

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

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

**2 468 365**

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21) **N° 80 16995**

(54) Préparation de N<sup>4</sup>-acylcytosine arabinoside et composition pharmaceutique les contenant.

(51) Classification internationale (Int. Cl.<sup>3</sup>). A 61 K 9/66, 31/70 // C 07 H 19/06.

(22) Date de dépôt..... 31 juillet 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Japon, 2 août 1979, n° 98075.

(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 19 du 8-5-1981.

(71) Déposant : Société dite : ASAHI KASEI KOGYO KK, résidant au Japon.

(72) Invention de : Yoshio Sakurai, Tateshi Kataoka et Fujiko Oh-Hashi.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Z. Weinstein,  
20, av. de Friedland, 75008 Paris.

Cette invention a essentiellement pour objet des préparations de N<sup>4</sup>-acylcytosine arabinoside présentant une activité accrue comme agent anti-tumoral

La N<sup>4</sup>-acylcytosine arabinoside est un dérivé 5 de la cytosine arabinoside, connu comme agent contre la leucémie aigue et elle est particulièrement utilisée comme agent anti-tumoral présentant une durée d'activité améliorée et une résistance 10 à la cytidine desaminase tout en maintenant une activité anti-tumorale élevée de la cytosine arabinoside. (Cancer Research, Vol.36, page 2726 et Vol. 37, page 2481).

Les inventeurs ont trouvé que l'activité anti-tumorale de la cytosine arabinoside était 15 hautement augmentée lorsque celle-ci était encapsulée dans des gouttelettes de graisse intra-cellulaire. contenant des lipides tels que par exemple la sphingo-myéline, la lécithine. En outre, ces inventeurs ont aussi trouvé que l'addition de 20 cytosine arabinoside dans lesdites gouttelettes de graisse demandait la présence d'additifs tels que la stéarylamine et la dicétyl phosphate, même pour une quantité de cytosine arabinoside encapsulée dans les gouttelettes de graisse intra-cellulaires 25 très inférieure à celle mise en œuvre au départ (la demande de brevet japonaise (OPI) 114015/1977). Les additifs décrits ci-dessus sont cependant nocifs à la santé du corps. Donc, il était important 30 d'accroître l'efficacité d'encapsulation de la cytosine arabinoside dans les gouttelettes de graisse intra-cellulaire sans l'emploi d'aucun additif nocif.

Un objet de cette invention est de procurer 35 des préparations de N<sup>4</sup>-acylcytosine arabinoside montrant une activité anti-tumorale accrue. Un autre objet de l'invention est de procurer une préparation de N<sup>4</sup>-acylcytosine arabinoside encapsulée sans l'emploi d'aucun additif nocif.

Ces préparations de N<sup>4</sup>-acylcytosine arabinoside comprennent essentiellement de la N<sup>4</sup>-acylcytosine arabinoside ayant un radical acyle aliphatique contenant de 6 à 18 atomes de carbone et étant encapsulée dans des gouttelettes de lécithine intra-cellulaire .

Selon une autre caractéristique de l'invention, les gouttelettes de lécithine intra-cellulaire contiennent du cholestérol.

Selon une nouvelle caractéristique de l'invention le radical acyle aliphatique comprenant de 6 à 18 atomes de carbone est choisi parmi les radicaux suivants : caproyle, caprylyle, capryle, lauroyle, myristoyle, palmitoyle et stearoyle.

L'invention sera mieux comprise, et d'autres caractéristiques, détails et avantages de celle-ci apparaîtront plus clairement au cours de la description explicative qui va suivre, et au travers des exemples illustrant avec plus de détail la présente invention et son mode de mise en pratique. Ces exemples ne doivent pas être considérés comme limitant le cadre de l'invention parce que de nombreuses variations et modification en sont possibles.

Les gouttelettes de graisse intra-cellulaire utilisées dans la présente invention sont constituées par de la lécithine, et de préférence par la lécithine du jaune d'œuf. Les constituants élémentaires de la lécithine peuvent être soit la distéaroyl-phosphatide choline, la dipalmitoyl-phosphatide choline, la dimyristoyl-phosphatide choline ou la dioléyl-phosphatide choline; la lécithine peut également être composée d'un mélange de ces différents produits. Pour augmenter la fluidité desdites gouttelettes de graisse intra-cellulaire, on leur additionne du cholestérol par une méthode conventionnelle et connue.

La N<sup>4</sup>-acylcytosine arabinoside employée pour les préparations conformes à l'invention est choisie parmi les N<sup>4</sup>-acylcytosine arabinosides contenant un radical acyle aliphatique ayant de 6 à 18 atomes de carbone tel que par

exemple la N<sup>4</sup>-caproylcytosine arabinoside, la  
 5 N<sup>4</sup>-caprilcytosine arabinoside, la N<sup>4</sup>-lauroylcytosine  
 arabinoside, la N<sup>4</sup>-myristoylcystosine arabinoside,  
 la N<sup>4</sup>-palmitoylcystosine arabinoside ou la N<sup>4</sup>-stéaroyl-  
 10 cytosine arabinoside. Si la N<sup>4</sup>-acylcystosine arabinoside  
 utilisée a un radical acyle aliphatique comprenant  
 moins de 6 atomes de carbone ou plus de 18 atomes de  
 carbone, l'activité des agents anti-tumoraux n'est  
 pas augmentée appréciablement, d'un point de vue  
 15 statistique.

Les préparations conformes à l'invention peuvent  
 être obtenues selon la méthode suivante:

La lécithine, la N<sup>4</sup>-acylcystosine arabinoside et  
 15 si nécessaire, le cholestérol, sont dissous respecti-  
 vement dans des solvants organiques appropriés, ensuite  
 les différentes solutions sont mélangées ensemble.  
 Le mélange ainsi obtenu est évaporé, dans un ballon,  
 sous pression réduite pour former un film très fin  
 sur les parois intérieures dudit ballon. Ensuite,  
 20 de l'eau est additionnée dans le ballon, qui est  
 remué mécaniquement jusqu'à ce que le film se  
 détache de la paroi intérieure. La suspension de  
 la préparation de l'invention peut être obtenue par  
 la méthode décrite ci-dessus. La préparation est  
 25 ensuite isolée par centrifugation de la suspension.

Les préparations de l'invention peuvent être  
 administrées aux patients de différentes manières sous  
 forme modifiée ou non modifiée. Par exemple, les  
 30 préparations de l'invention peuvent être administrées  
 par voie orale, par injection intra-péritonéale,  
 intraveineuse ou subcutanée, ou en suspension dans  
 de l'eau ou dans une solution physiologique de  
 chlorure de sodium.

Exemple 1.

35 Dans 1 ml, 2 ml et 0,4 ml d'un solvant mixte de  
 chloroforme et méthanol (2 volumes de chloroforme pour  
 1 volume de méthanol), on dissous respectivement  
 40 micromoles de lécithine de jaune d'œuf, 30 micromoles de

cholestérol et 8 micromoles de N<sup>4</sup>-acylcytosine arabinoside (désignée ci-après par "ACA"). Ces différentes solutions sont versées dans un ballon en forme de cœur et mélangées ensemble. Le ballon 5 est alors monté en rotation dans un bain marie porté à une température de 40°C pour évaporer le solvant sous pression réduite. A la fin de l'évaporation, il s'est formé un film fin sur les parois internes du ballon, ce film est alors séché dans un dessiccateur 10 sous vide pendant trois heures. Ensuite deux spatules pleines de perles de verre de diamètre de 0,18 mm, et 4 ml de solution physiologique de chlorure de sodium sont additionnées dans le ballon. On agite le ballon avec un vibrateur de tube-test jusqu'à ce que le film 15 soit décollé de la paroi intérieure du ballon. Les perles de verre sont alors retirées et on obtient une suspension dont l'activité anti-tumorale est testée selon l'expérimentation suivante :

on a inoculé par injection intra-péritonéale 20 10<sup>5</sup> cellules leucémiques L-1210 à des souris, divisées en groupe de 8 animaux. A un certain groupe, on a inoculé par injection intra-péritonéale 10 à 20 micromoles par kilo de la suspension d'ACA décrite ci-dessus, au premier et au cinquième jour suivant 25 le jour d'inoculation du greffon. L'activité est mesurée par la valeur  $\frac{T}{C} \times 100$  dans laquelle T est le nombre de jours moyen de survie des souris dans les groupes ayant subi l'injection de la suspension et, C est le nombre de jours moyen de survie 30 des souris dans les groupes d'animaux non soumis à l'injection de la suspension.

Une expérimentation comparative a été conduite par répétition de l'expérimentation décrite ci-dessus en employant une suspension de ACA comprenant de 35 l'ACA et une solution physiologique de chlorure de sodium contenant 0,5% de Tween 80 (nom commercial du monooléate polyoxyéthylène sorbitan commercialisé par Kao Atlas Co, Ltd, Japon). Les résultats obtenus

sont indiqués dans le tableau 1.

TABLEAU 1.

	radical acyle dans ACA	quantité injectée ( <u>umole/kg</u> )	<u>T/C(%)</u>		signification statis- tique de la différence entre (a) et (b)
			(a)	(b)	
5	$N^4$ -butyryl	20	104	101	X
	$N^4$ -caproyl	20	110	103	0
	$N^4$ -caprylyl	20	115	108	0
	$N^4$ -capryl	20	136	114	0
10	$N^4$ -lauroyl	20	128	112	0
	$N^4$ -myristoyl	20	181	118	0
	$N^4$ -palmitoyl	20	164	131	0
	$N^4$ -stéaroyl	10	164	139	0
	$N^4$ -arachidoyl	10	<u>143</u>	<u>135</u>	X

15 - (a) : préparation d'ACA encapsulée dans des gouttelettes de graisse intra-cellulaire .

- (b) : suspension d'ACA.

NOTE : 0 indique que la différence entre (a) et (b) a une signification statistique,

20 X indique que la différence entre (a) et (b) n'a pas de signification statistique.

Exemple 2.

L'activité anti-tumorale mesurée par une méthode analogue à celle de l'exemple 1 et utilisant les préparations suivantes préparées comme dans l'exemple 1 aux différences suivantes :

25 (A) utilise de la  $N^4$ -myristoylcytosine arabinoside comme ACA, la solution (B) utilise la  $N^4$ -myristoylcytosine arabinoside comme ACA sans utilisation de cholestérol, et la solution (C) utilise la préparation comparative suivante préparée par dispersion de  $N^4$ -myristoylcytosine arabinoside et de gouttelettes de graisse intra-cellulaires consistant en lécithine et du cholestérol dans une solution physiologique de chlorure de sodium contenant 0,5% de TWEEN 80. La quantité d'injection est de 20 micromoles par kilo. Les résultats sont indiqués dans le tableau 2.

TABLEAU 2.

<u>Préparations</u>	<u>T/C (%)</u>
(A)	165
(B)	200
(C)	122

5 Ce tableau 2 montre clairement que la différence entre les solutions (A) et (C) ou (B) et (C) est statistiquement significative .

Exemple 3.

10 L'exemple 1 est répété à la différence que l'on emploie la N<sup>4</sup>-myristoylcytosine arabinoside comme ACA, sans utilisation de cholestérol et l'on emploie différentes phosphatides cholines en remplacement de la lécithine. La quantité d'injection est de 15 20 micromoles par kilo. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 3.

TABLEAU 3.

<u>Radical diacylede la phosphatide choline</u>	<u>T/C(%)</u>
Distéaroyle	156
Dipalmitoyle	162
Dimyristoyle	165
<u>Dioléoyle</u>	<u>148</u>

Exemple 4.

25 Le taux d'incorporation de l'ACA dans les gouttelettes de graisse intra-cellulaire est mesuré par la méthode suivante :

30 Dans 0,25 ml, 0,5 ml, 0,1 ml et 0,25 ml d'un solvant mixte de chloroforme et méthanol (2 volumes de chloroforme pour 1 volume de méthanol, on dissous respectivement 10 micromoles de lécithine de jaune d'œuf, 7,5 micromoles de cholestérol, 2 micromoles de N<sup>4</sup>-myristoylcytosine arabinoside et, si nécessaire, 1 micromole de stéarylamine. Ces solutions sont placées dans un ballon en forme de cœur et sont mélangées ensemble. Le ballon est placé en rotation dans un bain marie maintenu à une température de 40°C pour évaporer le solvant sous pression réduite. Après évaporation un film mince s'est formé sur les parois

intérieures du ballon. Ce film est ensuite séché dans un dessiccateur sous vide pendant 3 heures. On ajoute ensuite dans le ballon, deux spatules pleines de perles de verre ayant un diamètre de 0,18mm 5 et 2 ml de solution physiologique de chlorure de sodium. Le ballon est agité mécaniquement par un vibrateur jusqu'à ce que le film se décolle des parois intérieures dudit flacon.

Tout le contenu du flacon est versé dans un tube 10 test en polyéthylène de 40 ml d'une centrifugeuse. Le résidu contenu dans le ballon est rincé trois fois, chaque fois avec 10 ml d'une solution physiologique de chlorure de sodium et le liquide de rinçage est collecté et additionné dans le tube-test décrit 15 ci-dessus. Les perles de verre sont retirées et la solution est centrifugée avec une vitesse de 13 000 g pendant 15 minutes à 4°C. La couche de liquide supérieure est retirée et 30 ml de solution physiologique de chlorure de sodium fraîche est additionnée dans 20 le tube-test et mélangée; la solution est à nouveau centrifugée. Cette opération est répétée encore deux fois et la couche liquide supérieure est retirée pour recueillir les gouttelettes de graisse intra-cellulaire . Lesdites gouttelettes ainsi obtenues 25 sont séchées et le taux d'incorporation de l'ACA dans ces gouttelettes est mesuré.

La quantité de gouttelettes de graisse intra-cellulaire récupérée est calculée par mesure de la 30 quantité de phosphore organique contenu dans ces gouttelettes.

La quantité de N<sup>4</sup>-myristoylcytosine arabinoside récupérée est calculée par mesure de l'absorbance des gouttelettes de graisse intra-cellulaire dissoutes dans le chloroforme à 300 nm. Les résultats obtenus 35 sont rassemblés dans le tableau 4.

TABLEAU 4.

	gouttelettes de graisse intra-cellulaire	taux de récupération des gouttelettes de graisse (%)	taux de récupération d'ACA (%)	taux d'incorporation d'ACA (%)
5	lécithine/cholestérol/stéarylamine	56	43	77
	lécithine/cholestérol	81	70	86

Pour la comparaison, une préparation contenant  
 10 de la cytosine arabinoside est préparée par le procédé suivant et le taux d'incorporation de la cytosine arabinoside dans les gouttelettes de graisse intra-cellulaire est mesuré.

Dans 0,25 ml, 0,5 ml et 0,25 ml d'un solvant mixte de chloroforme et méthanol (2 volumes de chloroformé pour 1 volume de méthanol) on dissous respectivement 10 micromoles de lécithine de jaune d'œuf, 7,5 micromoles de cholestérol et, si nécessaire, 1 micromole de stéarylamine. Ces différentes solutions sont mélangées ensemble dans un ballon en forme de cœur de 100 ml. Ce ballon est placé en rotation dans un bain marie maintenu à une température de 40°C pour évaporer le solvant sous pression réduite. A la fin de l'évaporation un film mince s'est formé sur les parois intérieures du ballon, ce film est séché dans un dessiccateur, sous vide pendant 3 heures. On ajoute ensuite dans le ballon, deux spatules de perle de verre ayant un diamètre de 0,18 mm et 1 ml d'une solution de cytosine arabinoside (de concentration 300 micromoles par ml). Le ballon est agité mécaniquement par un vibrateur de tube jusqu'à ce que le film se décolle des parois intérieures du ballon.

Tout le contenu de ce ballon est versé dans un tube-test en polyéthylène de 40 ml pour centrifugeuse. 35 Le résidu contenu dans le ballon est rincé trois fois par chaque fois 10 ml d'une solution physiologique de chlorure de sodium, le liquide de rinçage est collecté et additionné dans le tube-test décrit ci-dessus.

Les perles de verre sont retirées et le tube-test est centrifugé sous une vitesse de centrifugation de 13 000 g pendant 15 minutes à 4°C. La couche liquide supérieure est ensuite retirée, et on ajoute 30 ml d'une solution physiologique de chlorure de sodium dans le tube-test qui est à nouveau centrifugé. Cette opération est répétée deux autres fois, et on récupère les gouttelettes de graisse intra-cellulaires sur les parois du tube. Ces gouttelettes de graisse ainsi obtenues sont séchées et le taux d'incorporation de la cytosine arabinoside dans les gouttelettes de graisse intra-cellulaires est mesuré. La quantité de gouttelettes de graisse intra-cellulaire récupérées est calculée comme dans les exemples décrits ci-dessus. La quantité de cytosine arabinoside récupérée est calculée par mesure de l'absorbance des gouttelettes de graisse dissoutes dans le chloroforme à 280 nm. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 5.

TABLEAU 5.				
	gouttelettes de graisse intra-cellulaire	taux de récupération de gouttelettes de graisse (%)	taux de récupération de cytosine arabinoside(%)	taux d'incorporation de la cytosine arabinoside(%)
20				
25	lécithine/cholestérol/stéarylamine	70	4,8	6,9
	Lécithine/cholestérol	87	2,0	2,3

Bien entendu, l'invention n'est nullement limitée aux modes de réalisation décrits qui n'ont été donnés qu'à titre d'exemple. En particulier elle comprend tous les moyens constituant des équivalents techniques des moyens décrits ainsi que leurs combinaisons, si celles-ci sont exécutées suivant son esprit et mises en œuvre dans le cadre de la protection comme revendiquée.

## R E V E N D I C A T I O N S

1. Une préparation de  $N^4$ -acylcytosine arabinoside est caractérisée en ce qu'elle comprend essentiellement des gouttelettes de lécithine intra-cellulaire et de la  $N^4$ -acylcytosine arabinoside possédant un radical acyle aliphatique comprenant de 6 à 18 atomes de carbone et étant encapsulé dans lesdites gouttelettes de lécithine.

5 2. La préparation de  $N^4$ -acylcytosine arabinoside selon la revendication 1, caractérisée en ce que les gouttelettes de lécithine intra-cellulaire contiennent du cholestérol.

10 3. La préparation de  $N^4$ -acylcytosine arabinoside selon la revendication 1, caractérisée en ce que le radical acyle aliphatique est choisi parmi les radicaux caproyle, caprylyle, capryle, lauroyle, myristoyle, palmitoyle, et stéaroyle.

15 4. Composition pharmaceutique notamment utilisée comme agent anti-tumoral, caractérisée en ce qu'elle comprend une dose thérapeutique efficace d'une préparation de  $N^4$ -acylcytosine arabinoside selon la revendication 1 dans un véhicule pharmaceutique acceptable pour l'organisme et compatible avec lui.