
asthmaticque, la rhinite allergique, le choc
30 anaphylactique ou l'urticaire.

Les dérivés de l'invention protègent le tissu
cartilagineux et osseux des conséquences d'une
inflammation aiguë ou chronique, comme on peut les

observer dans toute inflammation des articulations et des os. Ils ralentissent en particulier la destruction osseuse et la formation d'arthrose. Cet effet est obtenu grâce à un effet trophique des alcools gras à longue chaîne sur les chondrocytes et les ostéoblastes, ainsi qu'à une action favorisante sur la différenciation de ces cellules au cours du développement ou à la suite d'un traumatisme.

7) Effet anti-tumoral

Chaque cellule peut être identifiée par des critères morphologiques, biochimiques et immunologiques représentatifs d'un état donné qui peuvent changer sous l'effet d'une activation. Les phénomènes d'activation apparaissent rapidement après la stimulation : ce sont des variations de mobilisation calcique, du contenu en ADN, ARN ou en protéines ; elles aboutissent à l'expression d'antigènes membranaires ou à l'induction d'activités enzymatiques. Dans le cas où la stimulation conduit à l'acquisition de caractères spécifiques, antigéniques ou fonctionnels, correspondant à un état cellulaire plus mature que l'état initial, le signal activateur est un signal différenciateur. Ces effets sont observés avec divers types cellulaires, comme des neurones centraux avec l'hexacosanol (Borg et al. Neurosci.Lett.213:406-410(1987)), mais aussi des promyélocytes humains qui se différencient en monocytes en présence de diester de phorbol (G.Rovera et al Proc.Natl.Acad.Sci. 76:2779-2783(1979)) ou en granulocytes sous l'action des rétinoïdes (T.R.Breitman et al. Proc.Natl.Acad.Sci. 77:2936-2940(1980)).

Dans le cas des cellules promyélocytaires, la voie dans laquelle s'oriente la différenciation peut être précisée avec des marqueurs phénotypiques, comme l'expression d'antigènes membranaires MO2, spécifique des monocytes, ou MO1, caractéristique de la différenciation en granulocytes ou monocytes. Certains inducteurs ont la capacité de différencier des cellules cancéreuses ou précancéreuses en cellules différenciées. D'autres molécules comme le TNF ont également une activité anti-cancéreuse. Ce TNF est sécrété par les macrophages ; il peut provoquer la lyse de tumeurs. L'activité cytotoxique est exercée par des monocytes activés par le TNF (E.A.Carswell et al Proc.Natl.Acad.Sci. 25:3666(1975)). Cette toxicité est sélective pour des cellules tumorales et on peut penser que cette substance joue un rôle primordial dans la défense de l'organisme contre la néoplasie. Toute molécule qui favoriserait la différenciation des macrophages ou des monocytes et leur production de TNF pourrait donc augmenter les capacités de défense de l'organisme.

Une autre application de l'invention consiste à favoriser la différenciation des cellules qui participent à la défense de l'organisme contre les processus tumoraux, comme les macrophages, les lymphocytes et les monocytes. Lorsqu'elles atteignent leur stade différencié, ces cellules montrent une activité phagocytaire et la libération de molécules tumoricides, comme le TNF. Les cellules promyélocytaires peuvent se différencier en monocytes ou en granulocytes sous l'effet de certains inducteurs

comme les esters de phorbol ou les rétinoïdes. On peut mesurer la différenciation de ces cellules à l'aide de cellules promyélocytaires leucémiques HL60 maintenues en culture, dans un milieu RPMI contenant 20% de sérum de veau foetal. Les cellules sont mises en culture à 3×10^5 cellules par ml et repiquées deux fois par semaine (N.Mendelsohn et al. Cancer Res. 40:1469-1474 (1980)).

On ajoute les dérivés de l'invention dans le milieu au moment de la mise en culture et on mesure le degré de différenciation 5 jours après le début du traitement par les changements de morphologie et par leur capacité de réduire le nitrobleu de tétrazolium, comme cela est montré dans l'Exemple 5. On observe une augmentation du nombre de cellules différenciées par rapport au contrôle dans les cultures traitées. De même les cellules traitées montrent une diminution du nombre de récepteurs à la transferrine, observée par immunofluorescence directe et un plus grand nombre d'antigènes membranaires MO1 observés par immunofluorescence indirecte. Les doses d'alcools gras à longue chaîne de l'invention utilisées sont de l'ordre de 0,01 à $100 \mu\text{M}$ en culture, plus particulièrement 0,1 à $10 \mu\text{M}$. Les doses correspondantes pour l'utilisation in vivo sont de l'ordre de 0,1 à 10mg/kg.

L'utilisation des dérivés de l'invention permet donc de favoriser la différenciation des cellules cancéreuses ou précancéreuses, en particulier les précurseurs des macrophages, lymphocytes et monocytes.

Ils augmentent en particulier leur activité phagocytaire et tumoricide.

5 **EXEMPLE 5 : EFFET CYTOTROPHIQUE SUR DES PROMYELOCYTES LEUCEMIQUES HL60.**

10 L'utilisation de promyélocytes leucémiques HL60 permet d'étudier in vitro leur différenciation en monocytes ou en granulocytes. Les cellules HL60 sont
15 cultivées en milieu RPMI contenant 20% de sérum foetal de veau ; elles sont ensemencées à une densité de 3×10^5 cellules par ml et repiquées deux fois par semaine (N.Mendelsohn et al sus-mentionné). Au moment de la
20 mise en culture on ajoute des alcools gras à longue chaîne de l'invention à des concentrations allant de 0,01 à $100 \mu\text{M}$ qu'on utilise comme signal différenciateur. Après 5 jours de culture, on étudie la différenciation des cellules HL60 en monocytes ou en granulocytes, qu'on peut mesurer par des changements
25 morphologiques après coloration au May-Grünwald-Giemsa et par leur capacité de réduire le nitrobleu de tétrazolium. Les cellules indifférenciées contiennent moins de 3% de cellules capables de réduire ce composé. Dans les cultures traitées par les dérivés de
30 l'invention, ce pourcentage est significativement augmenté, alors que le volume cellulaire diminue sensiblement. On observe également une alcalinisation du milieu intra-cellulaire, caractéristique de la différenciation en monocytes ou en granulocytes.

35 Pour mesurer l'expression des récepteurs à la transferrine, on utilise une méthode d'immunofluorescence directe ; après avoir rincé les

cellules, on les incube avec l'anticorps antirécepteur à la transferrine couplé à la fluorescéine pendant 1 h à +4°C. On filtre la suspension cellulaire sur voile de nylon, avant le passage au cytofluoromètre. On observe une diminution des récepteurs à la transferrine dès le 2^e jour de culture. On étudie ensuite l'expression de marqueurs phénotypiques, comme les antigènes membranaires MO2, spécifiques des monocytes, et MO1, présents sur les monocytes et les granulocytes. Le marquage se fait avec des anticorps anti-MO1 et anti-MO2 (Coultronics), suivi d'une incubation pendant 1 h à +4°C avec l'anticorps de lapin anti-souris couplé à la fluorescéine. A partir de 3 jours de culture, le pourcentage de cellules exprimant MO1 augmente, alors que l'expression de MO2, spécifique des monocytes apparaît après 4 ou 5 jours, lorsque les cultures sont maintenues en présence d'alcools gras à longue chaîne de l'invention.

Le marquage à l'iodure de propidium montre que les cellules s'accumulent dans la phase G0/G1 du cycle cellulaire. Au cours de la différenciation de cellules HL60, on observe également une augmentation de l'activité protéine kinase AMPc dépendante, une augmentation de l'activité de la transglutaminase et une diminution de l'expression de l'oncogène c-myc.

Ces résultats montrent que les alcools gras à longue chaîne de l'invention utilisés à des doses allant de 0,01µM à 100µM, et plus particulièrement 0,1 à 10µM, permettent d'induire la différenciation de promyélocytes en granulocytes ou en monocytes. Les cellules induites possèdent les caractéristiques de

différenciation des granulocytes et monocytes, en particulier leur activité phagocytaire, qui leur permet de jouer un rôle fondamental dans la protection de l'organisme contre le développement de tumeurs cancéreuses.

8) exemples de milieux de culture utilisés en association avec les dérivés de l'invention.

10 a) Culture de cellules neuronales

Minimum Essential Medium (Milieu Minimum Essentiel) modifié par DULBECCO (DMEM) selon DULBECCO, R., FREEMANN G., Virology, 8, (1959) 396, additionné de :

15	transferrine	100 µg/ml
		(concentrations finales)
	insuline	5 µg/ml
	selenium	30 nM
	putrescine	0,1 mM
20	progestérone	20 nM
	hexacosanol	500 nM

b) Culture de kératinocytes ou de fibroblastes

Minimum Essential Medium selon EAGLE, H., Science, 130, (1959), 432

25 additionné de :

EGF (facteur de croissance de l'épiderme)	10 ng/ml
hydrocortisone	0,4 µg/ml
hexacosanol	1 µM

c) Culture de cellules endothéliales ou mésengiales

30 Milieu 199 selon MORGAN, J.F., et coll., Proc. Soc. Exp. Biol. Med.; 73 (1950), 1 :50 Vol%

Milieu RPMI 1640 selon MOORE, G.E. et coll., J. Am. Med. Assoc., 199, (1967) 519 :50 Vol%

additionnés de :

	HEPES	10 mM
5	L-glutamine	2 mM
	hexacosanol	1 μ M

d) Culture d'hépatocytes

Milieu Ham F12 selon HAMM, R.G., Proc. Nat. Acad. Sci., 53 (1965) 288

10 additionné de :

	BSA (bovine serum albumine)	1 g/l
	insuline	10 mg/l
	hexacosanol	10 μ M

e) Culture de mycoplasmes

15 Pour 200 ml de milieu complet, il faut :

- 140 ml de milieu PPLO, comprenant :

	. protéines de coeur de boeuf	50 g
	. peptone	10 g
	. NaCl	5 g

20 (quantités pour préparer 1 l dans l'eau distillée)

- 60 ml d'une préparation comprenant :

	. 25 % extrait de levure	1 part
	. sérum de cheval normal	2 parts

- additionnés de :

25	rouge de phénol à 0,4 %	1.0 ml
	glucose à 50 g pour 100 ml	4.0 ml
	pénicilline (100.000 μ ./ml)	6.0 ml
	acétate de thalium à 10 %	0.5 ml
	hexacosanol 20 mM	0.5 ml

30 **f) Culture de lymphocytes et macrophages**

Milieu RPMI 1640 selon MOORE et coll., J. Am. Med. Assoc., 199 (1967) 519

additionné de :

	L-alanine	8,9 mg/l
	(concentration finale)	
5	L-asparagine	15,0 mg/l
	acide L-aspartique	13,3 mg/l
	acide L-glutamique	14,7 mg/l
	glycine	7,5 mg/l
	L-proline	11,5 mg/l
10	L-sérine	10,5 mg/l
	sérum de veau	5 %
	hexacosanol	1 μ M

15

20

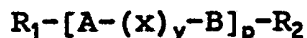
25

30

35

REVENDICATIONS

1. Dérivés d'alcools gras, caractérisés par la formule générale suivante :



5 dans laquelle

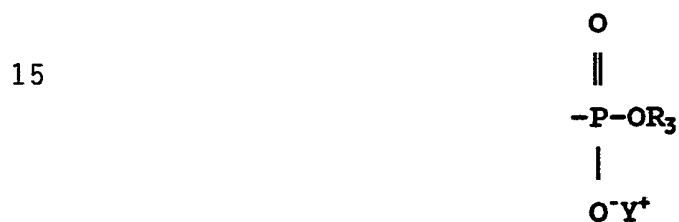
- p est égal à 1 ou 2,

- R_1 et R_2 , identiques ou différents, représentent :

. un atome d'hydrogène,

10 . un atome d'halogène, notamment un atome de fluor,

. un groupe -OR, dans lequel R représente un atome d'hydrogène ou un dérivé de l'acide monophosphorique de formule :



20 dans laquelle R_3 représente un atome d'hydrogène, un atome d'halogène, notamment de fluor, un nucléotide, du glucose, du galactose, un acide aminé ou un peptide ou une protéine, et Y représente un ion métallique, de préférence Na^+ , K^+ , NH_4^+ ,

. un groupe de formule :



30 le cas échéant substitué par un, ou plusieurs, atome d'halogène, notamment de fluor, ou un, ou plusieurs, groupe -CH₃, et/ou -OH et/ou -OR, R étant tel que défini ci-dessus, et/ou un groupe oxy (= O),

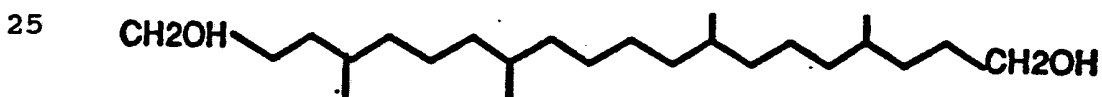
- y = 0 ou 1,

- A-(X)_y-B est une chaîne hydrocarbonée comprenant de 20 à 28 atomes de carbone dans laquelle A et B, respectivement identiques ou différents sont des chaînes aliphatiques saturées ou non, le cas échéant substituée par un, ou plusieurs atomes d'halogène, notamment de fluor, ou par un, ou plusieurs groupes alcoyles de 1 à 3 atomes de carbone, et X est également une séquence comprenant une chaîne hydrocarbonée engagée dans une structure cyclique, cette dernière chaîne hydrocarbonée comprenant, le cas échéant, une fonction carbonyle ou oxycarbonyle, lesdits dérivés comportant au moins un groupe -OR, R ayant la signification indiquée ci-dessus.

2. Dérivés caractérisés par la formule générale
indiquée dans la revendication 1, le n-hexacosanol
étant exclu.

3. Dérivés selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisés en ce que $p = 1$.

20 4. Dérivés selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés par les formules suivantes :



comportant respectivement, le cas échéant, 1 à 10 et 1
30 à 9 double(s) liaison(s), de préférence 1 à 5
double(s) liaison(s).

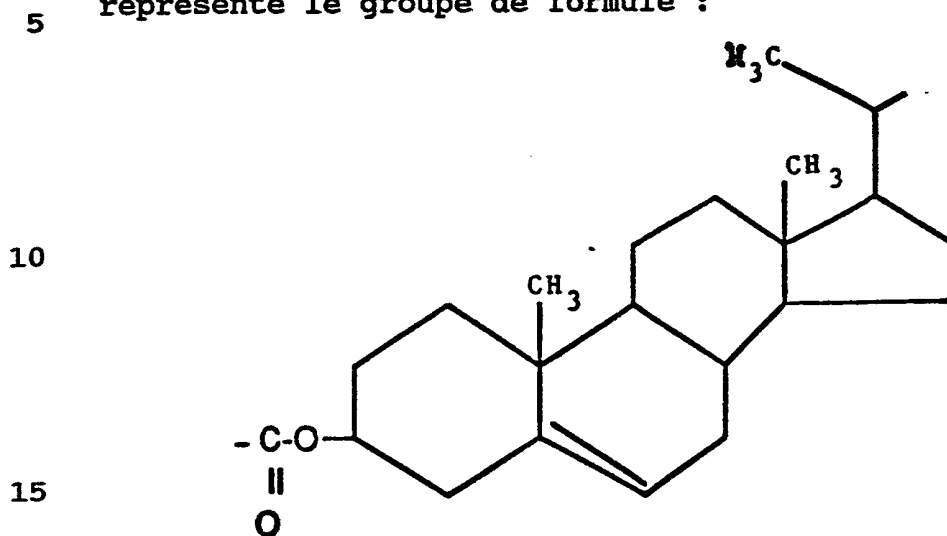
5. Dérivés selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés par la formule suivante:



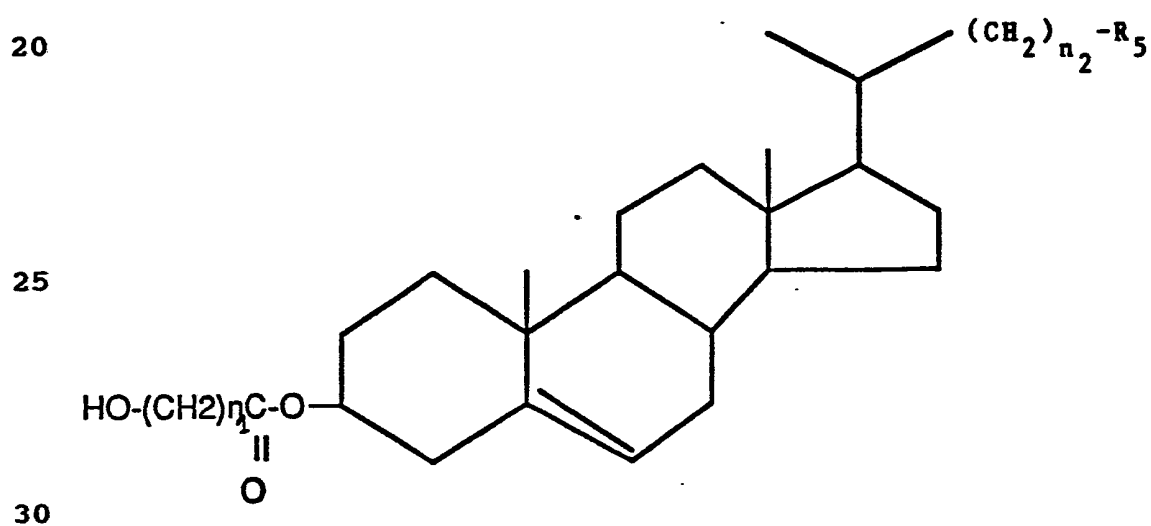
72

comportant respectivement, le cas échéant, 1 à 5 et 1 à 4 double(s) liaison(s).

6. Dérivés selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que $y = 1$ et X représente le groupe de formule :



7. Dérivés selon la revendication 6, caractérisés par la formule suivante :



35

comportant, le cas échéant, 1 à 7 double(s) liaison(s), et dans laquelle n_1 et n_2 sont des nombres entiers variant de 1 à 15, R_5 représente H ou OH.

5 8. Dérivés selon la revendication 1, caractérisés en ce que $p = 2$.

9. Composition pharmaceutique comprenant au moins un dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

10 10. Composition selon la revendication 9, comprenant entre 0,5 mg et 500 mg d'un dérivé selon l'une des revendications 1 à 8.

11. Utilisation d'un dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour l'obtention d'un médicament pour :

15 - le traitement ou la prévention de la dégénérescence neuronale, en particulier au cours des maladies neurodégénératives et la perte neuronale liée à des composés chimiques ou à des acides aminés excitateurs, comme l'acide glutamique,

20 - le traitement ou la prévention des lésions du tissu nerveux chez les mammifères, qu'il s'agisse de lésions traumatiques, de lésions chimiques, de lésions dues à une maladie ou à un déficit congénital,

25 - le traitement de la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, la chorée de Huntington et autres maladies neurodégénératives, la dégénérescence wallérienne, le vieillissement cérébral et des maladies génétiques comme le syndrome de Down,

30 - le traitement et la prévention des lésions cérébrales liées à la neurochirurgie (l'administration de ces compositions se faisant concomitamment à la chirurgie),

- la cicatrisation de lésions cutanées, ainsi que le traitement et la prévention des phénomènes liés au vieillissement de la peau,
- la réparation de lésions vasculaires (d'origine traumatique ou chimique), ainsi que le traitement et la prévention des phénomènes de thrombose et d'athérosclérose,
- le traitement et la prévention de la dégénérescence du tissu hépatique, rénal ou cardiaque, en particulier lorsqu'elle est due à des composés chimiques ou médicamenteux toxiques pour ces organes,
- le traitement et la prévention des ulcères gastriques et duodénaux,
- le traitement des déficits acquis ou héréditaires de l'immunité,
- le traitement des processus inflammatoires et allergiques aigus, comme l'asthme, la rhinite allergique, le choc anaphylactique ou l'urticaire,
- le traitement et la prévention de la néoplasie et de de tumeurs, telles que les tumeurs hépatiques ou celles des os, et la prévention de la propagation de métastases provenant de tumeurs cancéreuses,
- le traitement et la prévention de toutes les pathologies liées aux bactéries gram⁺ et aux mycoplasmes, en particulier les infections pulmonaires, uro-génitales et buccales,
- le traitement et la prévention des pathologies liées aux virus à enveloppe, comme l'Herpès, la rage, le SIDA.

30

35

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 8913456
FA 435747

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	EP-A-0 105 404 (MERCK) * page 11, exemple 3; page 15, exemple 8 *	1-3,6
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS tome 101, no. 13, 24 septembre 1984, abrégé no. 110375n (Shiseido Co.), Columbus, Ohio, US; & JP-A-5962548, 02.05.1984; & Formula Index, tome 101F2 (1984 * page 2757F, colonne 3, lignes 5-8 *	1-3,6,7
X	--- EP-A-0 098 620 (EISAI) * revendications 1,3 *	1-3,5
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS vol. 99, no. 19, 7 novembre 1983, page 251, abrégé no. 1541346, Columbus, Ohio, US; S.A. KEILBOUGH et al.: "Photolysis of cholesteryl diazoacetate in small unilamellar vesicles"; & CA Formula Index 99F2 (1983), page 2443F, lignes 30,31, colonne 1; & Biochemistr, 1983, 22 (22) 5069-8	1-3,6,7
X	--- DE-A-2 551 914 (HOECHST) * revendication 1 *	1-3

-/-		
Date d'achèvement de la recherche 28-06-1990		Examineur PROBERT C.L.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>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</p> <p>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</p>		

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 8913456
FA 435747

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY vol. 105, no. 10, 18 mai 1983, pages 3263-3266, publ. American Chemical Society, Columbus, Ohio, US; S.A. KEILBOUGH et al.: "Synthesis and Photoreactivity of Cholesteryl Diazoacetate: A Novel Photolabeling Reagent" * page 3285, colonne 1, lignes 11-13 *	1-3,6,7
X	--- BEILSTEINS HANDBUCH DER ORGANISCHEN CHEMIE vol. 1, 4e édition, 1918, Julius Springer Verlag, Berlin, GE; * page 431, paragraphs 4,8,10; page 453, paragraph 7 *	1-3
X	--- DE-A-2 023 129 (SCHERING) * page 19, revendication 16 *	1-3,6
X	--- BEILSTEINS HANDBUCH DER ORGANISCHEN CHEMIE vol. 1, 4e édition, 2e supplément, 1941, Julius springer Verlag, Berlin, GE; * page 469, paragraph 4; page 470, paragraphs 3,8 *	1-3
	--- -/-	
Date d'achèvement de la recherche 28-06-1990		Examineur PROBERT C.L.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES 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		

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 8913456
FA 435747

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	CHEMICAL ABSTRACTS vol. 95, no. 25, 21 décembre 1981, page 532, abrégé no. 220215a, Columbus, Ohio, US; J.I. TENG et al.: "Sterol metabolism. XLVI. Synthesis of oxidized cholesterol fatty acyl esters."; & J. Steroid Biochem. 1981, 14(6), 569-73; & CA Formula Index 95F2, page 3007, colonne 3, lignes 10-12; page 3026, colonne 2, lignes 69-70 ---	1-3,6
X	BEILSTEINS HANDBUCH DER ORGANISCHEN CHEMIE vol. 1, 2e partie, 4e édition, 3. supplément, 1958, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, GE; * page 1848, paragraph 4; page 1849, paragraphs 2,4 * ---	1-3
X	DE-B-2 459 985 (LION DENTIFRICE) * revendications 1,3 * ---	1-3,11
A	DE-A-3 237 632 (HENKEL) * revendications 9-11 * ---	1
A	WO-A-8 401 899 (G. MOTSCHAN) * pages 4,5; revendication 1 * ---	1,11
X	CHEMICAL ABSTRACTS vol. 100, no. 19, 7 mai 1984, page 449, abrégé no. 155572v, Columbus, Ohio, US; G. MOZSIK et al.: "Cytoprotective effect of vitamin A and carotenoids on the injury of the gastric mucosa caused by 0.6 M hydrochloric acid" & Taplakozastud. Helyzete Feladatai Magyarorszag, 8. 1981, pages 781-791 --- -/-	1,11
Date d'achèvement de la recherche 28-06-1990		Examineur PROBERT C.L.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>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</p> <p>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</p>		

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 8913456
FA 435747

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée		
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes			
X	CHEMICAL ABSTRACTS vol. 75, no. 9, 30 août 1971, page 230, abrégé no. 61125y, Columbus, Ohio, US; H.P. EHRLICH et al.: "Effects of beta-carotene, vitamin A, and glucocorticoids on collagen synthesis in wounds" & Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1971, vol. 137, no. 3, pages 936-938 ---	1,11		
X	CHEMICAL ABSTRACTS vol. 93, no. 7, 18 août 1980, page 44, abrégé no. 61142q, Columbus, Ohio, US; D.D. AUPERIN et al.: "Characterization of virucidal activities of retinoids" & Curr. Chemother. Infect. Dis., Proc. Int. Cong. Chemother. 11th 1979, vol. 2, pages 1368-1370 -----	1,11		
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)		
Date d'achèvement de la recherche 28-06-1990		Examineur PROBERT C.L.		
<table><tr><td>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES 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</td><td>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</td></tr></table>			CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES 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
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES 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			