



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

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 31/265	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/44919 (43) Date de publication internationale: 15 octobre 1998 (15.10.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00712 (22) Date de dépôt international: 8 avril 1998 (08.04.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/04283 8 avril 1997 (08.04.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE INTERNATIONAL DE RECHERCHES DERMATOLOGIQUES GALDERMA (C.I.R.D. GALDERMA) [FR/FR]; Sophia Antipolis, 635, route des Lucioles, F-06560 Valbonne (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): QUASH, Gérard, Anthony [FR/FR]; 12, allée des Charmilles, F-69340 Francheville (FR). (74) Mandataire: TEZIER HERMAN, Béatrice; L'Oréal - D.P.I., 90, rue du Général Roguet, F-92583 Clichy Cedex (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: USE OF AMINOTHIOLESTER DERIVATIVES IN PHARMACEUTICS (54) Titre: UTILISATION DE DERIVES AMINOTHIOLESTERS DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE (57) Abstract The invention concerns the use of at least an aminothiolester derivative for preparing a pharmaceutical composition for lifting the inhibition of a characteristic resistant to apoptosis induction in transformed cells, said characteristic arising from the presence of bcl2 gene in said cells. The pharmaceutical composition is more particularly for treating pathologies including breast cancer, B cell lymphoma, leukaemia, neuroblastoma, prostate adenocarcinoma, prolactinoma and other pituitary adenomas. (57) Abrégé Utilisation d'au moins un dérivé aminothiolester pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à lever l'inhibition d'un caractère résistant à l'induction d'apoptose de cellules transformées, ce caractère étant dû au gène bcl2 présent dans ces cellules. La composition pharmaceutique est plus particulièrement destinée à traiter les pathologies choisies parmi les cancers du sein, les lymphomes des cellules B, les leucémies, les neuroblastomes, les adénocarcinomes de la prostate, les prolactinomes et autres adénomes pituitaires.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

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

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

UTILISATION DE DERIVES AMINOTHIOLESTERS
DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE

5 La présente invention concerne l'utilisation de dérivés aminothiolesters dans la préparation d'une composition pharmaceutique en vue de lever l'inhibition d'apoptose due à la présence du gène bcl_2 dans des cellules transformées.

10 Il existe deux types de mécanisme impliqués dans la mort des cellules. Le premier de type classique est appelé la nécrose. Morphologiquement, la nécrose est caractérisée par un gonflement des mitochondries et du cytoplasme et par une altération nucléaire, suivi de la destruction de la cellule et son autolyse, ceci étant accompagné par un phénomène d'inflammation. La nécrose survient de manière passive et incidente. La
15 nécrose tissulaire est généralement due à un trauma physique des cellules ou un poison chimique, par exemple.

L'autre forme de mort cellulaire est appelée l'apoptose [Kerr, J.F.R. and Wyllie, A.H., Br. J. Cancer, 265, 239 (1972)], mais contrairement à la nécrose l'apoptose n'entraîne pas un phénomène d'inflammation. Il est décrit que l'apoptose peut se réaliser sous
20 différentes conditions physiologiques. C'est une forme hautement sélective du suicide cellulaire qui se caractérise par des phénomènes morphologiques et biochimiques aisément observables. Ainsi, on observe notamment une condensation de la chromatine associée ou non à une activité endonucléasique, la formation de corps apoptiques et une fragmentation de l'acide désoxyribonucléique (A.D.N.) par l'activation
25 d'endonucléases en des fragments d'ADN de 180-200 paires de bases (ces fragments peuvent être observés par électrophorèse sur gel d'agarose).

L'apoptose peut être considérée comme une mort programmée des cellules impliquée dans le développement, la différenciation et le renouvellement tissulaire. Il est
30 également considéré que la différenciation, la croissance et la maturation des cellules sont étroitement liées à l'apoptose et que les substances capables de jouer un rôle sur la différenciation, la croissance et la maturation des cellules sont aussi liées au phénomène de l'apoptose.

35 Il a déjà été décrit dans la demande de brevet WO 96-20701 déposée par la Demanderesse un composé choisi parmi le méthional, le malondialdéhyde et tout facteur augmentant le taux intracellulaire du méthional ou du malondialdéhyde pour une utilisation comme médicament, ce médicament étant plus particulièrement destiné à augmenter le phénomène de la mort programmée des cellules (l'apoptose) et ainsi peut

permettre de traiter de nombreuses maladies, plus particulièrement les maladies liées à une hyperprolifération cellulaire, telles que dans le cas du cancer, des maladies auto-immunes ou des allergies. Toutefois, l'addition de méthional exogène à des cellules en culture inhibe autant la croissance des cellules transformées que celle des cellules normales.

Pour essayer d'augmenter le taux de méthional endogène dans les cellules transformées, mais pas dans les cellules normales, son métabolisme a été étudié.

10 Ainsi, dans le métabolisme du méthional, il est connu que l'acide 4-méthylthio-2-oxobutanoïque peut être métabolisé in vivo par le complexe déshydrogénase oxo-acide à chaîne branchée présent dans les mitochondries des cellules du foie, du coeur, et du muscle squelettique via le méthional pour donner le méthylthiopropionylCoA [cf. Wu, G. & Yeaman, S.J. (1989) *Biochem. J.* 257, 281-284; Haussinger, D., Stehle, T. & Gerok, W. (1985) *J. Biol. Chem.* 366, 527-536; Jones, S.M.A. & Yeaman, S.J. (1986) *Biochem. J.* 237, 621-623]. Il est également décrit que l'acide 4-méthylthio-2-oxobutanoïque peut être métabolisé in vivo par transamination en méthionine [cf. Ogier, G., Chantepie, J., Deshayes, C., Chantegrel, B., Charlot, C., Doutheau, A & Quash, G. (1993) *Biochem. Pharmacol.* 45, 1631-1644]. Le méthional peut éventuellement aussi être réduit ou oxydé respectivement en méthionol par une aldéhyde réductase ou en acide méthylthiopropionique par une aldéhyde déshydrogénase. Le méthional en association avec le radical HO^{*} peut enfin donner du malondialdéhyde et du méthane thiol par une réaction de β -hydroxylation [Quash, G., Roch, A.M., Chantepie, J., Michal, Y., Fournet, G., et Dumontet, C. (1995) *Biochem. J.* 305, 1017-1025].

25

Dans ce qui suit, les abréviations suivantes peuvent être utilisées :

- MTOB représente l'acide 4-méthylthio-2-oxobutanoïque ;
- MTPA représente l'acide méthylthiopropionique ;
- E1 représente la décarboxylase du complexe déshydrogénase oxo-acide à chaîne branchée dont le co-facteur est la thiamine pyrophosphate (TPP) ;
- E2 représente la transacylase du complexe déshydrogénase oxo-acide à chaîne branchée dont le co-facteur est l'acide thioctique (TA) ;
- ALDR représente l'aldéhyde réductase ;
- ALDH représente l'aldéhyde déshydrogénase.

35

Il a également été décrit que des inhibiteurs de la transaminase impliquée dans la transformation du MTOB en méthionine, qui sont des composés d'esters de la L-méthionine et de pyridoxal, inhibent sélectivement la croissance de plusieurs types de

cellules transformées mais pas celle de cellules normales MRC5 et induisent faiblement l'apoptose également dans les cellules lymphoïdes BAF3 mises en culture en présence d'interleukine 3.

- 5 Dans le cas de pathologies qui sont caractérisées par une surexpression du gène bcl2, tels que notamment les cancers du sein, les lymphomes des cellules B, les leucémies, les neuroblastomes, les adenocarcinomes de la prostate, les prolactinomas et autres adénomes pituitaires, cette surexpression du gène bcl2 confère aux cellules une résistance à l'apoptose et donc à la chimiothérapie ou aux antiandrogènes (Miyashita, T. and Reed, J.C. (1993) Blood 81, 151-157 ; Furuya, Y. et al. (1996) Clinical Cancer Research 2, 389-398).

15 Par ailleurs, il a été décrit que l'addition d'un inhibiteur de l'enzyme ALDH, le disulfiram (à 50 μ M), à des cellules BAF3-bo induisait la fragmentation dans 30% de l'ADN cellulaire, typique de l'apoptose, tandis que dans les cellules BAF3-bcl2, résistantes à l'apoptose, cette augmentation ne dépassait pas 5% (Roch, A.-M. et al., (1996) Biochem. J. 313, 973-981). L'augmentation de la concentration de disulfiram n'a pas permis d'obtenir un pourcentage de fragmentation plus élevé à cause de la toxicité intrinsèque de ce produit.

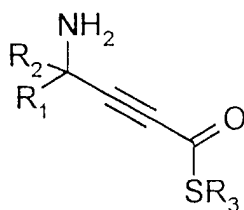
20 Un des buts de la présente invention est donc d'inhiber partiellement, voire totalement, ce caractère résistant à l'induction d'apoptose dû au gène bcl2 présent dans les cellules transformées.

25 Ce but et d'autres sont atteints par la présente invention qui concerne l'utilisation d'au moins un dérivé aminothiolester de formule (I) pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à lever l'inhibition d'un caractère résistant à l'induction d'apoptose de cellules transformées, ce caractère étant dû au gène bcl2 présent dans ces cellules.

30 La présente invention concerne également l'utilisation d'au moins un dérivé aminothiolester de formule (I) pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à lever l'inhibition du caractère résistant à la chimiothérapie ou aux antiandrogènes de cellules transformées.

35 Plus particulièrement, le caractère résistant à la chimiothérapie ou aux antiandrogènes de cellules transformées est dû au gène bcl2 présent dans ces cellules.

Les dérivés aminothiolesters présentent la formule (I) suivante :



(I)

- 5 dans laquelle R1, R2 et R3, indépendamment, représentent un radical alkyle, linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé, de C1-C6.

Parmi les radicaux alkyle linéaire saturé ayant de 1 à 6 atomes de carbone, on peut citer notamment les radicaux méthyle, éthyle, propyle, butyle, pentyle, hexyle.

10

Parmi les radicaux alkyle ramifiés saturés ayant de 1 à 6 atomes de carbone, on peut citer notamment les radicaux 2-méthylbutyle, 2-méthylpentyle, isopropyle et tertibutyle.

- 15 Parmi les radicaux alkyle insaturés ayant de 1 à 6 atomes de carbone, on peut citer notamment le radical allyle.

De préférence, R1, R2 et R3, indépendamment, représentent un radical alkyle de C1 à C3.

- 20 De préférence, R1 et R2 représentent un radical méthyle et R3 un radical choisi parmi le radical méthyle, éthyle et propyle.

De manière avantageuse, R1, R2 et R3 représentent le radical méthyle.

- 25 On utilise avantageusement un composé de formule (I) dans laquelle l'amine est sous forme d'ammonium, de préférence sous forme d'ammonium organique et avantageusement sous forme de formiate ou d'acétate d'ammonium. Sous forme d'ammonium, les composés de formule (I) présentent l'avantage d'être hydrosolubles, et donc facilement utilisables.

30

Ces composés peuvent être obtenus par (1) réaction d'un dérivé dialkylpropargylamine, dans lesquels la fonction amine est protégée (ces composés sont décrits dans la demande de brevet EP 0 133 407), avec une base très forte pour donner le carbanion du radical propargyle, (2) on fait réagir ensuite ce carbanion avec un oxysulfure de carbone, puis (3) on réalise une réaction d'alkylation sur le soufre du produit obtenu en

35

(2) et enfin (4) on déprotège l'amine. Pour obtenir le composé de formule (I) sous forme d'ammonium, on utilise tout moyen connu en soi. Ainsi, pour obtenir le composé de formule (I) sous forme de formiate ou d'acétate d'ammonium, on fait réagir le composé obtenu à l'étape (4) avec respectivement l'acide formique ou l'acide acétique.

5

D'autres caractéristiques, aspects, objets et avantages de l'invention apparaîtront encore plus clairement à la lecture de la description qui va suivre, ainsi que des divers exemples concrets, mais nullement limitatifs, destinés à l'illustrer.

10 La figure 1 représente le pourcentage de fragments d'ADN obtenus dans des cellules BAF-bcl2 mises en culture pendant 6 heures avec différents composés en fonction des concentrations (exprimées en μM) de ces différents composés qui sont : l'amino-4 méthyl-4 pentyne-2 al-1 (représenté par $\square$), le 4-amino-4-méthylpent-2-yne thioate de S-méthyle (représenté par $\blacksquare$) et le mélange du 4-amino-4-méthylpent-2-yne thioate de S-méthyle (à différentes concentrations) et de méthional à 200 μM (représenté par $\bullet$).

15

La figure 2 représente le pourcentage de fragments d'ADN obtenus dans des cellules BAF-b0 mises en culture pendant 6 heures avec différents composés en fonction des concentrations (exprimées en μM) de ces différents composés qui sont : l'amino-4 méthyl-4 pentyne-2 al-1 (représenté par $\square$), le 4-amino-4-méthylpent-2-yne thioate de S-méthyle (représenté par $\blacksquare$) et le mélange du 4-amino-4-méthylpent-2-yne thioate de S-méthyle (à différentes concentrations) et de méthional à 200 μM (représenté par $\bullet$).

20

La figure 3 représente le pourcentage de fragments d'ADN obtenus dans des cellules LNCaP (ATCC CRL 1740) mises en culture pendant 6 jours avec le 4-amino-4-méthylpent-2-yne thioate de S-méthyle (représenté par $\blacksquare$) en fonction des concentrations de ce composé (exprimées en μM).

25

Ces composés de formule (I) qui inhibent l'activité de l'enzyme ALDH présentent l'avantage d'être de type "suicide" (liaison covalente irréversible avec l'enzyme ALDH), de ne pas être toxique et d'inhiber la croissance des cellules transformées (cancéreuses) et non pas celle des cellules normales.

30

Les pathologies qui sont caractérisées par une surexpression du gène bcl2 sont notamment les cancers du sein, les lymphomes des cellules B, les leucémies, les neuroblastomes, les adenocarcinomes de la prostate, les prolactinomas et autres adénomes pituitaires.

35

La composition pharmaceutique selon l'invention comprend un milieu physiologiquement acceptable.

5 L'administration de la composition selon l'invention peut être effectuée par voie entérale, parentérale, topique ou oculaire. De préférence, la composition pharmaceutique est conditionnée sous une forme convenant à une application par voie systémique (pour injection ou perfusion).

10 Par voie entérale, la composition, plus particulièrement la composition pharmaceutique, peut se présenter sous formes de comprimés, de gélules, de dragées, de sirops, de suspensions, de solutions, de poudres, de granulés, d'émulsions, de microsphères ou nanosphères ou vésicules lipidiques ou polymériques permettant une libération contrôlée. Par voie parentérale, la composition peut se présenter sous forme de solutions ou suspensions pour perfusion ou pour injection.

15 Les composés de formule (I) selon l'invention sont généralement administrés à une dose journalière d'environ 0,001 mg/kg à 100 mg/kg en poids corporel en 1 à 3 prises.

20 Par voie topique, la composition pharmaceutique selon l'invention est plus particulièrement destinée au traitement de la peau et des muqueuses et peut se présenter sous forme d'onguents, de crèmes, de laits, de pommades, de poudres, de tampons imbibés, de solutions, de gels, de sprays, de lotions ou de suspensions. Elle peut également se présenter sous forme de microsphères ou nanosphères ou vésicules lipidiques ou polymériques ou de patches polymériques et d'hydrogels permettant une
25 libération contrôlée. Cette composition par voie topique peut se présenter soit sous forme anhydre, soit sous forme aqueuse.

Par voie oculaire, ce sont principalement des collyres.

30 Les composés de formule (I) sont utilisés par voie topique ou oculaire à une concentration généralement comprise entre 0,0001 % et 10 % en poids, de préférence entre 0,01 et 1 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

35 Les compositions telles que décrites précédemment peuvent bien entendu en outre contenir des additifs inertes ou même pharmacodynamiquement actifs ou des combinaisons de ces additifs, et notamment : le méthional, de nombreux agents antinéoplasiques, tels que par exemple la dexaméthasone, la cyclophosphamide, le

cisplatine, l'étoposide et le BCNU (N,N-Bis(2-chloroéthyl)-N-nitrosourea), qui sont également capables d'induire l'apoptose.

5 Ainsi, la présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend, dans un support physiologiquement acceptable, au moins un composé de formule (I), tel que décrit ci-dessus, et au moins un composé choisi parmi le méthional et un agent antinéoplasique.

10 Cette composition est donc plus particulièrement destinée à traiter, de manière préventive ou curative, des maladies liées à une hyperprolifération cellulaire, telle que les cancers, des maladies auto-immunes ou allergiques.

La composition pharmaceutique comprend de préférence le méthional et au moins un composé de formule (I), tel que décrit ci-dessus.

15 De préférence, l'agent antinéoplasique est capable d'induire l'apoptose et peut ainsi être choisi parmi ceux cités ci-dessus.

20 La composition selon l'invention peut être sous forme d'un kit comprenant au moins un composé de formule (I), tel que décrit ci-dessus, et au moins un composé choisi parmi le méthional et un agent antinéoplasique, les composés de ce kit étant conditionnés de manière séparée.

25 Bien entendu, l'homme du métier veillera à choisir le ou les éventuels composés à ajouter à ces compositions de telle manière que les propriétés avantageuses attachées intrinsèquement à la présente invention ne soient pas ou substantiellement pas altérées par l'addition envisagée.

30 On va maintenant donner, à titre nullement limitatif, plusieurs exemples destinés à illustrer la présente invention.

EXEMPLE 1

35 Procédé de préparation du 4-amino-4-méthylpent-2-yne thioate de S-méthyle

A une solution de 4,51g (20 mM) de N,N-(1,2-bis(diméthylsilyl)éthane)-1,1-diméthylpropargylamine (décrit dans la demande de brevet EP 0 133 407) dans 100ml

de tétrahydrofuranne, on ajoute en 5 minutes à -70°C 16 ml d'une solution 1,5 M de n-butyllithium dans l'hexane. On laisse le milieu réactionnel revenir à température ambiante en 30 minutes puis on agite encore 1 heure à cette température (18°C). Après retour à -70°C on cannule 9 ml d'oxysulfure de carbone préalablement condensé.

5 Après une heure d'agitation à -70°C puis 30 minutes à +3°C on ajoute 1,31 ml (21mM) d'iodure de méthyle et on poursuit l'agitation pendant 2 heures à cette température.

Après dilution dans 400 ml d'éther, on lave par une solution saturée de chlorure de sodium, on sèche sur sulfate de sodium et on évapore sous vide, l'amine est débloquent sur gel de silice tel que décrit dans la demande de brevet EP 0 133 407., on isole ainsi

10 2g (63%) de l'amine.

EXEMPLE 2

Procédé de préparation du formiate de 4-amino-4-méthylpent-2-yne thioate de S-méthyle

15

A 418 mg (2,7 mM) de l'amine obtenu à l'exemple 1 dans l'éther anhydre, on ajoute 2,7 mM d'acide formique en solution dans 2 ml d'éther à 0°C. On agite 5 minutes, puis on porte à température ambiante et on évapore à sec. Après reprise dans l'éther anhydre, on disperse le solide et on élimine le surnageant, puis on sèche sous vide et on isole 415 mg (77%) du formiate d'amine désiré.

20

EXEMPLE 3

25

Effet de différents composés sur l'induction d'apoptose dans les cellules BAF3-b0 et BAF3-bcl2

Les cellules utilisées correspondent à une lignée cellulaire lymphocytaire de souris BAF3 qui requiert de l'interleukine 3 (IL3) pour croître et qui subit l'apoptose (plus de 80% des cellules) en l'absence d'IL3 en 16 heures [cf. Collins, M.K.L., Marvel, J., Malde, P. & Lopez-Rivas, A. (1992) J. Exp. Med. 176, 1043-1051].

30

Les cellules BAF3-bcl2 correspondent à des cellules BAF3 transfectées par le gène bcl2, les cellules BAF3-b0 correspondent à des cellules BAF3 non transfectées par le gène bcl2.

35 Comme précisé précédemment, les cellules BAF3-b0 subissent l'apoptose (plus de 80% des cellules) en l'absence d'IL3 en 16 heures. Par contre, les cellules BAF3-bcl2 qui sont donc transfectées par le gène bcl2 ne présentent aucun signe d'apoptose en l'absence d'IL3.

Les cellules BAF3-b0 ou BAF3-bcl2, mises en culture en présence d'IL3, sont marquées par une adaptation de la méthode décrite dans Wright, S. et al. (1992) J. of Cell. Biochem. 48, 344-355, en incubant $2,5 \cdot 10^5$ cellules /ml avec 0,5 μ Ci [3H]-thymidine pendant 40 heures à 37°C. Après deux lavages avec un milieu de culture, $2,5 \cdot 10^6$ cellules sont mises en culture en présence de différents composés à tester. Après incubation pendant 6 heures, ces cellules sont récupérées par centrifugation à 400g pendant 5 minutes et lavées 3 fois dans du tampon PBS. Les cellules récupérées dans le culot sont lysées dans 2ml de 0,1% de Triton X-100, 20mM EDTA, 5mM Tris pH8 et centrifugées à 30000g à 4°C pendant 30 minutes. Les surnageants sont récupérés et les culots dissous dans 0,3 ml de 0,5 N NaOH. Des aliquots du milieu de culture (1ml), du surnageant (0,3ml) et du culot solubilisé (0,1ml) sont mis à doser dans le compteur à scintillation. Le pourcentage de fragments d'ADN est calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ de fragments d'ADN} = \frac{\text{dpm du milieu de culture} + \text{dpm du surnageant}}{\text{dpm du milieu de culture} + \text{dpm du surnageant} + \text{dpm du culot solubilisé}}$$

Les résultats sont rassemblés dans les figures 1 et 2.

Les résultats de l'4-amino-4-méthyl-4-pentyne-2-al-1 sont donnés à titre de comparaison. L'4-amino-4-méthyl-4-pentyne-2-al-1 (représenté par $\square$) est également un inhibiteur d'ALDH mais ne correspond pas au composé de formule (I) utilisé dans la présente invention. Son procédé d'obtention est décrit dans la demande brevet EP 0 133 407.

Le 4-amino-4-méthylpent-2-yne thioate de S-méthyle est le composé obtenu selon le procédé décrit à l'exemple 1.

Ces résultats montrent clairement que la présence du 4-amino-4-méthylpent-2-yne thioate de S-méthyle, de préférence en association avec le méthional, permet de lever l'inhibition d'apoptose due au gène bcl2 dans les cellules BAF3-bcl2. L'association méthional-4-amino-4-méthylpent-2-yne thioate de S-méthyle est particulièrement intéressante, car elle présente une synergie de la levée de l'inhibition d'apoptose, en effet seul à 200 μ M le méthional ne présente aucune activité (0% de fragments d'ADN).

EXEMPLE 4Effet du 4-amino-4-méthylpent-2-yne thioate de S-méthyle sur l'induction d'apoptose dans les cellules LNCaP

5

Les cellules utilisées correspondent à une lignée cellulaire d'adénocarcinome de la prostate LNCaP (ATCC CRL 1740). Les cellules LNCaP sont mises en culture dans un milieu contenant du milieu RPMI 1640 (commercialisé par la société GIBCO) et 7,5 % de serum de veau foetal. Elles sont marquées par une adaptation de la méthode décrite dans Wright, S. et al. (1992) J. of Cell. Biochem. 48, 344-355, en incubant $2,5 \cdot 10^5$ cellules /ml avec 0,5 μ Ci [3H]-thymidine pendant 5 jours à 37°C. Après deux lavages avec du tampon PBS, $2,5 \cdot 10^6$ cellules sont réincubées dans un milieu de culture frais contenant du milieu RPMI 1640, 7,5 % de serum de veau foetal et du 4-amino-4-méthylpent-2-yne thioate de S-méthyle à des doses indiquées. Après incubation pendant 6 jours, ces cellules sont récupérées par centrifugation à 400g pendant 5 minutes et lavées 3 fois dans du tampon PBS. Les cellules récupérées dans le culot sont lysées dans 2ml de 0,1% de Triton X-100, 20mM EDTA, 5mM Tris pH8 et centrifugées à 30000g à 4°C pendant 30 minutes. Les surnageants sont récupérés et les culots dissous dans 0,3 ml de 0,5 N NaOH. Des aliquots du milieu de culture (1ml), du surnageant (0,3ml) et du culot solubilisé (0,1ml) sont mis à doser dans le compteur à scintillation. Le pourcentage de fragments d'ADN est calculé de la façon suivante :

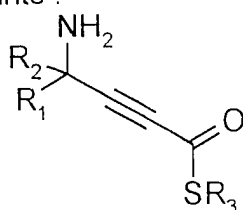
$$\% \text{ de fragments d'ADN} = \frac{\text{dpm du milieu de culture} + \text{dpm du surnageant}}{\text{dpm du milieu de culture} + \text{dpm du surnageant} + \text{dpm du culot solubilisé}}$$

Les résultats sont rassemblés dans la figure 3.

Ces résultats montrent clairement que la présence du 4-amino-4-méthylpent-2-yne thioate de S-méthyle permet de lever l'inhibition d'apoptose due au gène bcl2 dans les cellules LNCaP.

REVENDICATIONS

- 5 1.- Utilisation, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à lever l'inhibition d'un caractère résistant à l'induction d'apoptose de cellules transformées, ce caractère étant dû au gène bcl2 présent dans ces cellules, d'au moins un dérivé aminothiolester de formule (I) suivante :



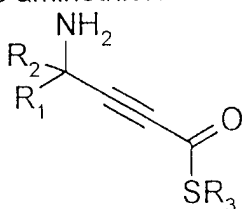
10

(I)

dans laquelle R1, R2 et R3, indépendamment, représentent un radical alkyle, linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé, de C1-C6.

15

- 2.- Utilisation, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à lever l'inhibition du caractère résistant à la chimiothérapie ou aux antiandrogènes de cellules transformées, d'au moins un dérivé aminothiolester de formule (I) suivante :



(I)

20

dans laquelle R1, R2 et R3, indépendamment, représentent un radical alkyle, linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé, de C1-C6.

25

- 3.- Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que le caractère résistant à la chimiothérapie ou aux antiandrogènes de cellules transformées est dû au gène bcl2 présent dans ces cellules.

- 4- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le dérivé aminothiolester présente une formule (I) dans laquelle R1, R2 et R3, indépendamment, représentent des radicaux choisis parmi les radicaux méthyle, éthyle, propyle, butyle, pentyle, hexyle, 2-méthylbutyle, 2-méthylpentyle, isopropyle, tertibutyle et allyle.

30

5- Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que R1, R2 et R3, indépendamment, représentent un radical alkyle de C1 à C3.

6- Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que R1, R2 et R3 représentent le radical méthyle.

7- Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le composé de formule (I) présente le radical amine sous forme d'ammonium, de préférence sous forme d'ammonium organique et avantageusement sous forme de formiate ou d'acétate.

8- Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est destinée à traiter les pathologies choisies parmi les cancers du sein, les lymphomes des cellules B, les leucémies, les neuroblastomes, les adénocarcinomes de la prostate, les prolactinomas et autres adénomes pituitaires.

9- Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule (I), défini selon l'une des revendications 1 à 7, et au moins un composé choisi parmi le méthional et un agent antinéoplasique.

10- Composition pharmaceutique selon la revendication précédente, caractérisée en ce qu'elle comprend le méthional et au moins un composé de formule (I), défini selon l'une des revendications 1 à 6.

11- Composition selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisée en ce qu'elle est sous forme d'un kit, les composés de ce kit étant conditionnés de manière séparée.

12- Composition pharmaceutique telle que définie dans l'une des revendications 9 à 11 destinée à traiter, de manière préventive ou curative, des maladies liées à une hyperprolifération cellulaire, plus particulièrement les cancers, les maladies auto-immunes ou allergiques.

13- Composition pharmaceutique selon la revendication précédente, caractérisée en ce qu'elle est destinée à traiter, de manière préventive ou curative, des maladies choisies parmi les cancers du sein, les lymphomes des cellules B, les leucémies, les neuroblastomes, les adénocarcinomes de la prostate, les prolactinomas et autres adénomes pituitaires.

1/3

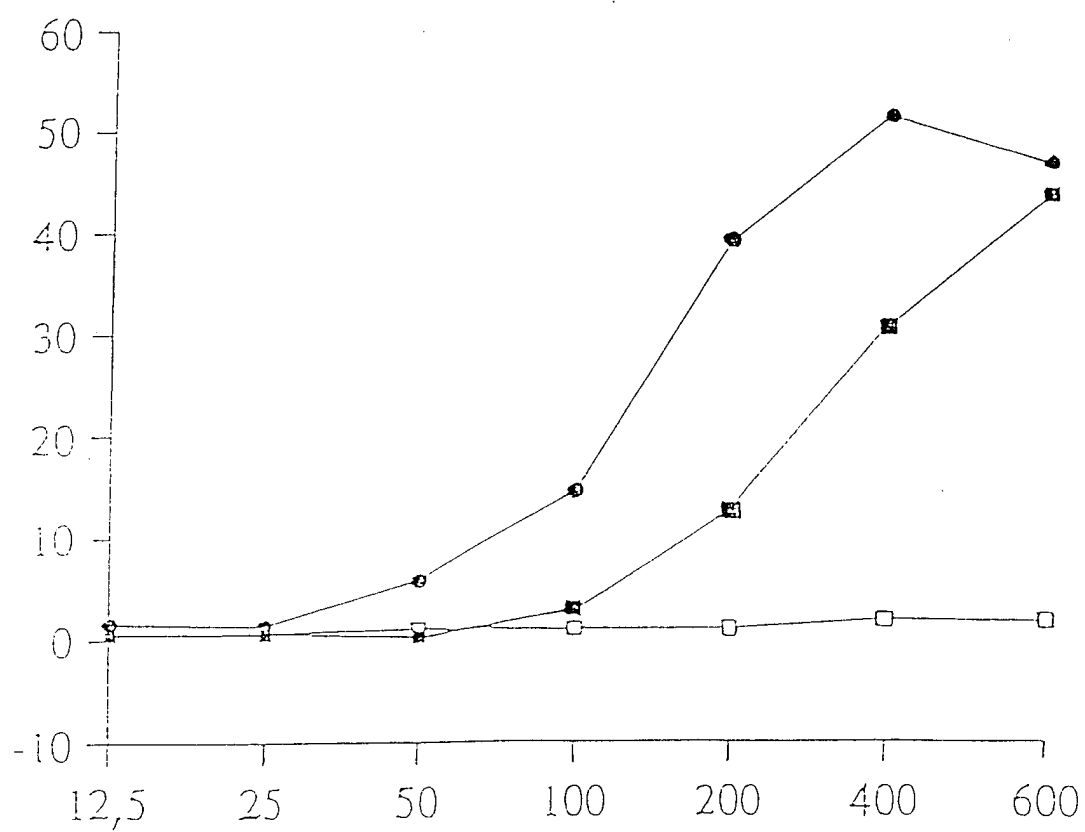


FIGURE 1 / 3

2/3

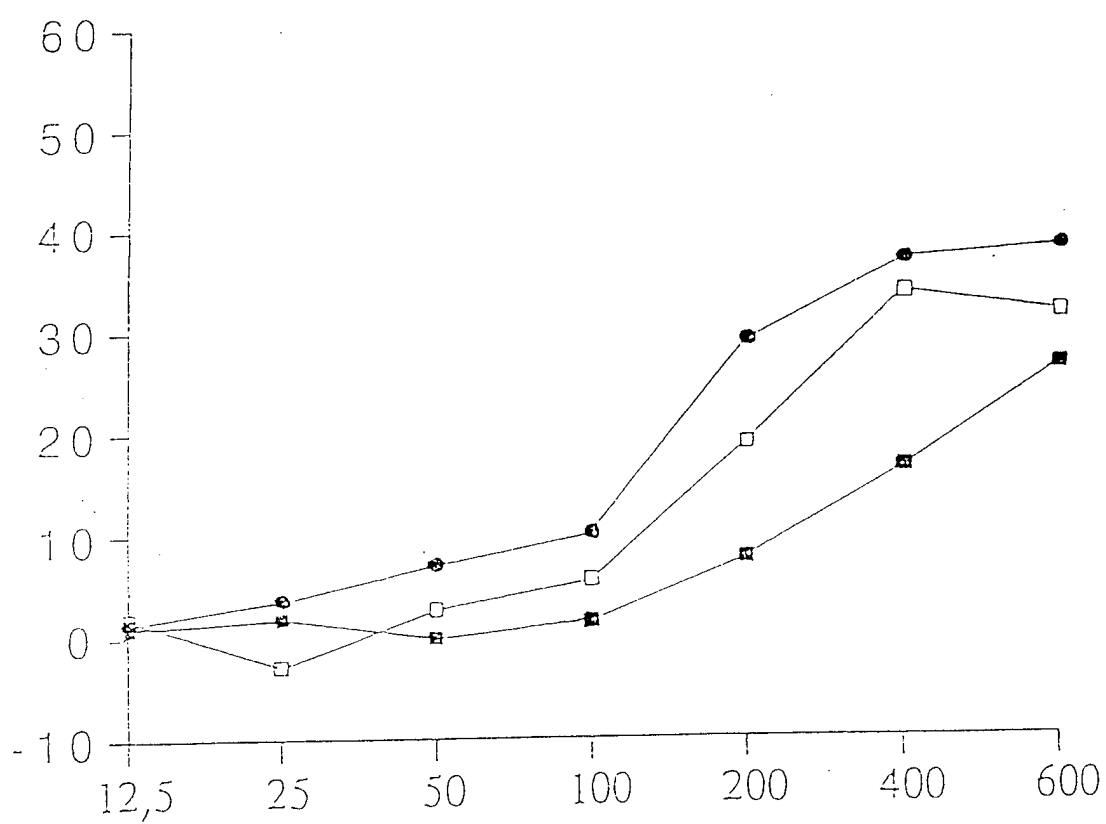


FIGURE 2 / 3

3/3

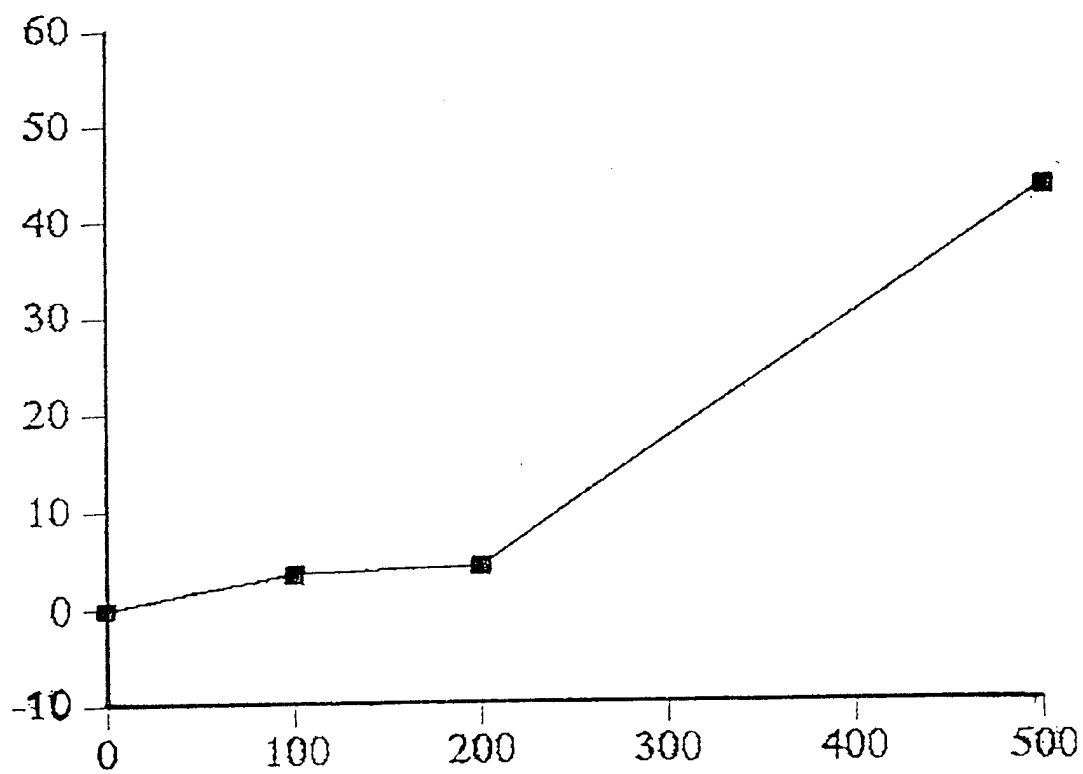


FIGURE 3 / 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00712

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K31/265

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 133 407 A (CNRS) 20 February 1985 cited in the application see the whole document ---	1-13
A	WO 96 20701 A (CIRD GALDERMA) 11 July 1996 cited in the application see the whole document -----	9-13



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 June 1998

Date of mailing of the international search report

02/07/1998

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Gac, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/00712

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 133407 A	20-02-1985	FR 2550189 A CA 1230128 A JP 60056943 A	08-02-1985 08-12-1987 02-04-1985
WO 9620701 A	11-07-1996	FR 2728790 A AU 4451296 A CA 2166243 A EP 0723778 A FI 972780 A HU 77490 A NO 973034 A PL 320963 A US 5744499 A	05-07-1996 24-07-1996 30-06-1996 31-07-1996 27-06-1997 28-05-1998 29-08-1997 24-11-1997 28-04-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D de Internationale No
PCT/FR 98/00712

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K31/265

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 133 407 A (CNRS) 20 février 1985 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-13
A	WO 96 20701 A (CIRD GALDERMA) 11 juillet 1996 cité dans la demande voir le document en entier -----	9-13

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

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 juin 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/07/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

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

Fonctionnaire autorisé

Gac, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Classe internationale No

PCT/FR 98/00712

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 133407 A	20-02-1985	FR 2550189 A	08-02-1985
		CA 1230128 A	08-12-1987
		JP 60056943 A	02-04-1985
WO 9620701 A	11-07-1996	FR 2728790 A	05-07-1996
		AU 4451296 A	24-07-1996
		CA 2166243 A	30-06-1996
		EP 0723778 A	31-07-1996
		FI 972780 A	27-06-1997
		HU 77490 A	28-05-1998
		NO 973034 A	29-08-1997
		PL 320963 A	24-11-1997
		US 5744499 A	28-04-1998