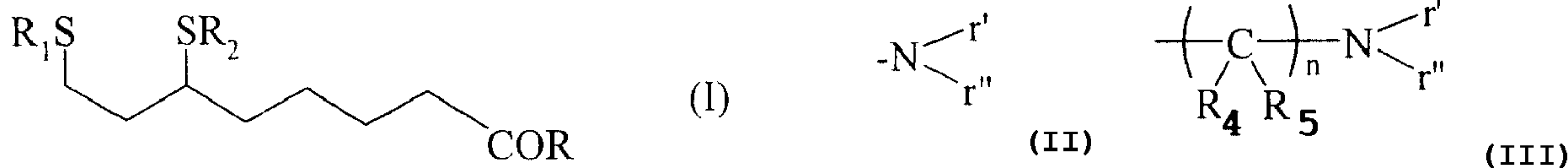




(22) Date de dépôt/Filing Date: 1999/03/31  
(41) Mise à la disp. pub./Open to Public Insp.: 1999/10/01  
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2003/12/09  
(30) Priorité/Priority: 1998/04/01 (98 04 041) FR

(51) Cl.Int.<sup>6</sup>/Int.Cl.<sup>6</sup> C07C 323/52, A61K 31/395, A61K 31/215, A61K 31/16, C07D 295/15, C07D 295/185, C07C 327/32, C07D 243/08  
(72) Inventeurs/Inventors:  
QUASH, GERARD ANTHONY, FR;  
GORE, JACQUES, FR;  
FOURNET, GUY, FR  
(73) Propriétaire/Owner:  
GALDERMA RESEARCH & DEVELOPMENT, S.N.C.,  
FR  
(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : DERIVES DE L'ACIDE 6,8-DIMERCARPTOCTANOIQUE SUBSTITUES EN 6-S ET/OU 8-S PAR LE RADICAL (3-METHYLTHIOPROPANOYL) ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES DESTINEES AU TRAITEMENT DE TUMEURS CANCEREUSES  
(54) Title: 6,8-DIMERCARPTOCTANOIC ACID DERIVATIVES SUBSTITUTED IN 6-S AND/OR 8-S BY THE RADICAL (3-METHYLTHIOPROPANOYL) AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS USED TO TREAT CANCEROUS TUMORS

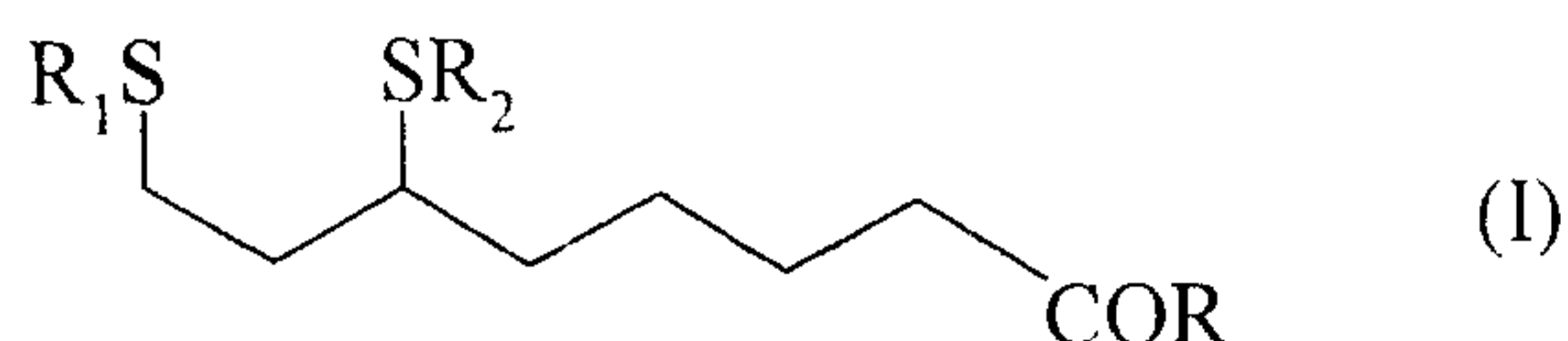


(57) **Abrégé/Abstract:**

Dérivés de l'acide 6,8-dimercaptooctanoïque substitués en 6-S et/ou 8-S par le radical (3-méthylthiopropanoyl) répondant à la formule (I) suivante : (voir formule I) dans laquelle : R représente OR<sub>3</sub> ou (voir formule II) R<sub>3</sub> représentant un atome d'hydrogène, un radical alkyle, linéaire ou ramifié, ou un radical de formule (voir formule III) n étant un nombre entier de 1 à 10, et r' et r'', identiques ou différents, représentant un atome d'hydrogène, un radical alkyle, linéaire ou ramifié ou, pris ensemble forment, avec l'atome d'azote, un hétérocycle azoté éventuellement substitué par un atome d'oxygène ou d'azote éventuellement substitué, R<sub>4</sub> et R<sub>5</sub>, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical alkyle linéaire ou ramifié, R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical -COCH<sub>3</sub> ou un radical de formule : -CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub> (II) sous réserve que l'un au moins des radicaux R<sub>1</sub> ou R<sub>2</sub> représente un radical de formule (II) et les énantiomères R et S et leur racémique ainsi que les sels desdits composés de formule (I). Utilisation dans le traitement de tumeurs cancéreuses.

**ABRÉGÉ**

Dérivés de l'acide 6,8-dimercaptooctanoïque substitués en 6-S et/ou 8-S par le radical (3-méthylthiopropionyl) répondant à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

R représente  $\text{OR}_3$  ou  $-\text{N} \begin{array}{l} \nearrow \text{r}' \\ \searrow \text{r}'' \end{array}$

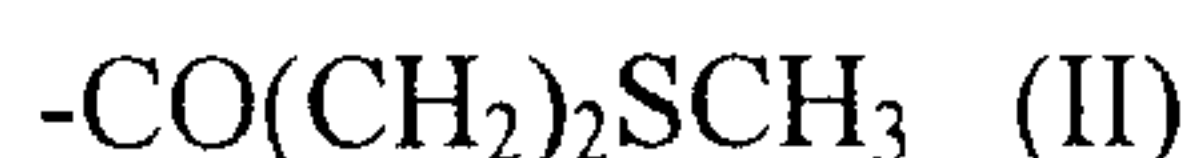
$\text{R}_3$  représentant un atome d'hydrogène, un radical alkyle, linéaire ou ramifié, ou un

radical de formule  $\left( \begin{array}{c} \text{---} \text{C} \text{---} \\ | \quad | \\ \text{R}_4 \quad \text{R}_5 \end{array} \right)_n \text{N} \begin{array}{l} \nearrow \text{r}' \\ \searrow \text{r}'' \end{array}$ , n étant un nombre entier de 1 à 10, et r' et r'', identiques

ou différents, représentant un atome d'hydrogène, un radical alkyle, linéaire ou ramifié ou, pris ensemble forment, avec l'atome d'azote, un hétérocycle azoté éventuellement substitué par un atome d'oxygène ou d'azote éventuellement substitué,

$\text{R}_4$  et  $\text{R}_5$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical alkyle linéaire ou ramifié,

$\text{R}_1$  et  $\text{R}_2$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical  $-\text{COCH}_3$  ou un radical de formule :



sous réserve que l'un au moins des radicaux  $\text{R}_1$  ou  $\text{R}_2$  représente un radical de formule (II) et les énantiomères R et S et leur racémique ainsi que les sels desdits composés de formule (I).

Utilisation dans le traitement de tumeurs cancéreuses.

Dérivés de l'acide 6,8-dimercaptooctanoïque substitués en 6-S et/ou 8-S par le radical  
(3-méthylthiopropionyl) et compositions pharmaceutiques destinées au traitement  
de tumeurs cancéreuses

5 La présente invention a pour objet des dérivés de l'acide 6,8-dimercaptooctanoïque substitués en 6-S et/ou 8-S par le radical (3-méthylthiopropionyl) ainsi que leur utilisation en tant qu'agents inducteurs de l'apoptose cellulaire.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique contenant, en tant qu'agent actif, au moins un dérivé de l'acide 6,8-dimercaptooctanoïque  
10 substitué en 6-S et/ou 8-S par le radical (3-méthylthiopropionyl), dans un excipient pharmaceutiquement acceptable, notamment pour le traitement, la régression et la prévention de tumeurs cancéreuses.

Par le terme "apoptose", on entend le phénomène de mort cellulaire tel que décrit entre autres par KERR J.F.R. et al., J. Cancer, 265, 239 (1972). L'apoptose qui est une forme  
15 hautement sélective de suicide cellulaire, se caractérise par des phénomènes morphologiques et biochimiques aisément observables. Ainsi, on observe une condensation de la chromatine associée ou non à une activité endonucléasique, la formation de corps apoptotiques et une fragmentation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) du fait de l'activation d'endonucléases, en fragments d'ADN de 180-200 paires de base donnant un profil facilement reconnaissable par  
20 électrophorèse sur gel d'agarose.

Une très grande variété de médicaments anticancéreux naturels ou synthétiques est actuellement disponible.

Parmi ces médicaments antinéoplasiques, on peut citer les agents alkylants tels que la cyclophosphamide, les nitrosurées tels que le 1,3-bis (2-chloroéthyl)-1-nitrosurée (BCNU),  
25 les agents intercalants tels que l'actinomycine D ou l'adriamycine, les analogues de bases puriques ou pyrimidiques tels que la 6-thioguanine et la 5-fluorouracile, les inhibiteurs de la synthèse de novo des bases puriques tels que le méthotrexate et enfin les inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline tels que le Taxol®.

Un des principaux inconvénients de l'utilisation de ces substances est l'absence d'une  
30 activité apoptotique sélective des cellules tumorales. Ainsi, le problème majeur pour la réalisation de tels composés est de concevoir et préparer des molécules qui induisent une



apoptose maximale dans le tissu tumoral tout en lésant le moins possible et de façon réversible les tissus sains de l'organisme.

En vue de remédier à cette absence de sélectivité, il a déjà été proposé par la demanderesse, notamment dans la demande de brevet WO96/20701, d'utiliser un composé  
5 inducteur d'apoptose choisi parmi le méthional, le malonaldéhyde et tout facteur permettant d'augmenter le taux intracellulaire de ces composés, c'est-à-dire ayant une action sur le métabolisme du méthional représenté pour mémoire à la Figure 1 (QUASH et al., *Biochem. J.* 305, 1017 (1995)).

Il a également été décrit dans cette même demande de brevet, à titre de facteur  
10 augmentant le taux intracellulaire du méthional, l'utilisation d'inhibiteurs de l'acide 4-méthylthio 2-oxobutanoïque (MTOB) transaminase, composés d'esters de L-méthionine et de pyridoxal. La MTOB transaminase étant une enzyme impliquée dans la conversion de l'acide 4-méthylthio 2-oxobutanoïque en méthionine, l'utilisation de ces composés favorise l'accumulation de MTOB, précurseur direct du méthional (Figure 1) (ROCH et al.,  
15 *Biochem. J.* 313, 973 (1996)).

Toutefois, la sélectivité du méthional et du malonaldéhyde pour les cellules tumorales s'est avérée encore insuffisante puisque ces composés inhibent autant la croissance des cellules tumorales que celle des cellules normales.

Il a par ailleurs été décrit par la demanderesse dans la demande de brevet FR-  
20 9704283, l'utilisation d'un dérivé aminothioester, désigné AMPALTE, en tant qu'inhibiteur de l'enzyme aldéhyde déshydrogénase (ALDH), enzyme impliquée dans la conversion du méthional en acide méthylthiopropionique, favorisant ainsi l'accumulation de méthional. Ce composé est un inhibiteur sélectif de la croissance des cellules transformées résistantes à l'apoptose du fait de la surexpression du gène anti-apoptique  $bcl_2$ .

25 Un tel composé est donc plus spécifiquement destiné aux pathologies caractérisées par une surexpression du gène  $bcl_2$  telles que les cancers du sein, les lymphomes des cellules B, les leucémies, les neuroblastomes, les adénocarcinomes de la prostate, les prolactinomas et autres adénomes pituitaires.

Il était donc souhaitable de mettre au point une stratégie thérapeutique qui soit  
30 sélective des cellules tumorales et de cibler un grand nombre de pathologies cancéreuses.

A la suite de nombreuses études sur divers composés dérivés du méthional, on a constaté que les dérivés comprenant le méthional couplé par liaison thio-ester à l'acide thioctique présentaient une forte activité apoptotique sélective pour les cellules transformées et tumorales, comme le démontrent les données expérimentales présentées dans la demande.

Une telle activité rend les composés de l'invention utiles dans le traitement thérapeutique antitumoral.

#### BRÈVE DESCRIPTION DES FIGURES

- Figure 1** représente la voie métabolique du méthional.
- 10 **Figure 2** représente le schéma réactionnel d'obtention des composés de formule (I).
- Figure 3** représente les courbes d'inhibition de croissance des cellules HeLa (-●-) et des cellules MRC-5 (-O-) après incubation avec le composé N°1(RS).
- Figure 4** représente les courbes d'inhibition de croissance des cellules HeLa (-●-) et des cellules MRC-5 (-O-) après incubation avec le composé N°1(S).
- Figure 5** représente les courbes d'inhibition de croissance des cellules HeLa (-●-) et des cellules MRC-5 (-O-) après incubation avec le composé N°1(R).
- Figure 6** représente les courbes d'inhibition de croissance des cellules HeLa (-●-) et des cellules MRC-5 (-O-) après incubation avec le racémique du composé N°3(RS).
- 20 **Figure 7** représente les courbes d'inhibition de croissance des cellules HeLa (-●-) et des cellules MRC-5 (-O-) après incubation avec le composé N°4(RS).
- Figure 8** représente les courbes d'inhibition de croissance des cellules HeLa (-●-) et des cellules MRC-5 (-O-) après incubation avec le composé N°6(RS).
- Figure 9** représente les courbes d'inhibition de croissance des cellules HeLa (-●-) et des cellules MRC-5 (-O-) après incubation avec le composé N°9(RS).
- Figure 10** représente les courbes d'inhibition de croissance des cellules HeLa (-●-) et des cellules MRC-5 (-O-) après incubation avec le composé N°21(RS).
- Figure 11** représente les courbes d'inhibition de croissance des cellules B16 (-●-), DU 145 (-Δ-), PC3 (-▲-), LNCaP (-□-) et des cellules MRC-5 (-O-) après incubation avec le composé N°24(RS).





$R_4$  et  $R_5$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical alkyle linéaire ou ramifié,

$R_1$  et  $R_2$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical  $-COCH_3$  ou un radical de formule :



sous réserve que l'un au moins des radicaux  $R_1$  ou  $R_2$  représente un radical de formule (II) et les énantiomères R et S et leur racémique ainsi que les sels desdits composés de formule (I).

10 Parmi les radicaux alkyles, linéaires ou ramifiés, on préfère selon l'invention un radical ayant de 1 à 12 atomes de carbone, et plus particulièrement de 1 à 6 atomes de carbone. Parmi ceux-ci on peut citer les radicaux méthyle, éthyle, isopropyle, n-butyle isobutyle et tertio-butyle.

15 Selon l'invention, l'indice "n" est généralement compris entre 2 et 6, le radical divalent étant de préférence le radical éthylène, propylène, butylène ou méthyl-2 propane-1,2 diyle.

Lorsque selon l'invention, les radicaux  $r'$  et  $r''$  forment un hétérocycle azoté, celui-ci peut être la morpholine, la pyrrolidine, la pipérazine, l'homopipérazine et une N-alkyl ( $C_1$ - $C_6$ ) pipérazine.

20 L'atome de carbone en position  $C_6$  étant asymétrique, les composés de l'invention peuvent donc se présenter soit sous forme des énantiomères R et S, soit sous forme racémique.

25 Lorsque les composés selon l'invention de formule (I) sont sous forme de sels, ceux-ci peuvent être soit des sels d'une base minérale ou organique lorsqu'ils comportent une fonction acide carboxylique, soit des sels d'un acide minéral ou organique lorsqu'ils comportent une fonction amine salifiable.

Parmi les sels d'une base on peut citer par exemple les sels de sodium, de potassium, de calcium, et parmi les sels d'un acide, les halogénures, les nitrates, les sulfates, les sulfonates, les carboxylates, les thiocyanates et les phosphates.

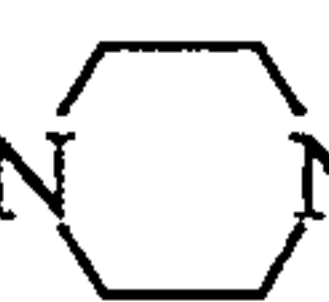
30 Selon un mode de réalisation préféré, les sels sont des halogénures d'ammonium notamment des iodures tels que ceux de trimétholammonium ou de N-alkyl pipérazonium.



Parmi les composés de formule (I) monosubstitués en position 6 ou 8 ou disubstitués on peut notamment citer :

- | <u>N°</u> | <u>Composés</u>                                                                                                                                    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5         | 1- 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de méthyle,<br>(formule I : $R_1 = -CO(CH_2)_2-SCH_3$ ; $R_2 = H$ ; $R = OCH_3$ ) ;            |
|           | 2- 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoate de méthyle,<br>(formule I : $R_1 = H$ ; $R_2 = -CO(CH_2)_2-SCH_3$ ; $R = OCH_3$ ) ;            |
|           | 3- le 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de méthyle,<br>(formule I : $R_1 = R_2 = -CO(CH_2)_2-SCH_3$ ; $R = OCH_3$ ) ;                  |
| 10        | 4- 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de tertibutyle,<br>(formule I : $R_1 = -CO(CH_2)_2-SCH_3$ ; $R_2 = H$ ; $R = O-tertC_4H_9$ ) ; |
|           | 5- 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoate de tertibutyle,<br>(formule I : $R_1 = H$ ; $R_2 = -CO(CH_2)_2-SCH_3$ ; $R = O-tertC_4H_9$ ) ; |
| 15        | 6- 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de tertibutyle,<br>(formule I : $R_1 = R_2 = -CO(CH_2)_2-SCH_3$ ; $R = O-tertC_4H_9$ ) ;          |
|           | 7- 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de n-butyle,<br>(formule I : $R_1 = -CO(CH_2)_2-SCH_3$ ; $R_2 = H$ ; $R = O-nC_4H_9$ ) ;       |
|           | 8- 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoate de n-butyle,<br>(formule I : $R_1 = H$ ; $R_2 = -CO(CH_2)_2-SCH_3$ ; $R = O-nC_4H_9$ ) ;       |
| 20        | 9- 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de n-butyle,<br>(formule I : $R_1 = R_2 = -CO(CH_2)_2-SCH_3$ ; $R = O-nC_4H_9$ ) ;                |
|           | 10- acide 6-mercapto-8-S(3-méthylthiopropionyl) octanoïque,<br>(formule I : $R_1 = -CO(CH_2)_2-SCH_3$ ; $R_2 = H$ ; $R = OH$ ) ;                   |
| 25        | 11- acide 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoïque,<br>(formule I : $R_1 = H$ ; $R_2 = -CO(CH_2)_2-SCH_3$ ; $R = OH$ ) ;                  |
|           | 12- acide 6-S,8-S-bis(3-méthylthiopropionyl) octanoïque,<br>(formule I : $R_1 = R_2 = -CO(CH_2)_2-SCH_3$ ; $R = OH$ ) ;                            |
|           | 13- 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate d'éthyle,<br>(formule I : $R_1 = -CO(CH_2)_2-SCH_3$ ; $R_2 = H$ ; $R = OC_2H_5$ ) ;           |
| 30        | 14- 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoate d'éthyle,<br>(formule I : $R_1 = H$ ; $R_2 = -CO(CH_2)_2-SCH_3$ ; $R = OC_2H_5$ ) ;           |



- 15- 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate d'éthyle,  
(formule I :  $R_1=R_2=-CO(CH_2)_2-SCH_3$ ;  $R=OC_2H_5$ ) ;
- 16- 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate d'isopropyle,  
(formule I :  $R_1=-CO(CH_2)_2-SCH_3$ ;  $R_2=H$ ;  $R=OCH(CH_3)_2$ ) ;
- 5 17- 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoate d'isopropyle,  
(formule I :  $R_1=H$ ;  $R_2=-CO(CH_2)_2-SCH_3$ ;  $R=OCH(CH_3)_2$ ) ;
- 18- 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate d'isopropyle,  
(formule I :  $R_1=R_2=-CO(CH_2)_2-SCH_3$ ;  $R=OCH(CH_3)_2$ ) ;
- 19- iodure de 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de  
10 (2' triméthyl ammonium éthyle),  
(formule I :  $R_1=-CO(CH_2)_2-SCH_3$ ;  $R_2=H$  ;  $R=O(CH_2)_2N^+(CH_3)_3I$ ) ;
- 20- iodure de 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoate de  
(2' triméthyl ammonium éthyle),  
(formule I :  $R_1=H$ ;  $R_2=-CO(CH_2)_2-SCH_3$ ;  $R=O(CH_2)_2N^+(CH_3)_3I$ ) ;
- 15 21- iodure de 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de  
(2' triméthyl ammonium éthyle),  
(formule I :  $R_1=R_2=-CO(CH_2)_2-SCH_3$ ;  $R=O(CH_2)_2N^+(CH_3)_3I$ ) ;
- 22- [6-S,8-S-bis(3-méthylthiopropionyl)octanoyl]-N-méthyl pipérazine,  
(formule I :  $R_1=R_2=-CO(CH_2)_2-SCH_3$  ;  $R=-N$    $N-CH_3$ ) ;
- 20 23- 6-S-acétyl, 8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de méthyle,  
(formule I :  $R_1=-CO(CH_2)_2-SCH_3$  ;  $R_2=-COCH_3$  ;  $R=-COH_3$ ) ;
- 24- 6-S-(3-méthylthiopropionyl), 8-S-acétyl octanoate de méthyle,  
(formule I :  $R_1=-COCH_3$  ;  $R_2=-CO(CH_3)_2-SCH_3$  ;  $R=-OCH_3$ ) ;
- 25- iodure de 6-S-acétyl, 8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de  
25 (2' triméthyl ammonium éthyle),  
(formule I :  $R_1=-CO(CH_2)_2-SCH_3$  ;  $R_2=-COCH_3$  ;  
 $R=-O(CH_2)_2N^+(CH_3)_3I$ ) ;
- 26- iodure de 6-S-(3-méthylthiopropionyl), 8-S-acétyl octanoate de  
(2' triméthyl ammonium éthyle),  
30 (formule I :  $R_1=-COCH_3$  ;  $R_2=-CO(CH_2)_2-SCH_3$  ;  
 $R=-O(CH_2)_2N^+(CH_3)_3I$ ).

Les énantiomères (R) et (S) des composés ci-dessus seront désignés ci-après en fonction du numéro attribué à chaque composé suivi de la mention (R) ou (S), et les racémiques seront désignés en fonction du numéro suivi de la mention (RS).

5 Les composés de formule (I) selon l'invention peuvent être obtenus selon le schéma réactionnel de la Figure 2.

Le procédé de synthèse consiste en une première étape à estérifier l'acide 6,8-thioctique ou acide lipoïque de formule (1) soit en présence de diazométhane lorsque l'on souhaite obtenir l'ester de formule (2) dans laquelle  $R=OCH_3$  soit, pour les autres significations, à l'aide d'un alcool ROH dans l'éther en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et de 4-diméthylaminopyridine (4-DMAP). Le rendement de l'estérification est  
10 généralement d'environ 80 à 99 % par rapport à l'acide de départ.

L'ester obtenu (2) est ensuite soumis à une réduction en présence de borohydrure de sodium dans un mélange méthanol/tétrahydrofurane pour conduire au dithiol de formule (3) avec un rendement supérieur à environ 95 %.

15 A partir du dithiol de formule (3), on accède aux composés de formule (Ia) et (Ib) en faisant réagir 1 équivalent molaire d'acide 3-méthylthiopropionique dans du dichlorométhane en présence de DCC et de 4-DMAP. On obtient ainsi un mélange de (Ia) et (Ib) que l'on ne peut séparer par chromatographie préparative sur gel de silice, mais dans lequel (Ia) est largement majoritaire (>90 %). Il est probable que les composés (Ia) et (Ib)  
20 soient interconvertibles.

Le composé de formule (Ic) est également obtenu à partir du dithiol de formule (3) dans les mêmes conditions que ci-dessus mais en faisant réagir un excès molaire d'acide 3-méthylthiopropionique de préférence 3 équivalents molaires. Le rendement de la réaction est d'environ 60 à 80 %.

25 Si, lors de la réaction, et malgré l'excès d'acide 3-méthylthiopropionique, il se forme l'un des composés des formules (Ia) et/ou (Ib), une chromatographie sur gel de silice permet de les séparer.

Les composés de formule (I) ( $R=OH$ ) peuvent être obtenus directement à partir de l'acide lipoïque par réduction et acylation à l'aide de l'acide 3-méthylthiopropionique.

30 Les amides de formule (I) sont aisément accessibles à partir de l'acide thioctique par la même séquence à savoir amidation, réduction et acylation.



Bien qu'il ait été fait référence ci-dessus à certaines conditions particulières des étapes de synthèse des composés selon l'invention, il va de soi que d'autres variantes de ces conditions peuvent être utilisées notamment en ce qui concerne les étapes d'estérification ou d'amidation et d'acylation.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique contenant, en une quantité efficace, au moins un dérivé de l'acide 6,8-dimercaptooctanoïque substitué en 6-S et/ou 8-S par le radical (3-méthylthiopropionyl) de formule (I) en tant qu'agent actif, plus particulièrement en tant qu'agent inducteur d'apoptose des cellules transformées et tumorales, dans un excipient pharmaceutiquement acceptable.

10 La composition pharmaceutique selon la présente invention induit les phénomènes d'apoptose tels que définis ci-dessus, de manière sélective dans les cellules transformées et cancéreuses.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet une composition pharmaceutique pour le traitement, la régression et la prévention de tumeurs cancéreuses chez un sujet humain ou animal.

Encore plus particulièrement, la présente invention a pour objet une composition pharmaceutique caractérisée par le fait qu'elle contient le composé actif en une quantité efficace pour induire l'apoptose des  
20 cellules cancéreuses chez un sujet humain ou animal.

La composition pharmaceutique selon l'invention comprend un milieu physiologiquement acceptable et peut être administrée par voie entérale, parentérale, ou topique.

De préférence, la composition pharmaceutique est conditionnée sous une forme convenant à une application par voie systémique (pour injection ou perfusion).

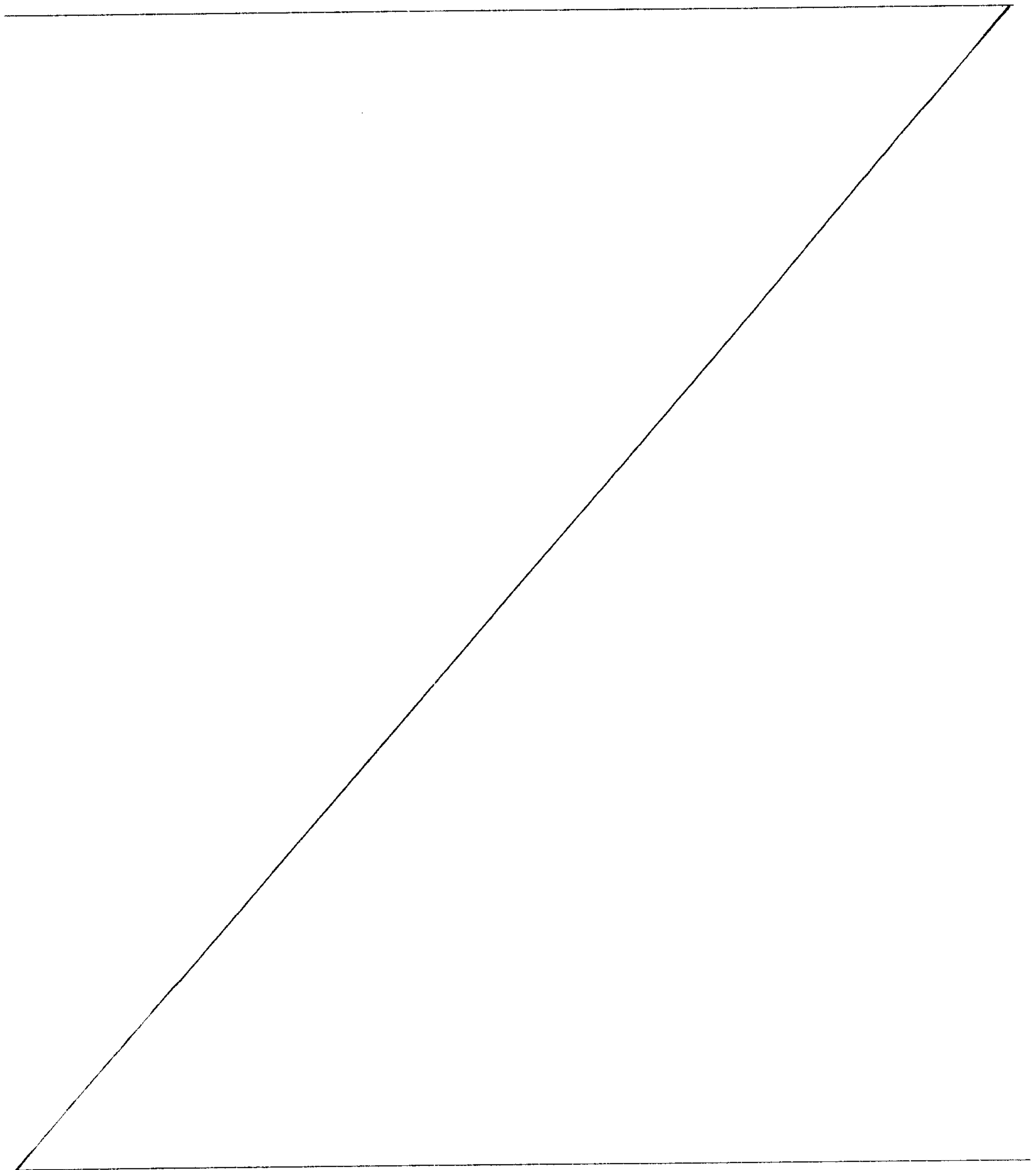
Par voie entérale, la composition pharmaceutique peut se présenter sous formes de comprimés, de gélules, de dragées, de sirops, de suspensions, de solutions, de poudres, de granulés, d'émulsions, de microsphères ou nanosphères ou vésicules lipidiques ou polymériques permettant une libération contrôlée.

30 Par voie parentérale, la composition peut se présenter sous forme de solutions ou suspensions pour perfusion ou pour injection.

8a

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 patchs polymériques et d'hydrogels





permettant une libération contrôlée. Lorsque la composition est destinée à un usage par voie topique, elle peut se présenter soit sous forme anhydre, soit sous forme aqueuse.

Dans les compositions selon l'invention, le composé actif de formule (I) est généralement présent en une concentration comprise entre 0,1 et 10 % en poids, de  
5 préférence entre 0,1 et 5 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

Les compositions telles que décrites précédemment peuvent bien entendu contenir en outre des additifs inertes ou même pharmacodynamiquement actifs ou des combinaisons de ces additifs, et notamment d'autres agents antinéoplasiques, tels que par  
10 exemple la dexaméthasone, la cyclophosphamide, le cisplatine, l'étoposide et le BCNU (N,N-Bis(2-chloroéthyl)-N-nitrosourée), qui sont également capables d'induire l'apoptose.

Les composés actifs de formule (I) selon l'invention sont généralement administrés à une dose journalière d'environ 50 mg/kg à 100 mg/kg de poids corporel en 1 à 2 prises. La durée du traitement étant fonction des états pathologiques des sujets.

Les différents aspects de l'invention apparaîtront plus clairement à la lecture  
15 des divers exemples suivants destinés à l'illustrer.

### EXEMPLES

Exemple 1 : Préparation du 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de  
20 méthyle (composé N°1)

(a) 6,8-dimercapto octanoate de méthyle

Le lipoate de méthyle de départ est un composé connu qui a été décrit par Gunsalus et al., J.Am.Chem.Soc. 1956, 78, 1763-1766.

A 444 mg (2,02 mmol) de lipoate de méthyle en solution dans 25 ml d'un  
25 mélange méthanol/tétrahydrofurane (5/1), on ajoute à 0°C en deux fois 85 mg (2,25 mmol) de borohydrure de sodium.

Après 40 mn d'agitation à 0°C, on verse goutte à goutte de l'acide chlorhydrique 5N jusqu'à l'apparition d'un trouble blanc stable. Après évaporation du solvant, le résidu est repris dans de l'éther et on lave la phase organique par une solution  
30 aqueuse saturée de bicarbonate de sodium puis par une solution saturée de chlorure de sodium. Après séchage sur sulfate de sodium et évaporation de l'éther, on obtient 445 mg (99 %) du dithiol attendu.

(b) 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de méthyle

A 192 mg (1,6 mmol) d'acide 3-méthylthiopropionique dans 0,6 ml de dichlorométhane, on ajoute 8 mg (0,065 mmol) de 4-diméthylaminopyridine puis on introduit une solution de 355 mg (1,6 mmol) de 6,8-dimercaptooctanoate de méthyle, obtenue ci-dessus, dans 1 ml de dichlorométhane. On ajoute ensuite 33 mg (1,6 mmol) de dicyclohexylcarbodiimide à 0°C et laisse 5 mn à 0°C. Le mélange est ensuite porté à 18°C sous agitation pendant 3 heures. Après filtration et dilution du filtrat dans l'éther, on lave la phase organique avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, on sèche sur sulfate de magnésium et évapore l'éther. Le résidu obtenu est alors purifié par chromatographie sur gel de silice (25 g, éluant : éther de pétrole/acétate d'éthyle 85/15) et on isole 311 mg (60 %) du mercaptoester attendu sous forme d'une huile presque incolore (contaminant 5 à 10 % de 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoate de méthyle).

Exemple 2 : Préparation du 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de méthyle15 (composé N°3)

Ce composé est obtenu selon le même mode opératoire que celui décrit à l'exemple 1(b) mais en utilisant 3 équivalents molaires d'acide 3-méthylthiopropionique.

Le produit attendu est obtenu avec un rendement de 75 % sous forme d'une huile presque incolore.

20  $[\alpha]_D = -6,1$  (c:1,93 CHCl<sub>3</sub>) Série R

$[\alpha]_D = +6,8$  (c:2 CHCl<sub>3</sub>) Série S

Exemple 3 : Préparation du 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoated'isopropyle (composé N°16)25 (a) Lipoate d'isopropyle

A 1 g (4,85 mmol) d'acide lipoïque, 1,1 g (5,33 mmol) de dicyclohexylcarbodiimide et 0,061 g (0,5 mmol) de 4-diméthylaminopyridine placés sous azote, on ajoute 12 ml d'éther anhydre. Après 10 mn d'agitation à température ambiante, on ajoute 0,41 ml (5,35 mmol) d'isopropanol et on agite pendant 15 heures.

30 Après filtration des solides et dilution du filtrat dans l'éther, on lave la phase organique par une solution d'acide acétique à 5 % dans l'eau, puis par une solution aqueuse



saturée de bicarbonate de sodium et enfin par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium.

Après séchage sur sulfate de sodium et évaporation du solvant, le résidu est filtré sur gel de silice (20 g, éluant : éther de pétrole/acétate d'éthyle 85/15).

5           Après évaporation du solvant d'éluion, on obtient 1,095 g (91 %) de lipoate d'isopropyle sous forme d'une huile jaune.

(b) 6,8-dimercapto octanoate d'isopropyle

Ce composé est obtenu selon le même mode opératoire que celui décrit à l'exemple 1(a) par réduction du lipoate d'isopropyle à l'aide de borohydrure de sodium.

10           Echelle: 2mmol, rendement : 99 % (huile presque incolore).

(c) 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate d'isopropyle

Ce composé est obtenu selon le même mode opératoire que celui décrit à l'exemple 1(b) par acylation du 6,8-dimercapto octanoate d'isopropyle à l'aide d'un équivalent molaire d'acide 3-méthylthio-propanoïque. Après purification par  
15 chromatographie sur gel de silice, on isole le 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate d'isopropyle sous forme d'une huile (rendement : 60 %) (contaminant : 5 à 10 % de 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoate d'isopropyle et le 6-S, 8-S-bis(3-méthylthiopropionyl) octanoate d'isopropyle. Echelle : 2 mmol, rendement : 11 %.

20 Exemple 4 : Préparation du 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de n-butyle (composé N°9)

(a) Lipoate de n-butyle

Selon le même mode opératoire que celui décrit à l'exemple 3(a) pour la synthèse du lipoate d'isopropyle, l'estérification de l'acide lipoïque à l'aide de n-butanol  
25 conduit au produit attendu avec un rendement de 78 % sous forme d'une huile presque incolore. Echelle : 5 mmol.

(b) 6,8-dimercapto octanoate de n-butyle

Selon le même mode opératoire que celui décrit à l'exemple 1(a) pour la synthèse du 6,8-dimercapto octanoate de méthyle, la réduction du lipoate de n-butyle à  
30 l'aide du borohydrure de sodium conduit au produit attendu avec un rendement de 95 % sous forme d'une huile presque incolore. Echelle : 2 mmol.

(c) 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de n-butyle

Selon le même mode opératoire que celui décrit à l'exemple 2 pour la synthèse du 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de méthyle, l'acylation du 6,8-dimercapto octanoate de n-butyle à l'aide de 3 équivalents molaires d'acide 3-méthylthiopropionique conduit au produit attendu avec un rendement de 86 % sous forme  
5 d'une huile presque incolore. Echelle : 4 mmol.

Exemple 5 : Préparation du 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de tert-butyle (composé N°4)

10 (a) lipoate de t-butyle

Le mode opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 3(a) pour la synthèse du lipoate d'isopropyle. Par estérification de l'acide lipoïque à l'aide du tert-butanol, on obtient le produit attendu avec un rendement de 40 % sous forme d'une huile presque incolore. Echelle : 11 mmol.

15 (b) 6,8-dimercapto octanoate de t-butyle

Selon le même mode opératoire que celui décrit à l'exemple 1(a) pour la synthèse du 6,8-dimercapto octanoate de méthyle, la réduction du lipoate de tert-butyle à l'aide du borohydrure de sodium conduit au produit attendu avec un rendement de 95 % sous forme d'une huile presque incolore. Echelle : 11 mmol.

20 (c) 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de t-butyle

Le mode opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 1(a) pour la synthèse du 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de méthyle. Par acylation du 6,8-dimercapto octanoate de t-butyle à l'aide d'un équivalent molaire d'acide 3-méthylthiopropionique, on obtient le produit attendu avec un rendement de 60 % sous  
25 forme d'une huile presque incolore (contaminant : 5 % à 10 % de 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoate de t-butyle). Echelle : 10 mmol.

Exemple 6 : Préparation du 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de t-butyle (composé N°6)

30 Ce composé est préparé selon le même mode opératoire que celui décrit à l'exemple 2 pour la synthèse du 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de méthyle. L'acylation du 6,8-dimercapto octanoate de tert-butyle à l'aide de 3 équivalents molaires



d'acide 3-méthylthiopropanoïque conduit au produit attendu avec un rendement de 77 % sous forme d'une huile presque incolore. Echelle : 1 mmol.

Exemple 7 : Préparation de l'iodure de 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropanoyle) octanoate de (2'-triméthylammonium éthyle) (composé N°21)

(a) lipoate de 2-diméthylamino éthyle

A 1 g (4,85 mmol) d'acide lipoïque, 1,1 g (5,33 mmol) de dicyclohexylcarbodiimide et 0,061 g (0,5 mmol) de 4-diméthylaminopyridine placés sous azote, on ajoute 12 ml d'éther anhydre. Après 10 minutes d'agitation à température ambiante, 0,506 ml (5,33 mmol) de 2-diméthylamino éthanol est ajouté en une seule fois et on agite pendant 18 heures. Après filtration des solides et dilution du filtrat dans le dichlorométhane, on lave par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. Après séchage sur sulfate de sodium et évaporation du solvant, le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (80g, éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH = 90/10). On isole ainsi 832 mg (62 %) de l'ester attendu sous forme d'une huile jaune.

(b) 6,8-dimercapto octanoate de 2-diméthylamino éthyle

A 820 mg (3,0 mmol) de lipoate de 2-diméthylamino éthyle obtenu ci-dessus en solution dans 45 ml d'un mélange 5/1 méthanol/tétrahydrofurane, on ajoute, à 0°C, 134 mg (3,6 mmol) de borohydrure de sodium en deux fois. Après 3 heures d'agitation à 0°C, on ajoute goutte à goutte HCl 1N jusqu'à pH 5 puis on évapore le solvant, et le résidu est repris dans le dichlorométhane. On lave par une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium puis par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. Après séchage sur sulfate de sodium et évaporation, on obtient 780 mg (93 %) du dithiol attendu sous forme d'une huile presque incolore.

(c) 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropanoyle) octanoate de 2-diméthylamino éthyle

A 233 mg (0,84 mmol) de 6,8-dimercapto octanoate de 2-diméthylamino éthyle en solution dans 1,5 ml de dichlorométhane, on ajoute 1,2 ml de pyridine et on introduit ensuite à 0°C une solution de 348 mg (2,5 mmol) de chlorure de 3-méthylthiopropanoyle dans 2,7 ml de dichlorométhane. On porte à la température ambiante et agite pendant 18 heures. Le milieu réactionnel est partagé entre une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium et de dichlorométhane. La phase aqueuse est alors extraite 3 fois au dichlorométhane et l'on sèche la phase organique sur sulfate de sodium. Après évaporation,

le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (40g, éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 96/4). On isole ainsi 242 mg (60 %) du produit attendu sous forme d'une huile.

(d) iodure de 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de (2'-triméthyl ammonium éthyle)

5 A 250 mg (0,52 mmol) de 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de 2-diméthylamino éthyle dans 5,2 ml d'acétate d'éthyle, on ajoute 0,048 ml (0,77 mmol) d'iodure de méthyle à température ambiante puis on poursuit l'agitation pendant 5 heures. Le solvant est alors évaporé sous vide et le résidu est repris par 5 ml d'éther anhydre et la phase étherée est éliminée. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice  
10 (5g, éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH = 90/100). On isole 264 mg (81 %) du sel d'ammonium attendu sous forme non cristallisée et hygroscopique.

Exemple 8 : Préparation de la [6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoyl]

N-méthylpipérazine (composé N°22)

15 (a) (lipoyl)-N-méthyl pipérazine

A 200 mg (0,97 mmol) d'acide lipoïque, 240 mg (1,16 mmol) de dicyclohexylcarbodiimide et 12 mg (0,1 mmol) de 4-diméthylaminopyridine dans 1 ml de dichlorométhane, on ajoute à température ambiante une solution de 107 mg (1,07 mmol) de N-méthyl pipérazine dans 1,2 ml de dichlorométhane. Après 23 heures d'agitation,  
20 filtration des solides et dilution du filtrat dans le dichlorométhane, on lave par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. Après séchage sur sulfate de sodium et évaporation du solvant, le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (22 g, éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH = 92/8). On isole 216 mg (77 %) d'amide attendu sous forme d'une huile jaune.

25 (b) (6,8-dimercapto octanoyl)-N-méthyl pipérazine

Ce composé est obtenu selon le même mode opératoire que celui décrit à l'exemple 7(b) par réduction du (lipoyl)-N-méthyl pipérazine à l'aide du borohydrure de sodium. On obtient le produit attendu avec un rendement de 94 % sous forme d'une huile presque incolore. Echelle : 0,4 mmol.

30 (c) [6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoyl]-N-méthyl pipérazine

Le mode opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 7(c) pour la synthèse du 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de 2-diméthylamino éthyle.



L'acylation du (6,8-dimercapto octanoyl) N-méthyl pipérazine à l'aide de 3 équivalents molaires de chlorure de 3-méthylthiopropanoyle conduit au produit attendu avec un rendement de 90 % sous forme d'une huile presque incolore. Echelle : 0,4 mmol.

5 Exemple 9 : Préparation du 6-S-(3-méthylthiopropanoyl), 8-S-acétyl octanoate de méthyle (composé N° 24)

(a) 6-mercapto, 8-S-acétyl octanoate de méthyle

A un mélange de 3,045 g (13,7 mmol) de 6,8-dimercapto octanoate de méthyle et 11,08 ml (13,7 mmol) de pyridine sont ajoutés goutte à goutte à 0°C 1,29 ml  
10 (13,7 mmol) d'anhydride acétique, le mélange est ensuite porté à température ambiante et agité pendant 20 h.

Après dilution dans l'éther et lavages par une solution d'acide chlorhydrique 1N et par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, on sèche sur sulfate de sodium. Après évaporation du solvant, le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de  
15 silice (200 g éther de pétrole / acétate d'éthyle = 90/10). On isole ainsi 2,235 g (61 %) de monoacétate attendu sous forme d'une huile légèrement jaune (contaminant : 6-S-acétyl, 8-mercapto octanoate de méthyle : environ 10 %).

(b) 6-S-(3-méthylthiopropanoyl), 8-S-acétyl octanoate de méthyle

A 2,23 g (8,4 mmol) de 6-mercapto, 8-S-acétyl octanoate de méthyle en  
20 solution dans 35 ml de dichlorométhane est ajouté 1,76 ml (10,1 mmol) de diisopropyléthylamine. Une solution de 1,403 g (10,1 mmol) de chlorure de 3-méthylthiopropanoyle dans 5 ml de dichlorométhane est ajouté à -50°C et le milieu réactionnel est porté à -25°C en 30 mn.

Après dilution dans l'éther et lavages par une solution aqueuse saturée de  
25 chlorure de sodium, on sèche sur sulfate de sodium. Après évaporation du solvant, le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (200 g éther de pétrole / acétate d'éthyle = 90/10). On isole ainsi 2,96 g (96 %) de produit attendu (contaminant : 6-S-acétyl, 8-S-(3-méthylthiopropanoyl) octanoate de méthyle : environ 10 %).

Exemple 10 : Préparation du 6-S-acétyl, 8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de méthyle (composé N° 23)

(a) Anhydride de l'acide 3-méthylthiopropionique

A 0,345 ml (3,33 mmol) d'acide 3-méthylthiopropionique en solution dans  
5 9 ml d'éther, sont ajoutés 378 mg (1,83 mmol) de dicyclohexylcarbodiimide. Après 24 h de  
réaction à température ambiante, la dicyclohexylurée est éliminée par filtration et le filtrat  
est évaporé à sec. On obtient ainsi l'anhydride attendu (rdt. Quantitatif) que l'on utilise  
immédiatement dans l'étape suivante.

(b) 6-mercapto, 8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de méthyle

10 Ce composé est obtenu selon le même mode opératoire que celui décrit à  
l'exemple 9(a) pour la synthèse du 6-mercapto, 8-S-acétyl octanoate de méthyle en  
remplaçant l'anhydride acétique par l'anhydride de l'acide 3-méthylthiopropionique décrit  
ci-dessus en (a). Le produit attendu est obtenu avec un rendement de 60 % (contaminant :  
environ 10 % de 6-S-(3-méthylthiopropionyl), 8-mercapto octanoate de méthyle).

15 Echelle : 1,7 mmol

Purification par chromatographie sur gel de silice (60 g éther de pétrole /  
acétate d'éthyle = 90/10).

(c) 6-S-acétyl, 8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de méthyle

20 Le mode opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 9(a) pour la  
synthèse du 6-mercapto, 8-S-acétyl octanoate de méthyle (acétylation à l'aide d'anhydride  
acétique dans la pyridine). Le produit attendu est obtenu avec un rendement de 88 %  
(contaminant : environ 10 % de 6-S-(3-méthylthiopropionyl), 8-S-acétyl octanoate de  
méthyle).

Echelle : 0,4 mmol

25 Purification par chromatographie sur gel de silice (5 g éther de pétrole / acétate  
d'éthyle = 85/15).



ETUDES D'ACTIVITEI- Effet des composés N° 1(RS), 1(S), 1(R), 3(RS), 4(RS), 6(RS), 9(RS), 21(RS) et 24(RS) sur la croissance de lignées cellulaires normales et transformées

5

L'activité d'inhibition de croissance des composés de l'invention est établie sur la lignée semi-continue de fibroblastes pulmonaires humains MRC-5 d'origine embryonnaire, et soit sur les lignées cellulaires transformées HeLa établies à partir de cellules épithéliales humaines issues d'un cancer utérin, soit les lignées DU 145, PC3 et LNCaP établies à partir de cancers de la prostate et sur les lignées B16 de mélanomes de souris.

10

Les différentes lignées cellulaires sont étalées sur boîte de Pétri à une concentration de  $0,5 \times 10^6$  et sont cultivées dans 3 ml d'un milieu essentiel de Eagle\* contenant 10 % en volume de sérum de veau fœtal dialysé.

15

Après 4 heures, les cellules sont mises en culture en présence des différents composés à tester en concentration croissante (1 à 800  $\mu$ M). Après incubation pendant 72 heures, les cellules sont lavées deux fois dans un milieu salin tamponné à pH 7,5 et phosphaté (tampon PBS) puis récupérées dans le même tampon PBS.

20

L'inhibition de la croissance cellulaire est évaluée soit en mesurant la teneur en protéines selon la méthode décrite par Lowry et al. (J. Biol. Chem., 193, 265, 1951), soit en mesurant la teneur en ADN à l'aide du colorant de Hoechst selon la méthode décrite par West et al. (Analytical Biochem. 147, 289 (1985), ou encore en déterminant l'activité des déshydrogénases selon la méthode décrite par Mosmann T. (J. Immunol. Methods, 65, 55, 1983).

25

Les résultats des tests d'inhibition sélective de la croissance cellulaire pour les composés N°1 (RS), 1 (R), 1 (S), 3 (RS), 4 (RS), 6 (RS), 9 (RS), 21 (RS) et 24(RS) testés sont rassemblés dans les Figures 3 à 11.

30

Les résultats rassemblés à la Figure 3 montrent clairement que le composé N°1 (RS) induit une inhibition de croissance des cellules HeLa de 40 % à une concentration de 400  $\mu$ M et de 70 % à une concentration de 600  $\mu$ M tandis que l'inhibition de croissance des cellules fibroblastiques normales MRC-5 ne dépasse pas 5-10 % aux mêmes concentrations.

\* (marque de commerce)

Le composé N°1 (S) (voir Figure 4) inhibe également de manière sélective la croissance des cellules HeLa avec une inhibition s'élevant à 90 % à une concentration de 400  $\mu$ M et de 100 % à une concentration de 600  $\mu$ M, alors que l'inhibition de croissance des cellules normales MRC-5 ne dépasse pas 20 % même à des concentrations plus élevées  
5 comprises entre 600 et 800  $\mu$ M.

Enfin, le composé N°1 (R) (voir Figure 5) inhibe la croissance des cellules HeLa de 40 % à une concentration de 400  $\mu$ M, et de 100 % à des concentrations comprises entre 600 et 800  $\mu$ M.

Le composé N°1, soit sous sa forme racémique, soit sous forme de l'un de ses  
10 énantiomères, est capable d'inhiber, à des concentrations comprises entre 400 et 600  $\mu$ M, de manière sélective et efficace, la croissance de cellules transformées HeLa en n'inhibant que faiblement celle des cellules fibroblastiques normales MRC-5.

Par ailleurs, les résultats obtenus avec le composé N°3 (RS) sont rassemblés à la Figure 6, et montrent qu'à des concentrations comprises entre 200 et 600  $\mu$ M, celui-ci  
15 induit une inhibition de croissance des cellules HeLa de 50 % et n'inhibe pas la croissance des cellules normales MRC-5.

Selon les résultats illustrés à la Figure 7, le composé N°4 (RS) est un inhibiteur très sélectif de la croissance des cellules HeLa, puisque celui-ci induit une inhibition de croissance sélective des cellules HeLa d'environ 70 %, à partir d'une concentration de  
20 200  $\mu$ M, tandis qu'il n'inhibe la croissance des cellules MRC-5 que de 20 % à une concentration équivalente.

Le composé N°6 sous sa forme racémique (Figure 8) est capable d'inhiber à des concentrations comprises entre 50 et 600  $\mu$ M de manière sélective et efficace la croissance de cellules transformées HeLa. En revanche, la croissance de cellules normales MRC-5 est  
25 stimulée de l'ordre de 40 %.

Le composé N°9 sous sa forme racémique (Figure 9) est capable d'inhiber à des concentrations comprises entre 50 et 600  $\mu$ M de manière sélective et efficace la croissance de cellules transformées HeLa. En revanche, la croissance de cellules normales MRC-5 est stimulée de l'ordre de 20 %.

Les résultats présentés à la Figure 10 montrent que le composé 21 sous sa forme  
30 racémique est capable d'inhiber la croissance de cellules transformées HeLa de 80 % à



400  $\mu$ M tandis que celle de cellules normales n'est inhibée que de 20 % à cette même concentration.

Des résultats similaires ont été observés à l'égard des stéréoisomères R et S des composés 6, 9 et 21.

5 Enfin, les résultats rassemblés à la Figure 11 montrent que le composé N°24 sous sa forme racémique est capable d'induire une inhibition de croissance des cellules transformées murines B16 et humaines DU 145, PC3 et LNCaP de 50 à 60 % à une concentration de 400  $\mu$ M alors qu'à cette même concentration, l'inhibition des cellules normales MRC-S est seulement de 10 %.

10 Cette inhibition de croissance des cellules transformées telles que les cellules HeLa est due à l'augmentation du pourcentage de cellules entrant en apoptose, comme cela sera démontré ci-après. En effet, le pourcentage de fragmentation de l'ADN est corrélé avec le phénomène d'apoptose.

15 II : Effet du composé N°1 (RS) en tant qu'agent inducteur de l'apoptose mesurée par la fragmentation de l'ADN dans les cellules HeLa

L'analyse quantitative des fragments d'ADN de taille inférieure à 3 Kb a été réalisée selon la méthode décrite par Wright S. et al. (J. Cell. Biochem., 48, 344-355), en incubant  
 20 2,5x10<sup>5</sup> cellules HeLa/ml avec 0.5 $\mu$ Ci[3H]-thymidine pendant 40 heures à 37°C. Après deux lavages avec le milieu de culture, les cellules sont mises en culture en présence du composé N°1 (RS) à tester à une concentration de 200  $\mu$ M. Après incubation pendant 6 heures, les 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 2 ml à  
 25 0,1 % de Triton X-100\*, 20 mM d'EDTA, 5 mM Tris pH 8 et centrifugées à 30000 g à 4°C pendant 30 minutes. Les surnageants sont récupérés et les culots dissous dans 0,3ml de 0,5N NaOH. Des aliquots du milieu de culture (1ml), du surnageant (0,3ml), et du culot solubilisé (0,1ml) sont mis à doser dans un compteur à scintillation.

Le pourcentage de fragments d'ADN est calculé de la façon suivante:

30 
$$\% \text{ de fragments} = \frac{\text{dpm du milieu de culture} + \text{dpm du surnageant d'ADN}}{\text{dpm du milieu de culture} + \text{dpm du surnageant} + \text{dpm du culot solubilisé}}$$

\* (marques de commerce)

Les résultats qui sont rassemblés dans la Figure 12 montrent très clairement que, dans les cellules HeLa, le composé N°1 (RS) induit une augmentation du pourcentage de fragmentation de l'ADN de l'ordre de 17 % à 100  $\mu$ M et 30 % à 200  $\mu$ M.

5 **III : Action antitumorale in vivo du composé N°1 (RS)**

L'action antitumorale du composé N°1 (RS) a été testée *in vivo* sur des souris B6D2F1 (IFFA CREDO, France) qui ont reçu à t=0 jour,  $2 \times 10^5$  cellules de mélanomes murins B16 en injection sous-cutanée.

10 A t=1 jour et ceci de manière continue une fois par jour pendant 15 jours, les souris ont été injectées par voie intrapéritonéale avec les régimes thérapeutiques suivants : éthanol 10 % dans une solution aqueuse de NaCl 0,14M, et le composé N°1(RS) soit à 50 mg/kg, soit à 100 mg/kg.

15 La croissance de la tumeur est ensuite observée sur une période allant de 10 à 60 jours. Les résultats sont exprimés en pourcentage de souris présentant des tumeurs.

20 La Figure 13 montre que le composé N°1(RS) est très efficace pour contrôler la croissance de la tumeur. En effet, le pourcentage de souris qui développent des tumeurs atteint 50 % dans les contrôles qui ont reçu le véhicule constitué de 10 % d'éthanol dans une solution aqueuse de NaCl 0,14 M, tandis qu'il n'atteint que 20 % et 10 % chez les souris ayant reçu le composé 1 (RS) à 50 mg/kg et 100 mg/kg, respectivement.



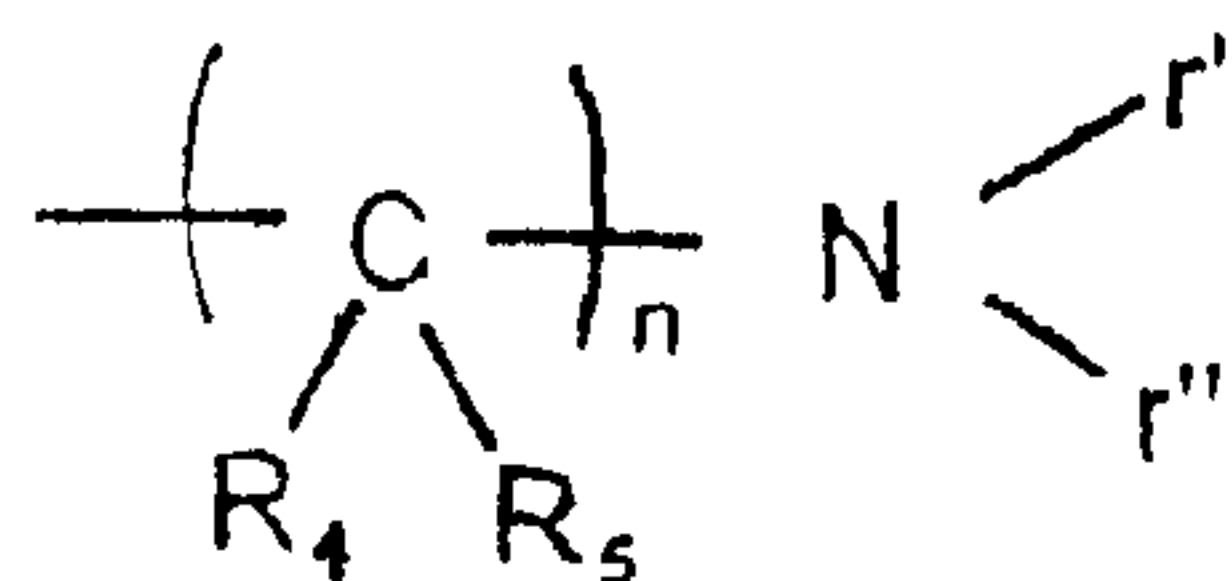


sous réserve que l'un au moins des radicaux  $R_1$  ou  $R_2$  représente un radical de formule (II) et les énantiomères R et S et leur racémique ainsi que les sels dudit composé de formule (I).

2. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que  $R_3$  est H, ainsi que les sels dudit composé.

3. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que  $R_3$  est un radical alkyle, linéaire ou  
10 ramifié.

4. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que  $R_3$  est un radical de formule:



n étant un nombre entier de 1 à 10, et  $r'$  et  $r''$ , identiques ou différents, représentant un atome d'hydrogène, un  
20 radical alkyle, linéaire ou ramifié ou, pris ensemble forment, avec l'atome d'azote, un hétérocycle azoté éventuellement substitué par un atome d'oxygène ou d'azote éventuellement substitué,

$R_4$  et  $R_5$ , identiques ou différents, représentant un atome d'hydrogène ou un radical alkyle linéaire ou ramifié, ainsi que les sels dudit composé.



5. Composé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que les sels sont formés à partir d'un acide minéral ou organique.

6. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que les sels sont des sels d'ammonium quaternaire.

7. Composé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que les sels sont des sels de triméthylammonium.

10 8. Composé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que les sels sont des halogénures de triméthylammonium.

9. Composé selon la revendication 8, caractérisé par le fait que les sels sont des iodures de triméthylammonium.

10. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé par le fait que l'un de  $R_1$  ou  $R_2$  est H et l'autre est un radical de formule (II).

20 11. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé par le fait que l'un de  $R_1$  ou  $R_2$  est  $-\text{COCH}_3$  et l'autre est un radical de formule (II).

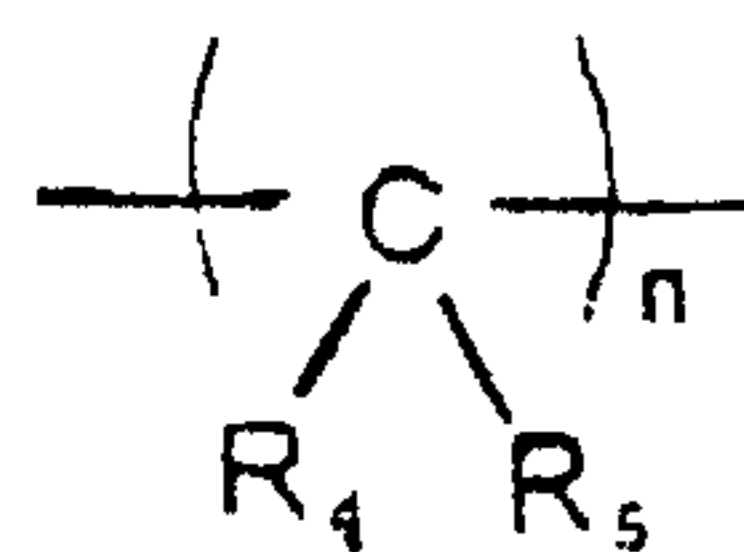
12. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé par le fait que  $R_1$  et  $R_2$  représentent un radical de formule (II).

13. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé par le fait que le radical alkyle, linéaire ou ramifié, contient de 1 à 6 atomes de carbone.

14. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 et 4 à 13, caractérisé par le fait que l'indice "n" est compris entre 2 et 6.

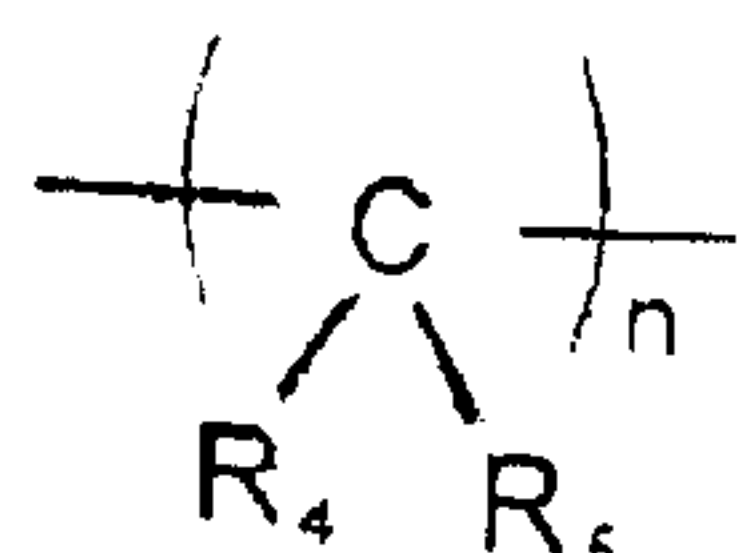
15. Composé selon la revendication 14, caractérisé par le fait que le radical divalent

10



est le radical éthylène.

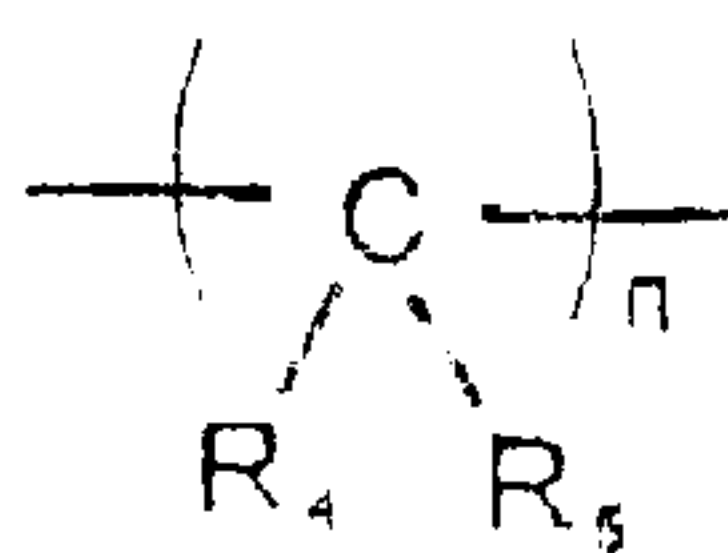
16. Composé selon la revendication 14, caractérisé par le fait que le radical divalent



est un radical propylène.

20

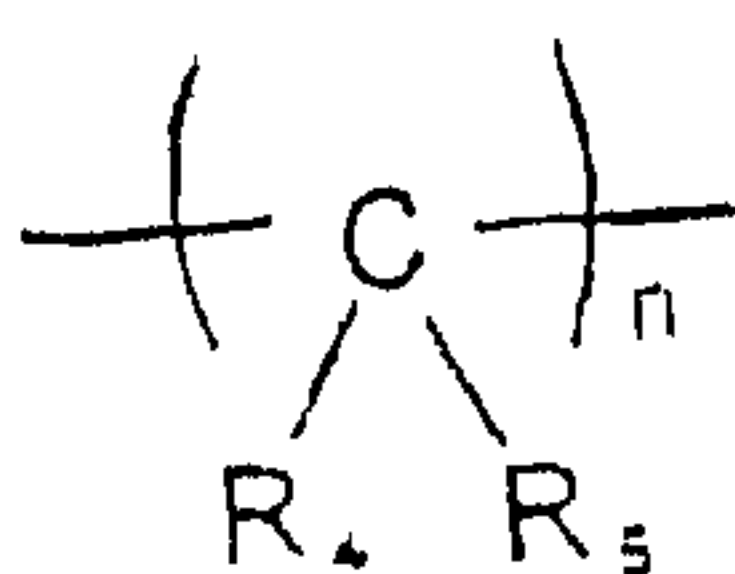
17. Composé selon la revendication 14, caractérisé par le fait que le radical divalent



est le radical butylène.



18. Composé selon la revendication 14, caractérisé par le fait que le radical divalent



est le radical méthyl-2-propane-1,2-diyle.

19. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'hétérocycle azoté est choisi parmi la morpholine, la pyrrolidine, la pipérazine, l'homopipérazine et une N-alkyl (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) pipérazine.

10 20. Composé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que l'hétérocycle azoté est choisi parmi la morpholine et ses sels.

21. Composé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que l'hétérocycle azoté est choisi parmi la pyrrolidine et ses sels.

22. Composé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que l'hétérocycle azoté est choisi parmi la pipérazine et ses sels.

20 23. Composé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que l'hétérocycle azoté est choisi parmi l'homopipérazine et ses sels.

24. Composé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que l'hétérocycle azoté est choisi parmi une N-alkyl (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)pipérazine et ses sels.

25. Composé selon l'une quelconque des revendications 20 à 24, caractérisé en ce que le sel est un halogénure de N-alkylpipérazonium.

26. Composé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait que les sels sont choisis parmi les sels d'une base minérale et les sels d'une base organique lorsqu'ils comportent une fonction acide carboxylique.

27. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que les sels sont choisis parmi les sels d'un acide minéral et les sels d'un acide organique lorsqu'ils comportent une fonction amine salifiable.

28. Composé selon la revendication 27, caractérisé par le fait que les sels sont choisis parmi les halogénures.

29. Composé selon la revendication 27, caractérisé par le fait que les sels sont choisis parmi les nitrates.

30. Composé selon la revendication 27, caractérisé par le fait que les sels sont choisis parmi les sulfates.

31. Composé selon la revendication 27, caractérisé par le fait que les sels sont choisis parmi les sulfonates.

32. Composé selon la revendication 27, caractérisé par le fait que les sels sont choisis parmi les carboxylates.



33. Composé selon la revendication 27, caractérisé par le fait que les sels sont choisis parmi les thiocyanates.

34. Composé selon la revendication 27, caractérisé par le fait que les sels sont choisis parmi les phosphates.

35. Composé selon la revendication 27, caractérisé par le fait qu'il est choisi dans le groupe constitué par:

- 10 le 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de méthyle,  
 le 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoate de méthyle,  
 le 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de méthyle,  
 le 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de tertiobutyle,  
 le 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoate de tertiobutyle,  
 20 le 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de tertiobutyle,  
 le 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de n-butyle,  
 le 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoate de n-butyle,  
 le 6-S,8-S-bis(3-méthylthiopropionyl) octanoate de n-butyle,  
 l'acide 6-mercapto-8-S(3-méthylthiopropionyl) octanoïque,  
 l'acide 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoïque,  
 30 l'acide 6-S,8-S-bis(3-méthylthiopropionyl) octanoïque,

- le 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate  
d'éthyle,
- le 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoate  
d'éthyle,
- le 6-S,8-S-bis(3-méthylthiopropionyl) octanoate d'éthyle,
- le 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate  
d'isopropyle,
- le 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto octanoate  
d'isopropyle,
- 10 le 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate  
d'isopropyle,
- l'iodure de 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropionyl)  
octanoate de (2' triméthyl ammonium éthyle),
- l'iodure de 6-S-(3-méthylthiopropionyl) 8-mercapto  
octanoate de (2' triméthyl ammonium éthyle),
- l'iodure de 6-S,8-bis (3-méthylthiopropionyl) octanoate de  
(2' triméthyl ammonium éthyle),
- le [6-S,8-S-bis(3-méthylthiopropionyl) octanoyl]-N-méthyl  
pipérazine,
- 20 le 6-S-acétyl, 8-S-(3-méthylthiopropionyl) octanoate de  
méthyle,
- le 6-S-(3-méthylthiopropionyl), 8-S-acétyl octanoate de  
méthyle,
- l'iodure de 6-S-acétyl, 8-S-(3-méthylthiopropionyl)  
octanoate de (2' triméthyl ammonium éthyle), et
- iodure de 6-S-(3-méthylthiopropionyl), 8-S-acétyl octanoate  
de (2' triméthyl ammonium éthyle).

36. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est un 6-mercapto-8-S-(3-méthyl-  
30 thiopropionyl), octanoate de méthyle.



37. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est un 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropanoyle) octanoate de méthyle.

38. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est un 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropanoyle) octanoate d'isopropyle.

39. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est un 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropanoyle) octanoate de n-butyle.

10 40. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est un 6-mercapto-8-S-(3-méthylthiopropanoyle) octanoate de tert-butyle.

41. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est un 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropanoyle) octanoate de tert-butyle.

42. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est un 6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropanoyle) octanoate de (2'-triméthylammonium éthyle).

20 43. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est un [6-S,8-S-bis (3-méthylthiopropanoyle) octanoyle] N-méthylpipérazine.

44. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est un 6-S-(3-méthylthiopropanoyle),8-S-acétyl octanoate de méthyle.

45. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est un 6-S-acétyl,8-S-(3-méthylthiopropanoyl) octanoate de méthyle.

46. Composition pharmaceutique caractérisé par le fait qu'elle contient au moins un composé actif selon l'une quelconque des revendications 1 à 45, dans un excipient pharmaceutiquement acceptable.

47. Composition pharmaceutique selon la revendication 46, caractérisée par le fait qu'elle contient le  
10 composé actif en une quantité efficace pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses chez un sujet humain ou animal.

48. Composition pharmaceutique selon la revendication 46 ou 47, caractérisée par le fait qu'elle contient le composé actif en une quantité efficace pour le traitement, la régression et la prévention de cancer chez un sujet humain ou animal.

49. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 46 à 48, caractérisée par le  
20 fait qu'elle se présente sous une forme destinée à une administration par voie parentérale.

50. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 46 à 48, caractérisée par le fait qu'elle se présente sous forme destinée à une administration par voie entérale.

51. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 46 à 48, caractérisée par le



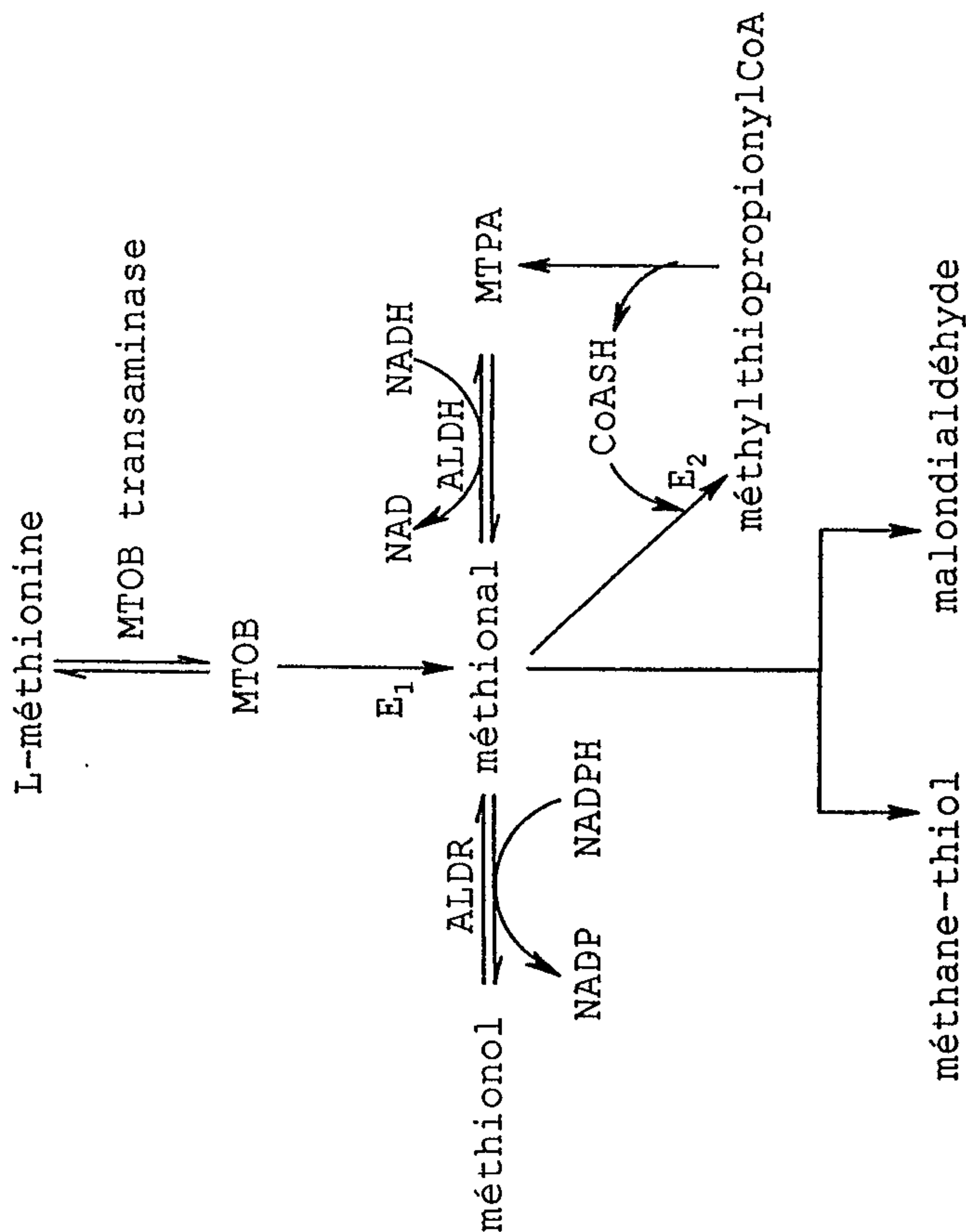
fait qu'elle se présente sous une forme destinée à une administration par voie topique.

52. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 46 à 51, caractérisée par le fait que le composé actif est présent à une concentration comprise entre 0,1 et 10% en poids par rapport au poids total de la composition.

10 53. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 46 à 52, caractérisée par le fait que le composé actif est présent à une concentration comprise entre 0,1 et 5% en poids par rapport au poids total de la composition.

54. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 46 à 53, caractérisée par le fait qu'elle est administrée à une dose journalière de 50mg/kg à 100mg/kg de poids corporel. .

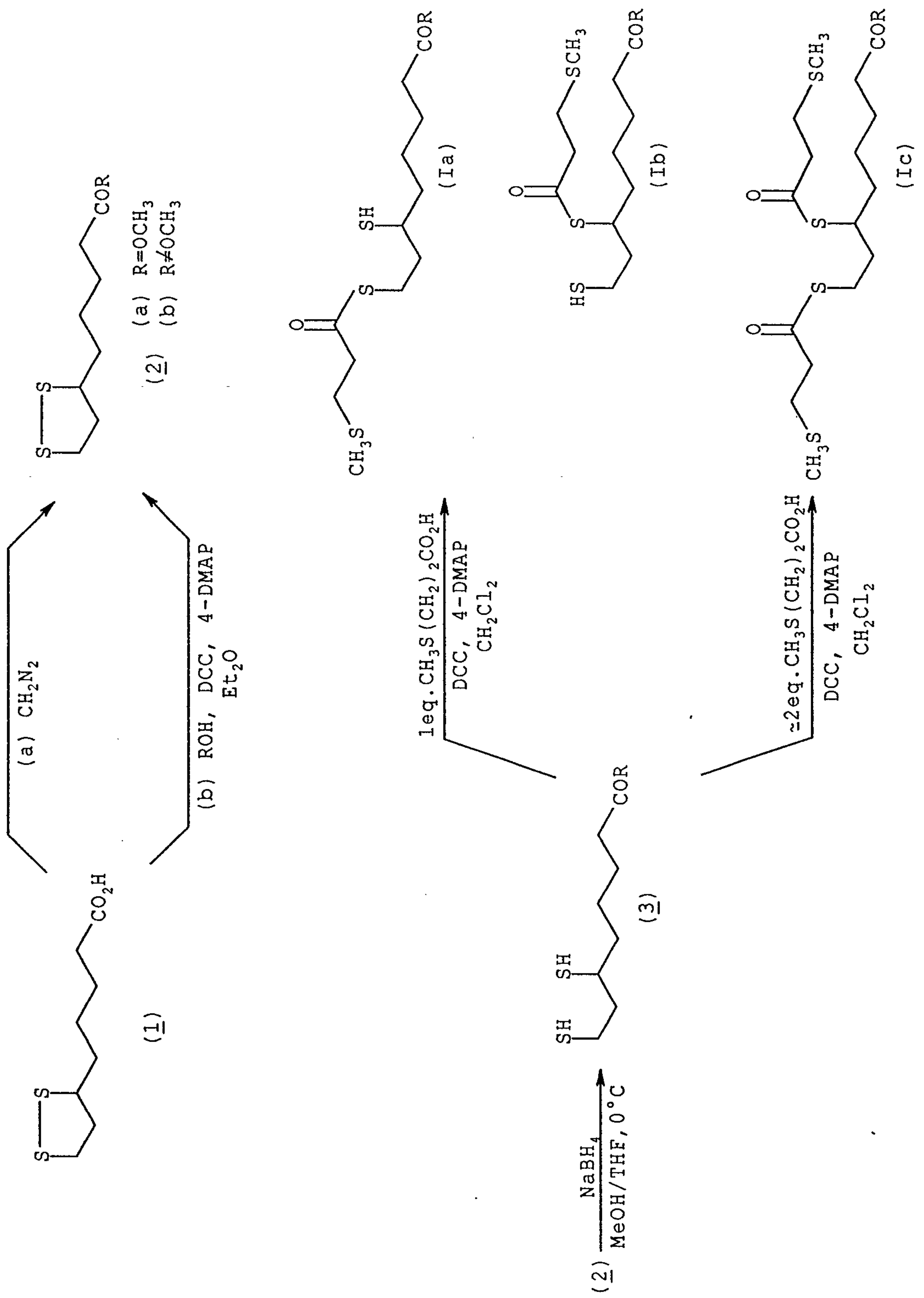
20 55. Utilisation d'un composé qui est un dérivé de l'acide 6-8-dimercaptooctanoïque substitué en 6-S et/ou 8-S par le radical (3-méthylthiopropionyl) selon l'une quelconque des revendications 1 à 45, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement, à la régression et à la prévention des tumeurs cancéreuses.

**FIGURE 1**

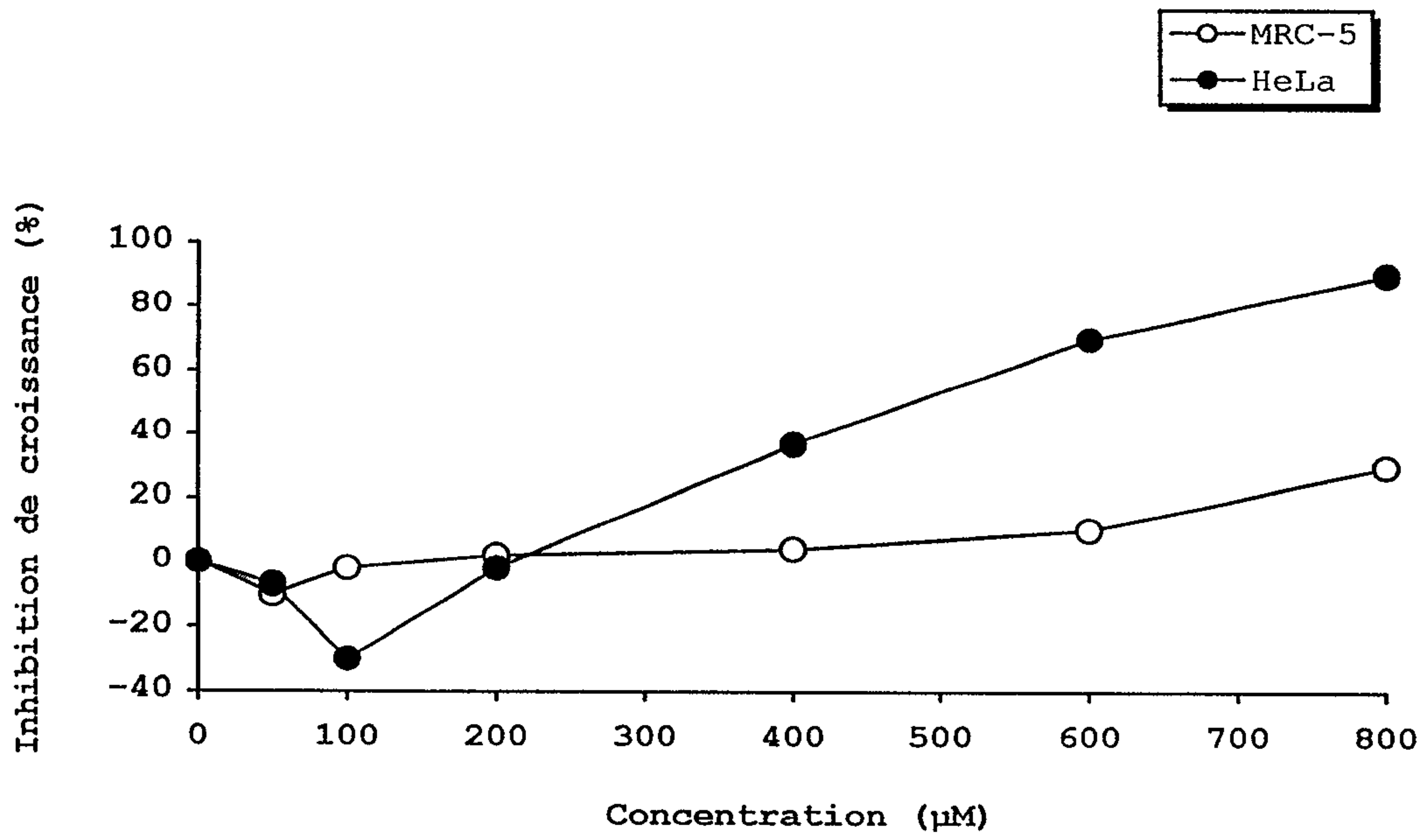
- MTOB représente l'acide 4-méthylthio-2-oxobutanoïque,
- MTPA représente l'acide méthylthiopropionique,
- E<sub>1</sub> représente la décarboxylase du complexe déshydrogénase oxo-acide à chaîne branchée dont le co-facteur est la thiamine pyrophosphate,
- E<sub>2</sub> représente la transacylase du complexe déshydrogénase oxo-acide à chaîne branchée dont le co-facteur est l'acide thioctique,
- ALDR représente l'aldéhyde réductase,
- ALDH représente l'aldéhyde déshydrogénase,
- CoASH représente l'acétyl coenzyme A,
- NADH/NAD représente le nicotinamide adénine dinucléotide, et
- NADPH/NADP représente le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.



**FIGURE 2**



**FIGURE 3**



**FIGURE 4**

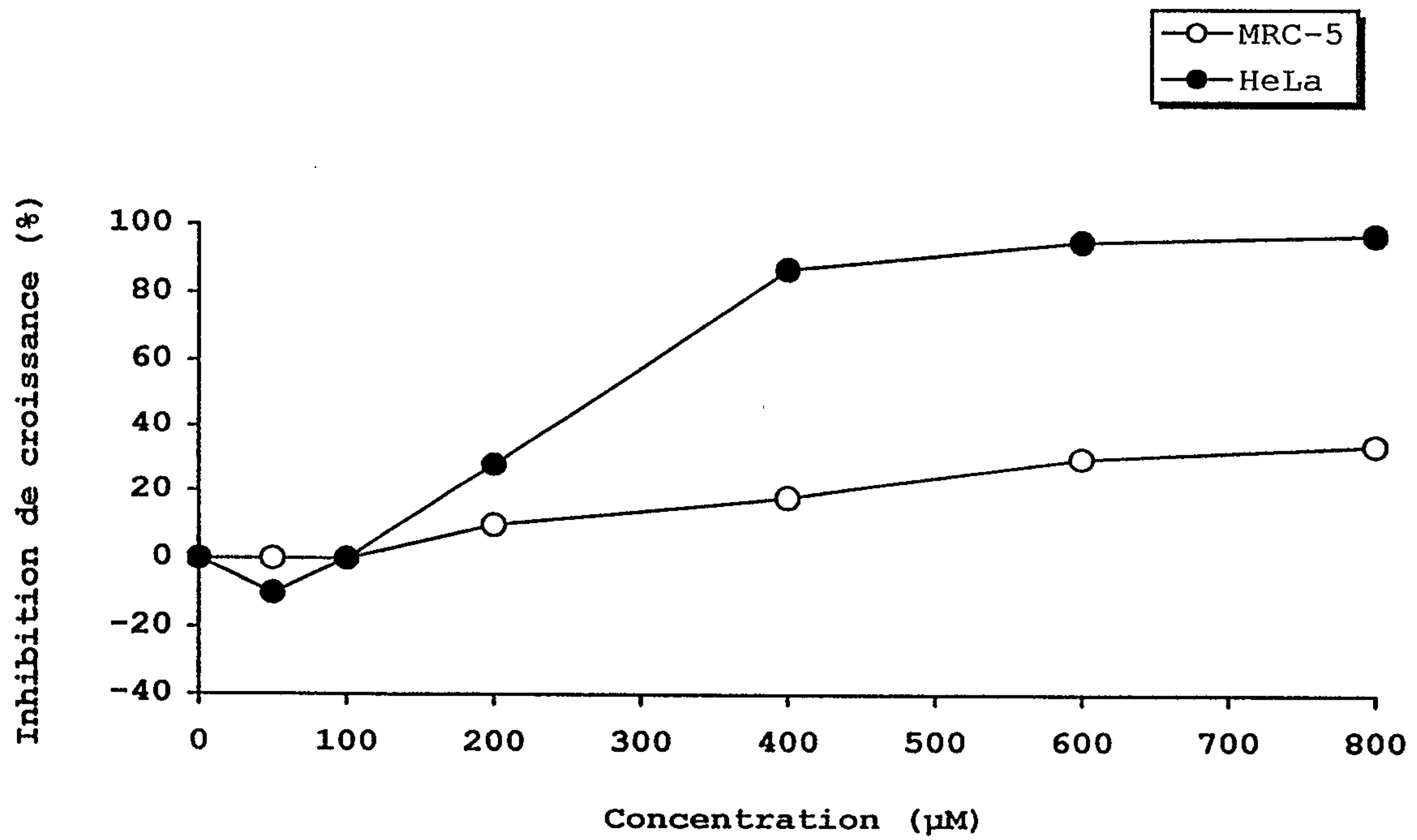




FIGURE 5

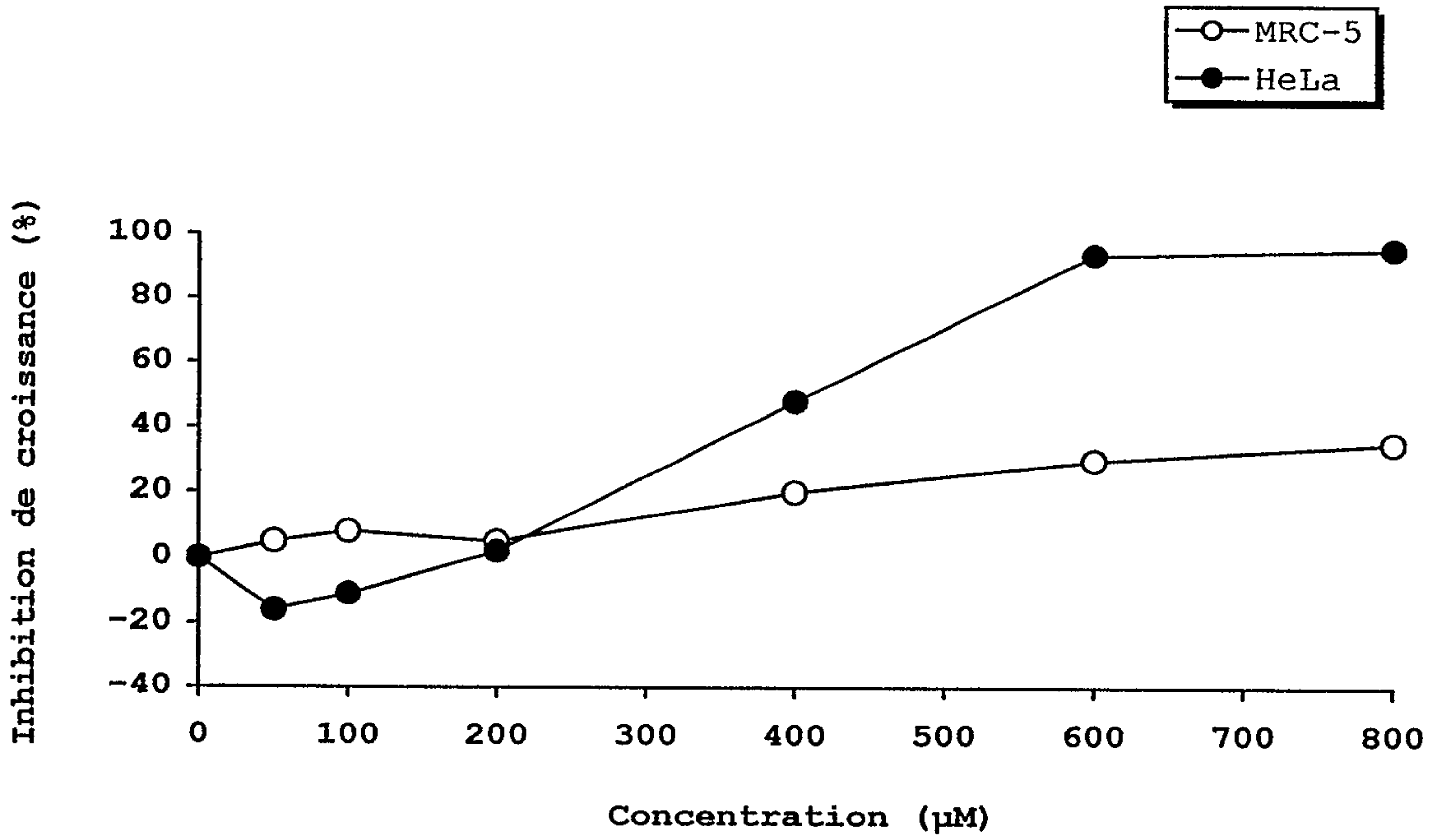


FIGURE 6

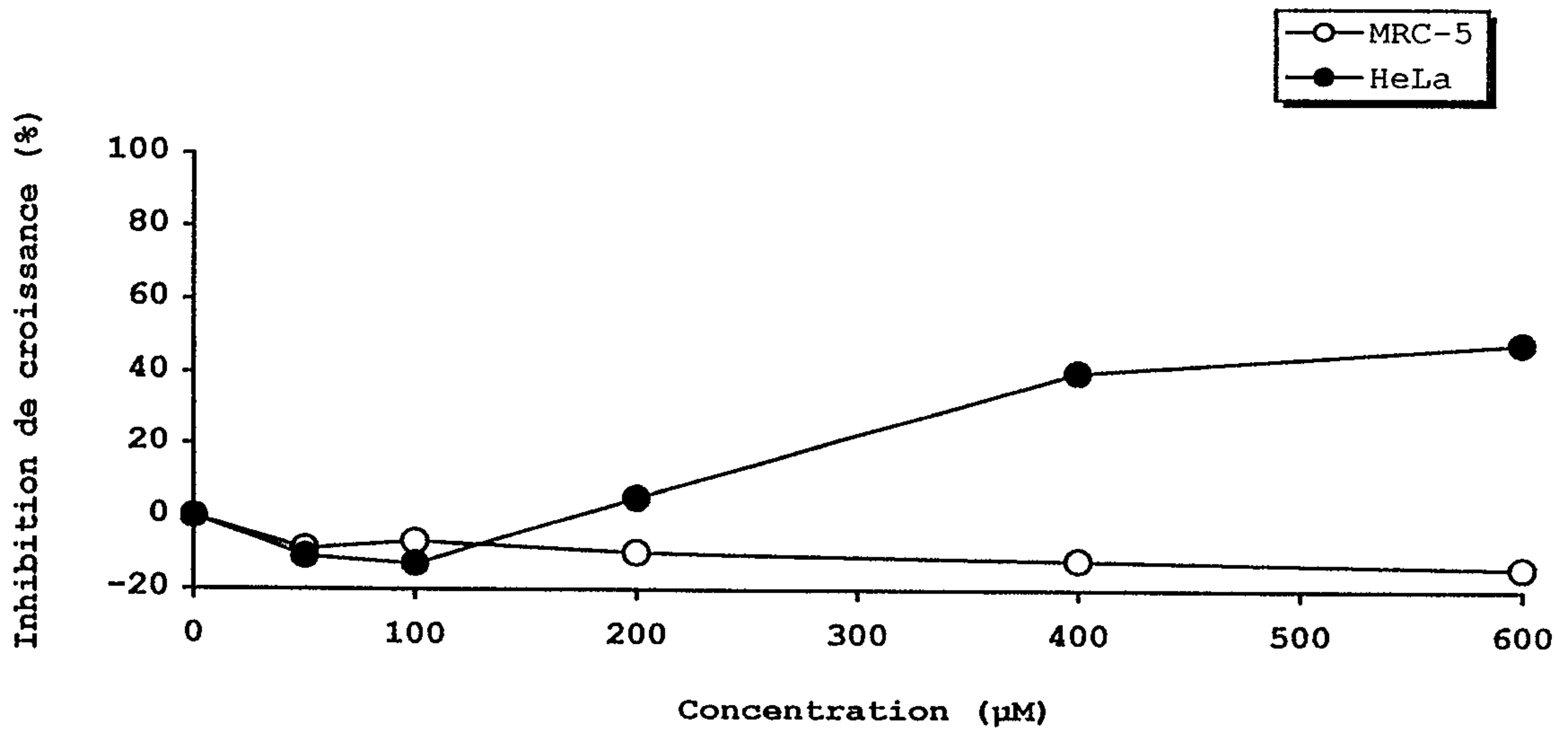


FIGURE 7

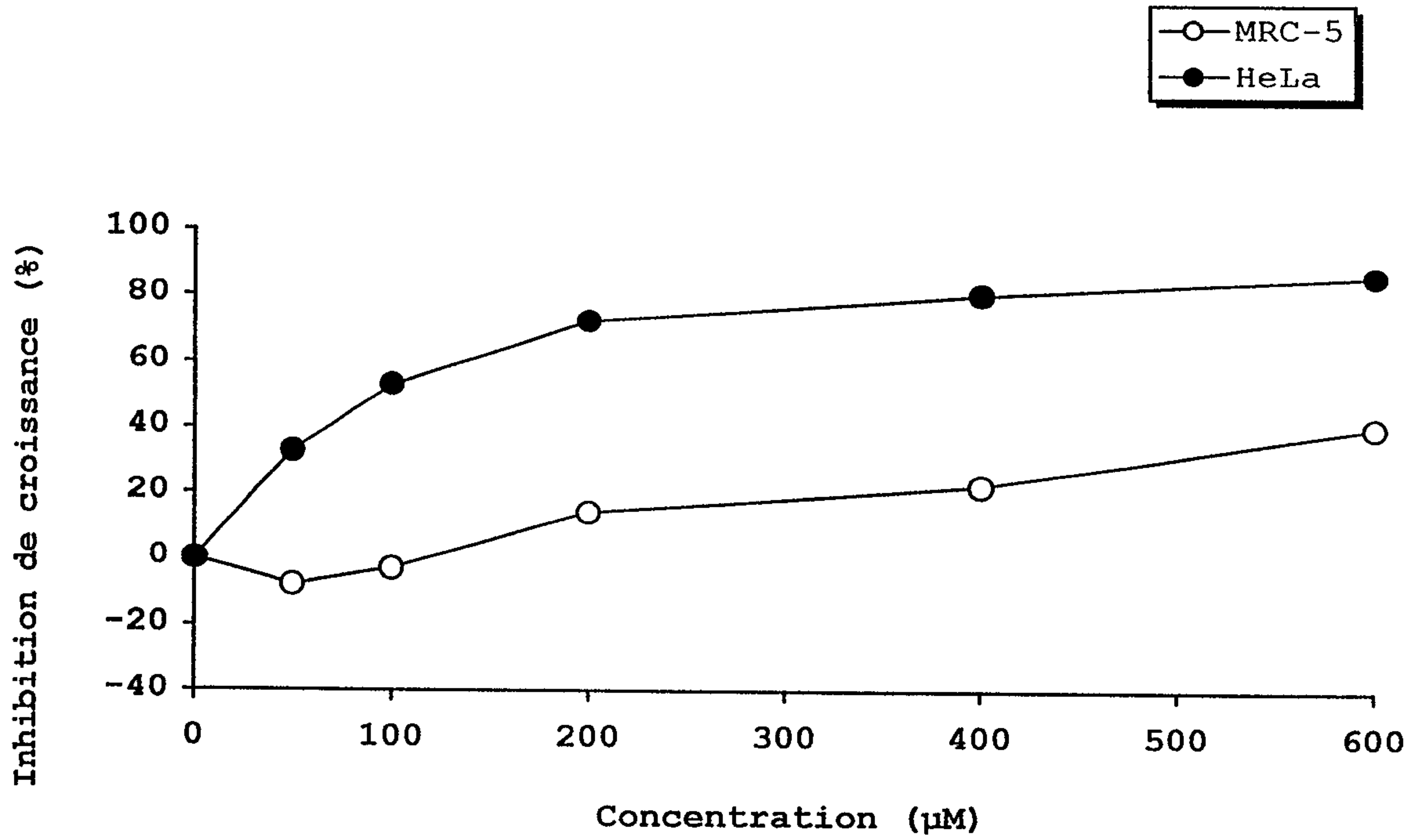


FIGURE 8

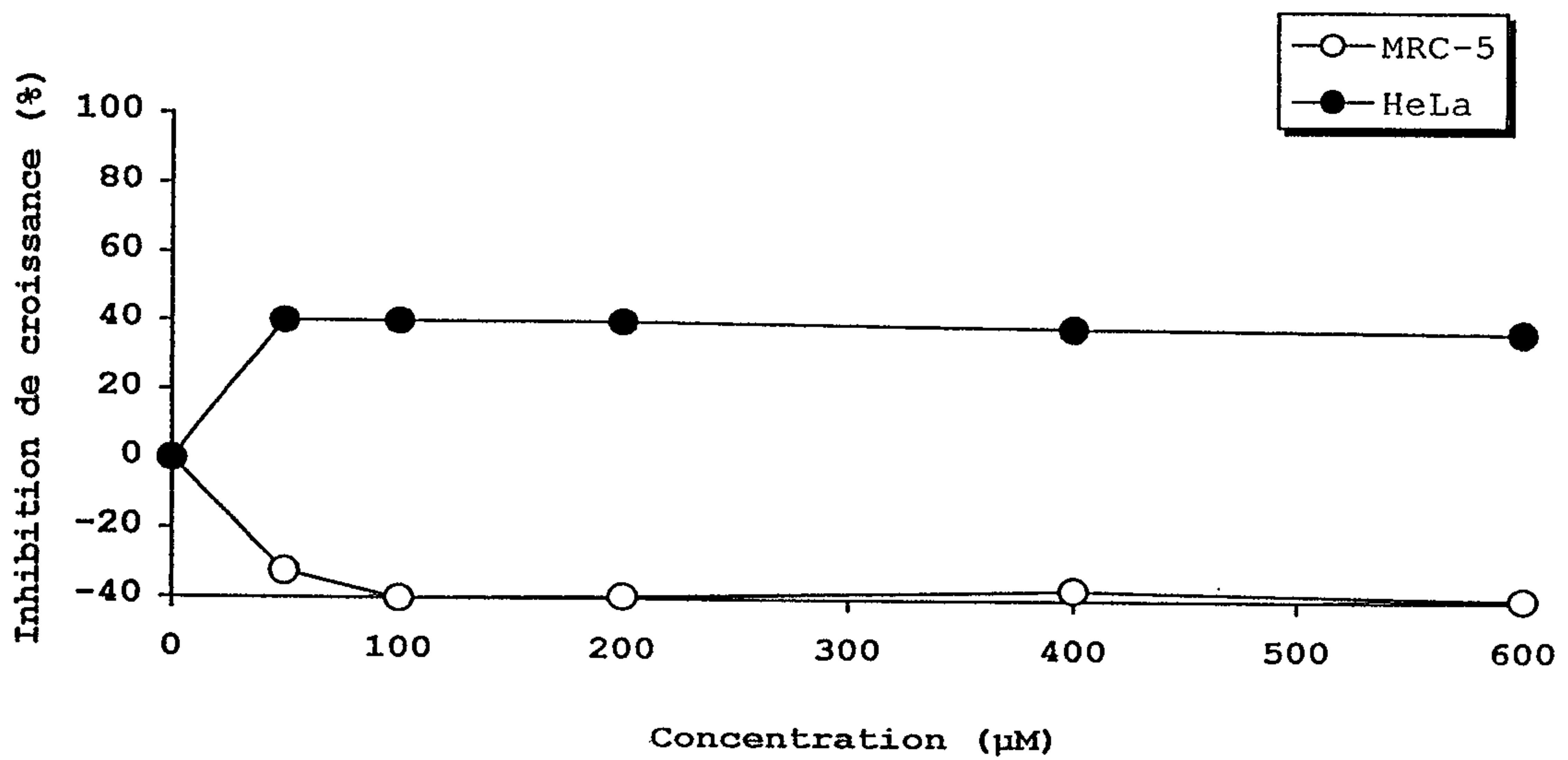




FIGURE 9

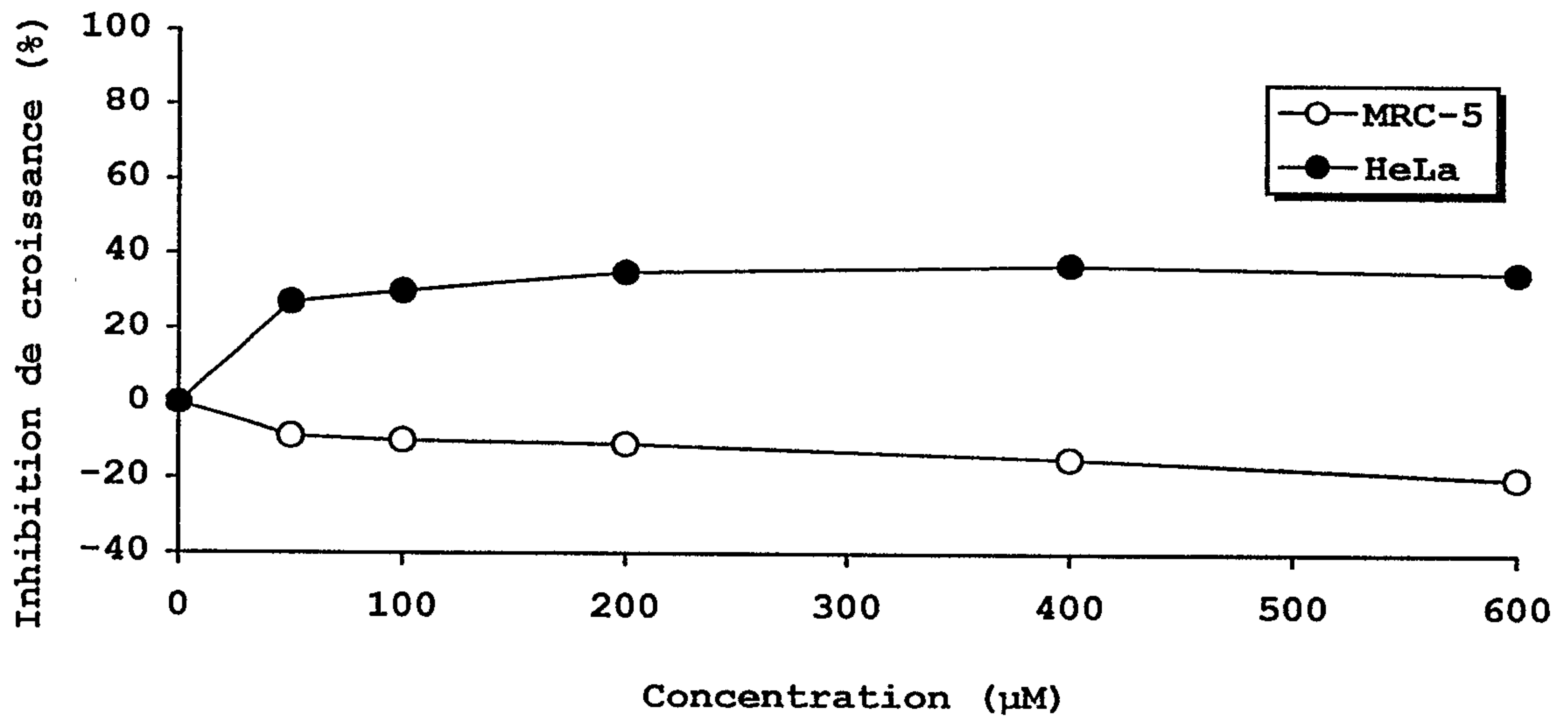
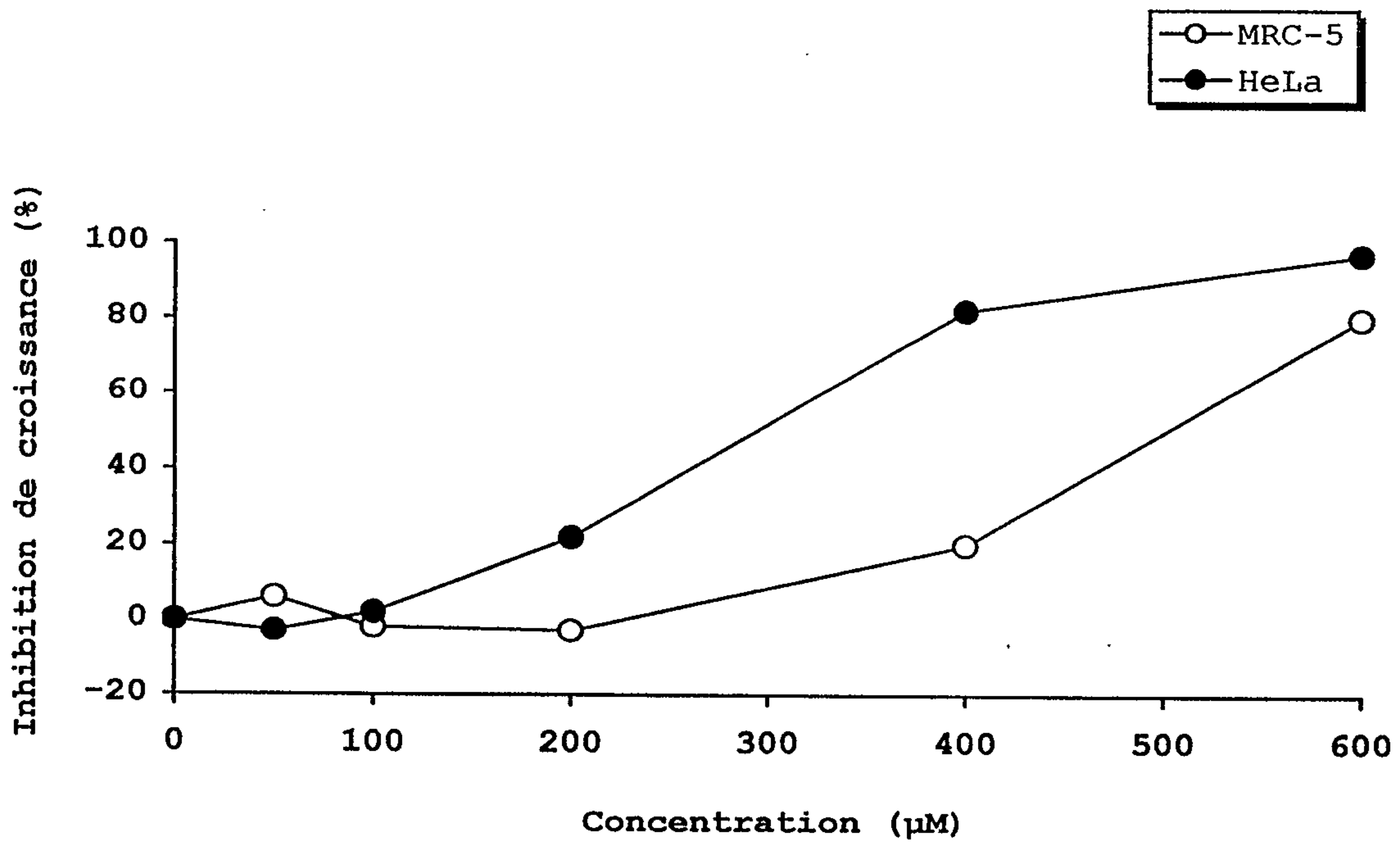
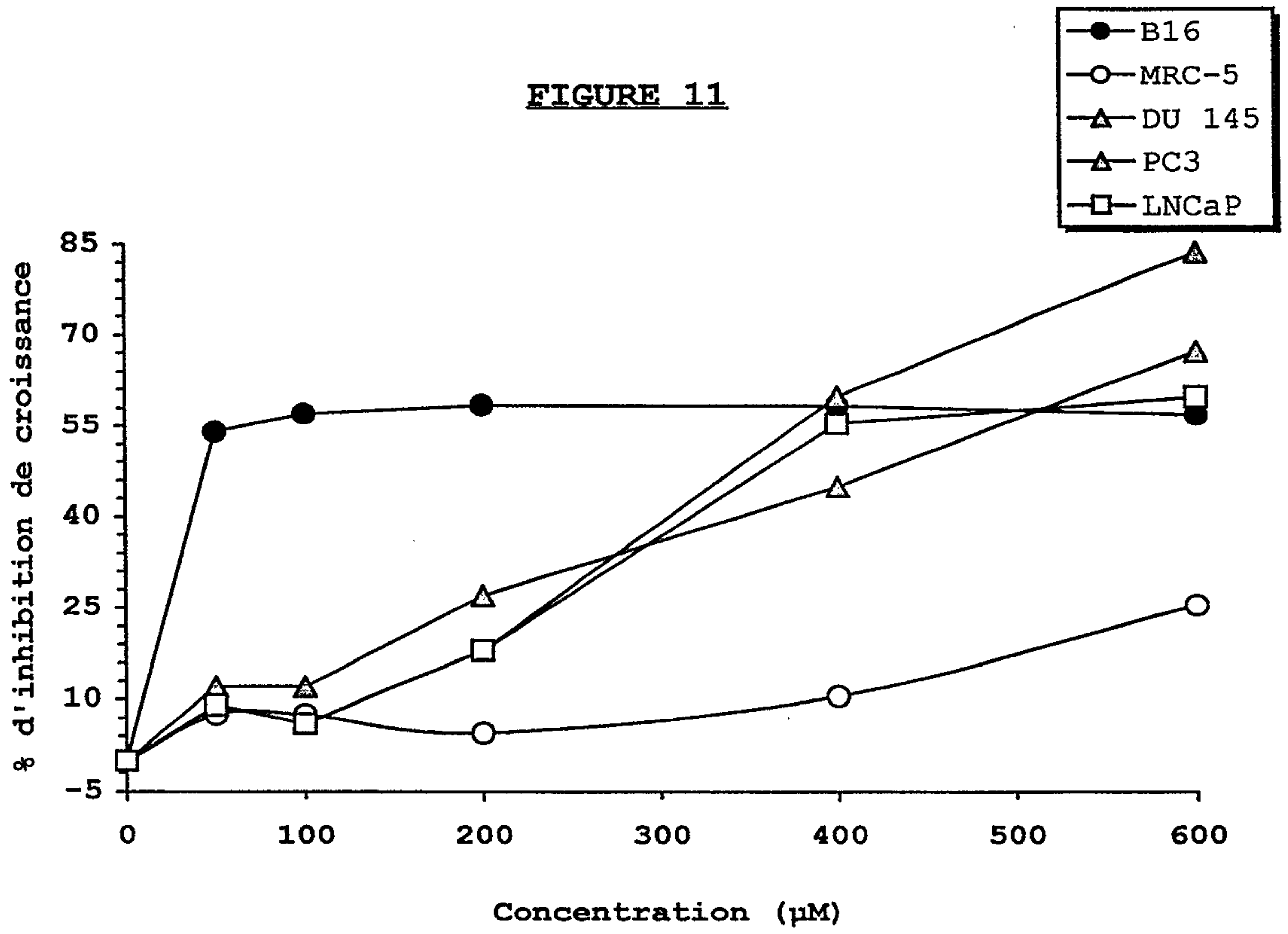


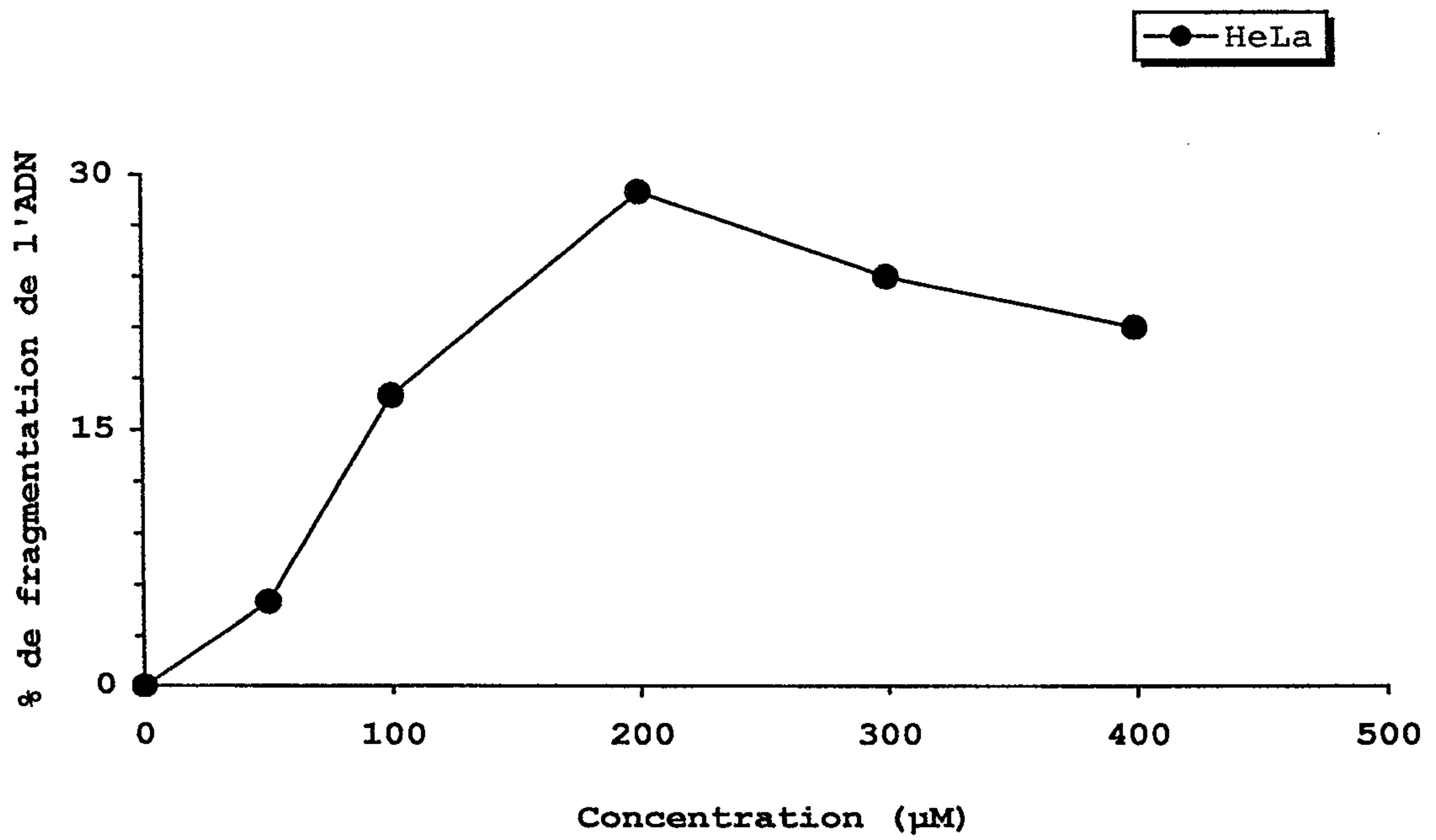
FIGURE 10



**FIGURE 11**

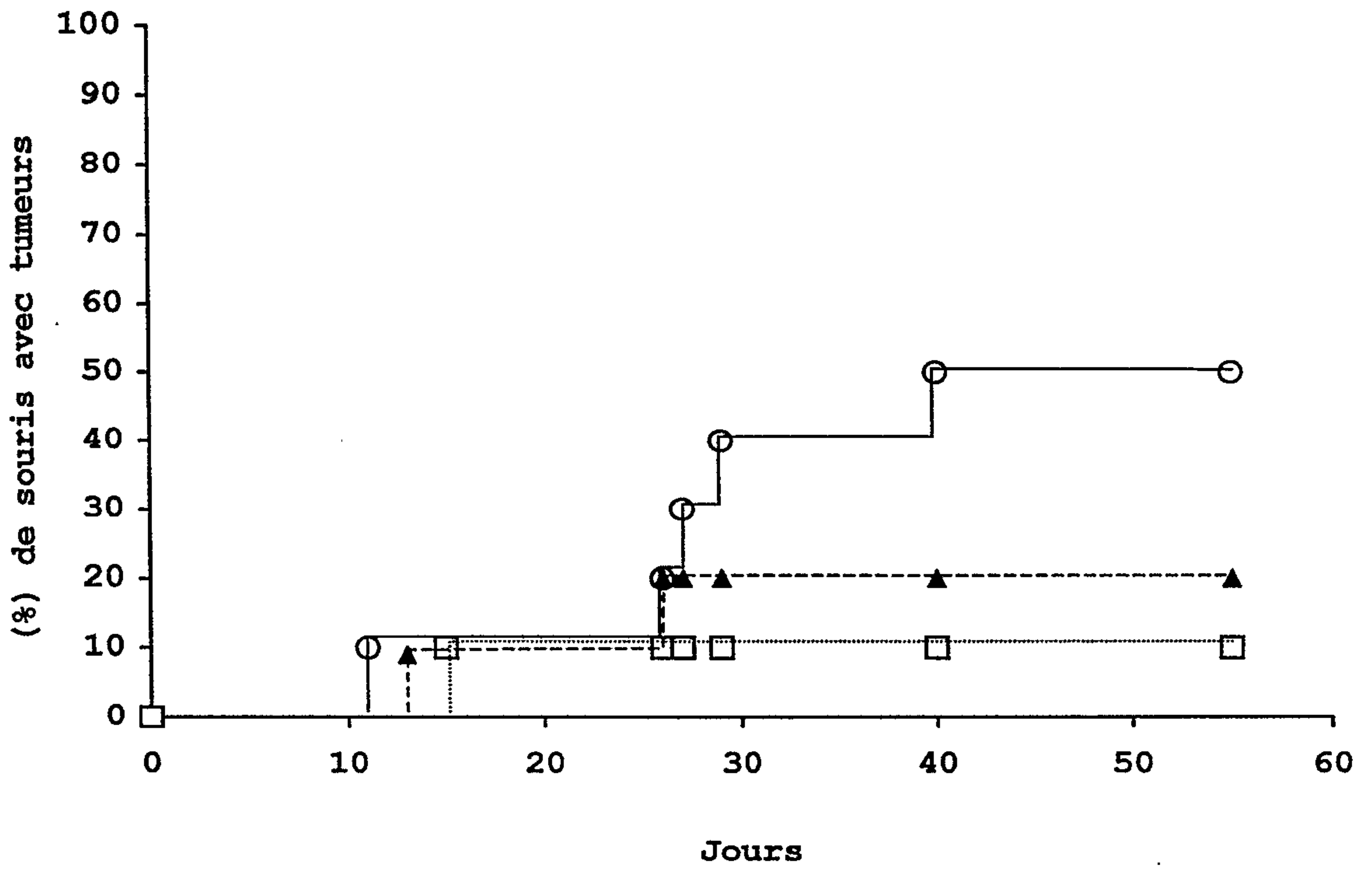


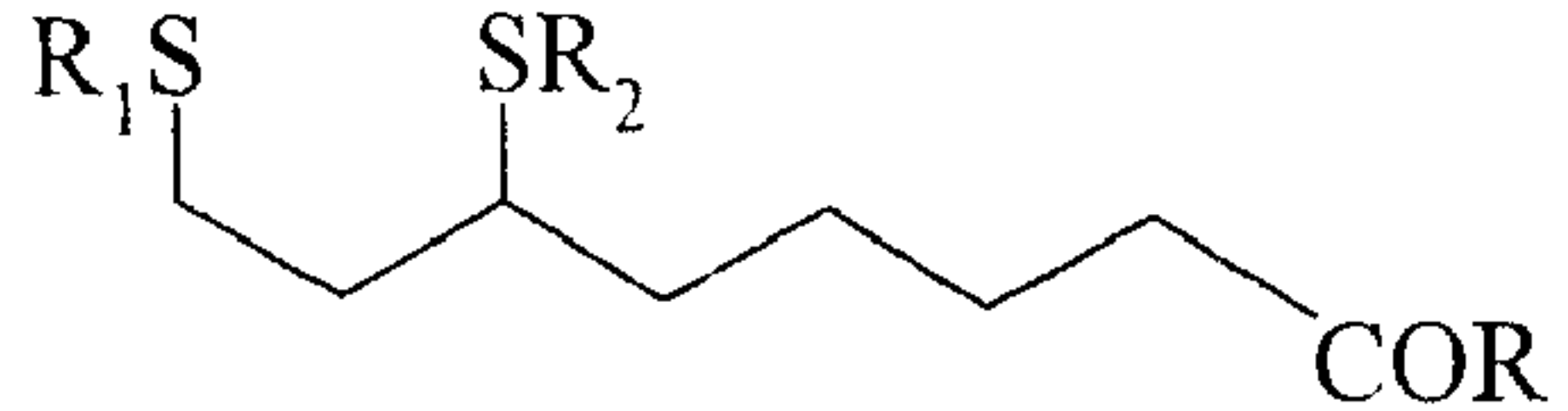
**FIGURE 12**



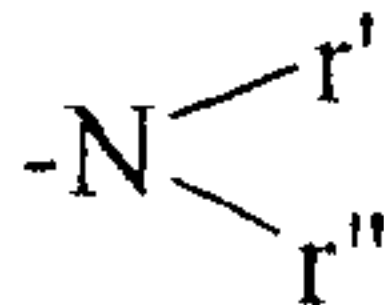


**FIGURE 13**

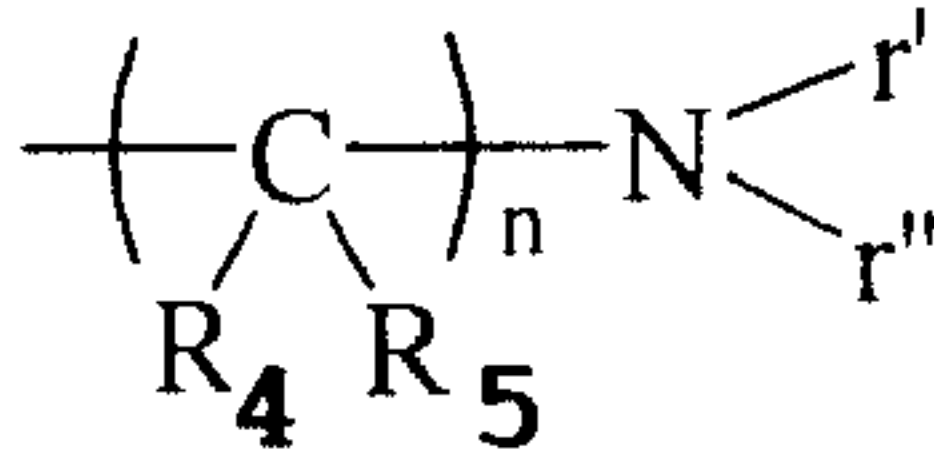




(I)



(II)



(III)