

19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

11) N° de publication : **2 869 540**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

21) N° d'enregistrement national : **04 04646**

51) Int Cl⁷ : A 61 K 31/437, A 61 P 35/00 // (A 61 K 31/437,
31:675) (A 61 K 31/437, 31:661)

12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

22) Date de dépôt : 30.04.04.

30) Priorité :

43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 04.11.05 Bulletin 05/44.

56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71) Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement
public à caractère scientifique et technologique — FR.*

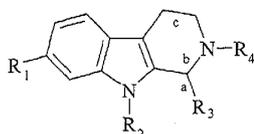
72) Inventeur(s) : YANAGIDA AKINO ep. JOSSANG,
UZAN GEORGES et JOSSANG JEAN KENNJI.

73) Titulaire(s) :

74) Mandataire(s) : GROSSET-FOURNIER CHANTAL
CATHERINE.

54) COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES CONTENANT DES DERIVES DE B-CARBOLINE, ET LEUR
UTILISATION POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS.

57) La présente invention concerne l'utilisation d'au moins
un composé de formule générale (1)



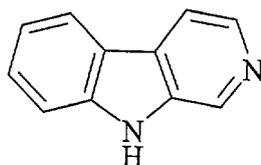
pour la préparation d'un médicament destiné au traite-
ment des cancers.

FR 2 869 540 - A1



COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES CONTENANT DES DERIVES DE β -CARBOLINE, ET LEUR UTILISATION POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS

5 La présente invention concerne en particulier des compositions pharmaceutiques contenant des dérivés de la β -carboline, un alcaloïde, correspondant notamment à ceux extraits de *Peganum harmala*, tels que l'harmine, l'harmane et l'harmalacidine, et leur utilisation dans le cadre du traitement des cancers.



Structure de la β -carboline

15 *Peganum harmala*, herbe d'Afrique du Nord et d'Asie, est utilisée en médecine traditionnelle dans de nombreuses affections. Les alcaloïdes de *Peganum* sont connus pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, hypothermiques et surtout leurs effets hallucinogènes. (Boukef, « Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne », Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris 1986)

20 Une étude précédente a démontré une activité antitumorale d'extraits des graines de *P. harmala* sur les tumeurs du rat et de la souris. Ainsi, l'administration d'un extrait brut alcaloïdique de graines de *P. harmala*, à la dose de 50 mg/kg/jours, par voie orale, a fait disparaître des tumeurs de souris greffées (sous cutané) chez 80 % des souris traitées (Lamchouri *et al.* (1999) *Thérapie* 54 : 753-758).

25 Par ailleurs, certains alcaloïdes purifiés et isolés de *P. harmala* ont montré une cytotoxicité modérée vis-à-vis de cellules tumorales murines, avec la concentration inhibant à 50 % la croissance cellulaire (IC_{50}) de 19,2 à 60 μ g/ml pour la vasicinone, 2,4 à 18,4 μ g/ml pour l'harmine, inactif pour la péganine et 8,0 à 28,9 μ g/ml pour l'harmalacidine (Lamchouri, thèse « Propriétés cytotoxiques et antitumorales de *Peganum harmala* sur des modèles expérimentaux de cancers *in vitro* et *in vivo* » (2000) *Faculté des Sciences Dhar Mahraz*, Fès, Maroc).

30 Enfin, une autre étude a également démontré une action cytotoxique modérée de certains dérivés de la β -carboline, tels l'harmine (IC_{50} de 1,6 à 18,5 μ g/ml) et l'harmane (IC_{50}

de 8 à 20 µg/ml) sur certaines lignées cellulaires tumorales humaines (Ishida *et al.* (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9 : 3319-3324).

On considère en général que pour un composé donné, une IC₅₀ inférieure à 0,01 µg/ml sur des cellules humaines est nécessaire pour pouvoir envisager un passage à des tests *in vivo* chez la souris.

Par ailleurs, il n'est fait aucune mention dans l'art antérieur d'un quelconque effet anti-tumoral *in vivo* de dérivés de β-carboline, correspondant notamment à ceux extraits de *P. harmala*.

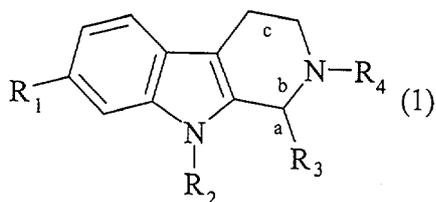
De plus, il convient de noter que la démonstration d'une activité cytotoxique d'un composé donné vis-à-vis de lignées cellulaires tumorales, même humaines, n'implique en rien un effet anti-tumoral *in vivo*. En effet, ce composé peut par exemple s'avérer inactif *in vivo* ou bien présenter une cytotoxicité telle qu'elle est incompatible avec son administration à un être vivant.

De même, des composés actifs sur des tumeurs murines ne sont pas nécessairement actifs sur des cancers humains.

La présente invention a donc pour objet de fournir des compositions pharmaceutiques comprenant des composés dérivés de la β-carboline pour la préparation de médicaments destinés au traitement des cancers.

La présente invention a également pour objet de fournir un autre composé susceptible d'entrer en synergie avec des composés dérivés de la β-carboline pour la préparation de médicaments destinés au traitement des cancers.

Ainsi, la présente invention concerne l'utilisation d'au moins un composé de formule générale (1)



dans laquelle :

- R₁ représente H, OH, ou un groupement alkoxyde de 1 à 12 atomes de carbone,
- R₂ représente H, un groupement alkoxy-carbonyle de 1 à 12 atomes de carbone, notamment le groupement tert-butoxy-carbonyle, ou un groupement alkyle de 1 à 12 atomes de carbone,

- R₃ représente O ou CH₃, sous réserve que, lorsque R₃ représente O, alors a représente une double liaison, b et c représentent une simple liaison et R₄ représente H, et que lorsque R₃ représente CH₃ alors a représente une simple liaison, b et c représentent une double liaison et R₄ ne représente aucun groupement ;

5

pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers, tels que les cancers du colon, les leucémies, les myélomes, les cancers du sein, les neuroblastomes, les hépatocarcinomes, les cancers du poumon, les cancers de la prostate, les cancers de l'ovaire, les cancers du testicule, les cancers gastriques, les cancers pancréatiques, ou les

10

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, au moins un composé de formule générale (1) est associé avec au moins un composé inhibant la réplication de l'ADN.

On désigne par « composé inhibant la réplication de l'ADN » tout composé susceptible d'inhiber une étape de la réplication de l'ADN, que se soit en inhibant l'activité des enzymes impliquées dans la réplication, telles que les ADN polymérase, les topoisomérase, les hélicase, les primase, les ligase, ou en se liant ou en modifiant l'ADN, par exemple en se liant aux deux brins d'ADN (comme les agents alkylant), ou en empêchant la synthèse de la thymidine.

15

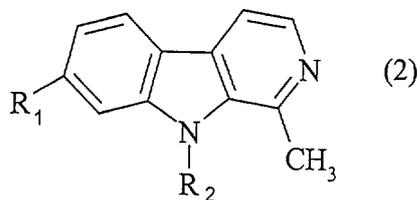
Avantageusement, l'association d'un composé de formule générale (1) à un composé inhibant la réplication de l'ADN présente des effets synergiques dans le traitement des tumeurs.

20

Selon un mode de réalisation plus particulier de l'invention, le composé de formule générale (1) correspond :

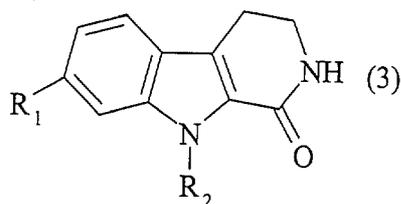
- aux composés de formule (2) suivante,

25



- ou aux composés de formule (3) suivante,

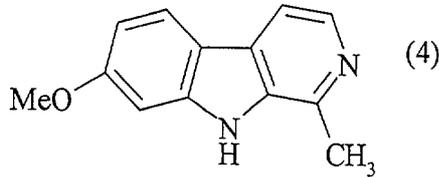
30



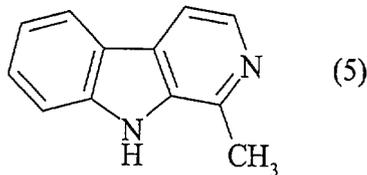
dans lesquelles R₁ et R₂ sont tels que définis ci-dessus.

Selon un mode de réalisation encore plus particulier de l'invention, le composé de formule générale (1) correspond à :

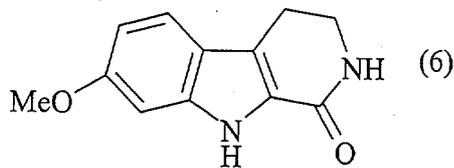
- l'harmine (4) :



10 - l'harmane (5)



15 - ou à l'harmalacidine (6)



20 Avantagement, les Inventeurs ont démontré que l'harmine ainsi que l'harmalacidine avaient une action anti-tumorale *in vivo*, notamment sur des tumeurs humaines. Cette action est renforcée lorsque l'harmine et l'harmalacidine sont administrées en association avec un composé inhibant la réplication de l'ADN.

25 Par ailleurs, il a été montré que l'harmane, dont la structure chimique est proche de celle de l'harmine, possède une cible cellulaire commune avec l'harmine (Sobhani *et al.* (2002) *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 5 : 19-23). Il peut donc être utilisé au même titre que l'harmine dans le cadre de l'invention.

30 Selon un autre mode de réalisation particulier de l'invention, le composé inhibant la réplication de l'ADN est choisi parmi le groupe comprenant :

- un agent alkylant, tel que le cyclophosphamide, le carboplatine, le cisplatine, la mitomycine C ou le thiotépa ;
- un antimétabolite, tel que la 5-fluorouracile, l'ara C ou le méthotrexate ;

- ou un agent inhibant la topoisomérase II, tel que la doxorubicine, la mitoxantrone ou l'amsacrine.

Ces composés sont bien connus de l'homme de l'art.

En particulier, un agent alkylant agit en empêchant la séparation des deux brins d'ADN d'un même fragment en réalisant un pontage covalent solide.

Un antimétabolite empêche, soit en prenant la place des bases (5-fluorouracile ou ara-C), soit en inhibant la synthèse enzymatique de la thymidine (5-fluorouracile, méthotrexate).

La topoisomérase II a pour activité de couper et de ressouder les deux brins d'ADN d'un même fragment dans le cadre de la relaxation des ADN surenroulés.

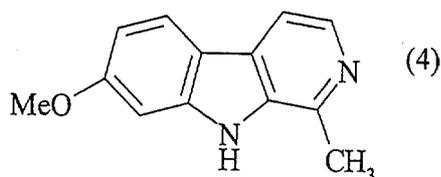
Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, celle-ci concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus d'harmine ou d'harmalacidine, et de cyclophosphamide.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, celle-ci concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus d'harmane ou d'harmalacidine, et de 5-fluorouracile.

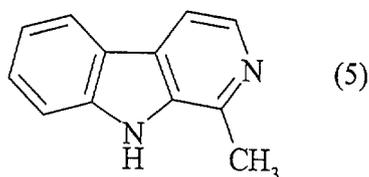
La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant à titre de substance active au moins un composé de formule générale (1) en association avec au moins un composé inhibant la réplication de l'ADN et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la composition pharmaceutique est telle que le composé de formule générale (1) correspond à :

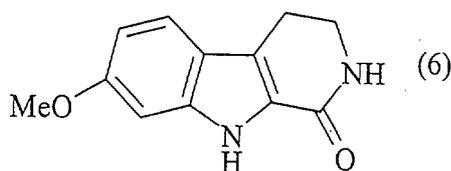
- l'harmine (4) :



- l'harmane (5)



- ou à l'harmalacidine (6)



Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, la composition pharmaceutique est telle que le composé inhibant la réplication de l'ADN est choisi parmi le groupe comprenant :

- un agent alkylant, tel que le cyclophosphamide, le carboplatine, le cisplatine, la mitomycine C ou le thiotépa ;
- un antimétabolite, tel que la 5-fluorouracile, l'ara C ou le méthotrexate ;
- ou un agent inhibant la topoisomérase II, tel que la doxorubicine, la mitoxantrone ou l'amsacrine.

Selon un autre mode de réalisation préféré, la composition pharmaceutique selon l'invention convient pour une administration par voie orale ou intraveineuse.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, la composition pharmaceutique selon l'invention comprend à titre de substance active de l'harmine ou de l'harmalacidine, en association avec du cyclophosphamide et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Selon un mode de réalisation plus particulièrement préféré, la composition pharmaceutique susmentionnée convient pour l'administration par voie orale : d'environ 1 à environ 10 mg/kg/j d'harmine, ou d'environ 1 à environ 5 mg/kg/j d'harmalacidine, et d'environ 1 à environ 5 mg/kg/j de cyclophosphamide.

Selon un autre mode de réalisation plus particulièrement préféré, la composition pharmaceutique susmentionnée convient pour l'administration par voie intraveineuse : d'environ 1 à environ 3 mg/kg/j d'harmine, ou d'environ 1 à environ 3 mg/kg/j d'harmalacidine, et d'environ 1 à environ 5 mg/kg/j de cyclophosphamide.

Selon un autre mode de réalisation particulièrement préféré, la composition pharmaceutique selon l'invention comprend à titre de substance active de l'harmine ou de l'harmalacidine, en association avec de la 5-fluorouracile et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Selon un mode de réalisation plus particulièrement préféré, la composition pharmaceutique susmentionnée convient pour l'administration par voie orale :

d'environ 1 à environ 10 mg/kg/j d'harmine, ou d'environ 1 à environ 5 mg/kg/j d'harmalacidine, et d'environ 1 à environ 10 mg/kg/j de 5-fluorouracile.

Selon un autre mode de réalisation plus particulièrement préféré, la composition pharmaceutique susmentionnée convient pour l'administration par voie intraveineuse :

d'environ 1 à environ 3 mg/kg/j d'harmine, ou d'environ 1 à environ 3 mg/kg/j d'harmalacidine, et d'environ 1 à environ 5 mg/kg/j de 5-fluorouracile.

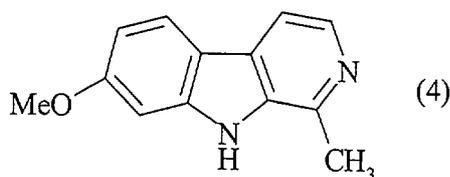
La présente invention concerne également des produits contenant

- un composé de formule générale (1), et
- au moins un composé inhibant la réplication de l'ADN,

comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps dans le cadre du traitement des cancers, tels que les cancers du colon, les leucémies, les myélomes, les cancers du sein, les neuroblastomes, les hépatocarcinomes, les cancers du poumon, les cancers de la prostate, les cancers de l'ovaire, les cancers du testicule, les cancers gastriques, les cancers pancréatiques, ou les rétinoblastomes.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les produits de combinaison sont tels que le composé de formule générale (1) correspond à :

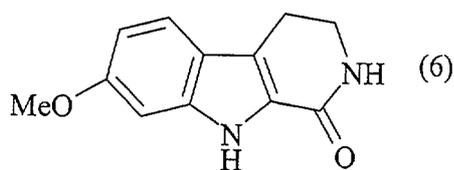
- 10 - l'harmine (4) :



- 15 - l'harmane (5)



- 20 - ou à l'harmalacidine (6)



- 25 Selon un autre mode de réalisation particulier de l'invention, les produits de combinaison sont tels que le composé inhibant la réplication de l'ADN est choisi parmi le groupe comprenant :

- un agent alkylant, tel que le cyclophosphamide, le carboplatine, le cisplatine, la mitomycine C ou le thiotépa ;
- 30 - un antimétabolite, tel que la 5-fluorouracile, l'ara C ou le méthotrexate ;
- ou un agent inhibant la topoisomérase II, tel que la doxorubicine, la mitoxantrone ou l'amsacrine.

Selon un mode de réalisation préféré, l'invention concerne des produits tels que définis ci-dessus, contenant

- de l'harmine ou de l'harmalacidine, et
- de la 5-fluorouracile,

comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps dans le cadre du traitement des cancers, tels que les cancers du colon, les cancers du sein, les hépatocarcinomes, les cancers du poumon, les cancers de la prostate, les cancers de l'ovaire, les cancers gastriques, ou les cancers pancréatiques.

Selon un autre mode de réalisation préféré, l'invention concerne des produits tels que définis ci-dessus, contenant :

- de l'harmine ou de l'harmalacidine, et
- du cyclophosphamide,

comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps dans le cadre du traitement des cancers, tels que les cancers du colon, les leucémies, les myélomes, les cancers du sein, les neuroblastomes, les hépatocarcinomes, les cancers du poumon, les cancers de l'ovaire, les cancers du testicule, ou les rétinoblastomes.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1

La Figure 1 représente l'évolution de la taille de tumeurs HT29 (en cm^3 , axe des ordonnées) greffée sur des souris NOD-SCID non-traitées (losanges), ou traitées par de l'harmine à 100 mg/kg/jour (croix), 125 mg/kg/jour (carrés), 150 mg/kg/jour (triangles) ou 175 mg/kg/jour (cercles) en fonction du temps (en jours, axe des abscisses).

Figure 2A et Figure 2B

La Figure 2A représente l'évolution de la taille de tumeurs HT29 (en cm^3 , axe des ordonnées) greffée sur des souris NOD-SCID non-traitées (croix), ou traitées par du cyclophosphamide à 50 mg/kg/jour (triangles), 100 mg/kg/jour (carrés), ou par un mélange harmine 100 mg/kg/jour + cyclophosphamide 100 mg/kg/jour (cercles) ou harmine 150 mg/kg/jour + cyclophosphamide 50 mg/kg/jour (losanges) en fonction du temps (en jours, axe des abscisses).

La Figure 2B représente l'évolution de la taille de tumeurs HT29 (en cm^3 , axe des ordonnées) greffée sur des souris NOD-SCID non-traitées (losanges), ou traitées par de l'harmine à 150 mg/kg/jour (triangles), du cyclophosphamide à 50 mg/kg/jour (croix), ou par un mélange

harmine à 150 mg/kg/jour + cyclophosphamide à 50 mg/kg/jour (cercles) en fonction du temps (en jours, axe des abscisses).

Figure 3A et Figure 3B

- 5 La Figure 3A représente l'évolution de la taille de tumeurs HT29 (en cm³, axe des ordonnées) greffée sur des souris NOD-SCID non-traitées (cercles), ou traitées par de la 5-fluorouracile à 3 mg/kg/jour (triangles), 6 mg/kg/jour (carrés), 9 mg/kg/jour (croix), 12 mg/kg/jour (losanges) ou 24 mg/kg/jour (tirets) en fonction du temps (en jours, axe des abscisses).
- 10 La Figure 3B représente l'évolution de la taille de tumeurs HT29 (en cm³, axe des ordonnées) greffée sur des souris NOD-SCID non-traitées (triangles), ou traitées par de l'harmine à 150 mg/kg/jour (croix), de la 5-fluorouracile à 12 mg/kg/jour (carrés), ou par un mélange harmine à 150 mg/kg/jour + 5-fluorouracile à 12 mg/kg/jour (cercles) en fonction du temps (en jours, axe des abscisses).

15

Figure 4

- La Figure 4 représente l'évolution de la taille de tumeurs HT29 (en cm³, axe des ordonnées) greffée sur des souris NOD-SCID non-traitées (carrés), ou traitées par de l'harmalacine à 25 mg/kg/jour (triangles) ou à 50 mg/kg/jour (croix), par du cyclophosphamide à 50 mg/kg/jour (losanges), ou par un mélange harmalacine 25 mg/kg/j + cyclophosphamide 50 mg/kg/j (tirets) ou harmalacine 50 mg/kg/j + cyclophosphamide 50 mg/kg/jour (cercles), en fonction du temps (en jours, axe des abscisses).

20

EXEMPLES

25

EXEMPLE 1

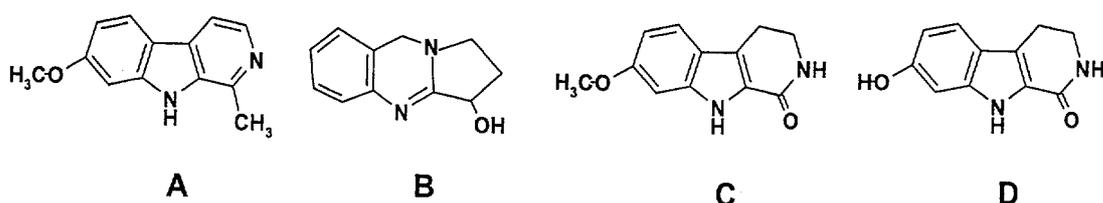
Extractions d'alcaloïdes de *Peganum harmala*

- 30 De la poudre de graines de *P. harmala* (*Xygophyllaceae*) broyées (1 kg) a été extraite au méthanol. Après évaporation du solvant, le résidu a été solubilisé dans de l'acide chlorhydrique à 2 %. La solution aqueuse acide a ensuite été lavée par du dichlorométhane, puis alcalinisée par du bicarbonate de sodium et extraite au dichlorométhane. La phase organique laisse alors un extrait brut d'un mélange des alcaloïdes (24 g) par évaporation du

solvant. L'extrait est soumis à une chromatographie sur colonne de silice en éluant par un mélange dichlorométhane/méthanol (9/1) et séparé en 23 fractions.

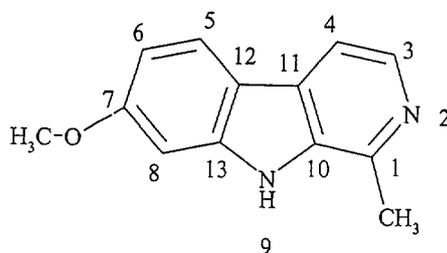
La cristallisation des fractions 3 à 5 dans un mélange dichlorométhane/méthanol fournit l'harmine (A) pure (3 g) (M: 212,3 ; F. 261°C. (261°C ; Goebel, F. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1841, **38**, 363 et Hochstein, A. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1957, **49**, 5735)). La vasicine (B) est extraite des fractions 10 à 12, l'harmalacidine (C) (12,6 g, M:216, F. 197 °C (197-198 °C ; Hashimoto, Y., Kawanishi, K. *Phytochemistry* 1976, **15**, 1559-1560 ; Siddiqui, S. *Heterocycles* 1988, **27**, 1401)) des fractions 17 à 21 et la déméthylharmalacidine (D) des fractions 22 à 23.

10



L'harmine a été précisément caractérisée :

- le spectre de masse de l'harmine montre l'ion moléculaire $[M]^+$ à m/z 212 Dalton, correspondant à la formule brute $C_{13}H_{12}N_2O$ (M: 212.3).
- l'analyse des spectres de RMN 1H et ^{13}C et des spectres en 2 dimensions COSY, HSQC et HMBC confirme la structure de l'harmine ci-dessous.



Harmin (A)

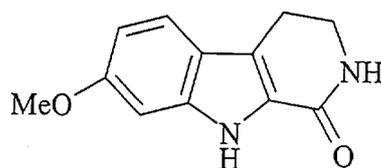
- le chlorhydrate de l'harmine dihydraté a également été analysé ; F. 262°C (268-270 °C ; The Merck Index, Xth, M. Windholz, ed., Merck 1 co., Inc., Rahway, N.J. USA, **1983**, p.666), M. 284,8 ;
- la toxicité a été déterminée chez la souris BALB/c ; dose létale 50 (DL₅₀) 300 mg/kg *per os*. (243 mg/kg, sc, souris, 38 mg/kg, iv, The Merck Index, Xth, M. Windholz, ed., Merck 1 co., Inc., Rahway, N.J. USA, **1983**, p.666).

25

L'harmalacidine a également été caractérisée :

- le spectre de masse de l'harmalacidine montre l'ion moléculaire $[M]^+$ à m/z 216 Dalton, correspondant à la formule brute $C_{12}H_{12}N_2O_2$ (M : 216,2).

- l'analyse des spectres de RMN 1H et ^{13}C et des spectres en 2 dimensions COSY, HSQC et HMBC confirme la structure de l'harmalacidine ci-dessous (Hashimoto, Y., Kawanishi, K. *Phytochemistry* 1976, **15**, 1559-1560 ; Siddiqui, S. *Heterocycles* 1988, **27**, 1401).



Harmalacidine (C)

- la masse moléculaire du chlorhydrate dihydraté d'harmalacidine : M 288.

EXEMPLE 2

15 Effets cytotoxiques des alcaloïdes de *P. harmala in vitro*

Les effets cytotoxiques des différents extraits alcaloïdiques de *P. harmala* ont été étudiés sur plusieurs lignées cellulaires :

- des lignées de cellules leucémiques humaines : K562 et Jurkat (leucémie), U937 (myelome),

- des lignées de cellules de tumeurs solides humaines : KB (épithéliome du nasopharynx) et HT29 (colon),

- des lignées de cellules endothéliales immortalisées de moelle osseuse humaine: HBMEC.

Les cellules sont cultivées en étuve sous atmosphère 5 % CO_2 et à $37^\circ C$, en milieu RPMI1640 pour K562, Jurkat, U937 et HT29 et DMEM pour KB, supplémenté de sérum de veau foetal 10 %, de pénicilline-streptomycine 0,01 % et de L-glutamine 2 mM et en milieu EGM2 pour les cellules HBMEC.

Le test de cytotoxicité est réalisé dans une microplaque de 96 puits en présence de l'extrait à tester à des concentrations variées de 40, 20, 10, 5, 1, 0,5 $\mu g/ml$ et en l'absence de produit, après une incubation de 4 jours à $37^\circ C$. Au 3^{ème} jour, on ajoute une solution de rouge neutre qui est absorbé par des cellules vivantes. La densité optique (DO) de colorant libéré par cellules lysées est mesurée à 540 nm par un lecteur de plaques Elisa. La toxicité (% inhibition de croissance) est inversement proportionnelle à la densité optique.

Le pourcentage d'inhibition est défini comme étant la différence entre la DO sans produit et la DO en présence de produit rapportée à la DO sans produit

La concentration inhibant à 50 % la croissance cellulaire est obtenue à partir de la courbe représentative du pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration.

L'ensemble des résultats obtenus est rassemblé dans le **Tableau 1**, suivant.

Tableau 1 : cytotoxicité *in vitro* des alcaloïdes de *Peganum harmala*

Lignée cellulaire	IC ₅₀ en µg/ml : µM					
	KB	K562	Jurkat	U937	HT29	HBMEC
Extrait brut	5,3 : -	11,8 : -	6,3 : -	10,2 : -	2,7 : -	8,0 : -
Harmine(A)	4,6 : 21,7	3,5 : 16,5	3,2 : 15,1	3,5 : 16,5	2,9 : 13,7	3,5 : 16,5
Harmine.HCl .2H ₂ O	8,5 : 29,8	9,7 : 34,1	5,0 : 17,6	7,2 : 25,3	3,1 : 10,9	3,2 : 11,2
Harmalacidine (C)	12 : 55,5	12,5 : 57,8	15,5 : 71,7	29 : 134	N.D.	28 : 130
Déméthyl-harmalacidine (D)	10 : 49,5	20 : 99	8,5 : 42	N.D.	N.D.	17 : 84,1
Péganine (B)	>50 : 266	35 : 186	75 : 399	N.D.	N.D.	N.D.
Camptothécine	0,035 : 0,1	0,014 : 0,04	0,003 : 0,09	0,023 : 0,07	N.D.	0,025 : 0,07

- 10 Pour résumer, l'IC₅₀ vis-à-vis des cellules cancéreuses et endothéliales testées est la suivante :
- 5 à 12 µg/ml pour l'extrait brut d'alcaloïdes,
 - 2,9 à 4,6 µg/ml (14 - 22 µM) pour l'harmine,
 - 3 à 10 µg/ml (10,5 - 35 µM) pour le chlorhydrate d'harmine.

15 EXEMPLE 3

Acitivité antitumorale *in vivo* de l'harmine

Matériels et méthodes

20 Le modèle animal choisi est celui de souris sévèrement immunodéficientes cumulées (NOD-SCID) ayant reçu une xélogreffe de cellules tumorales humaines.

Des souris NOD-SCID, mâles et femelles, de plus de 3 mois, ont été élevées dans un environnement de stricte stérilité, en isolateur ventilé par de l'air filtré et stérilisé, à 22°C et 40 % d'humidité, sous un cycle jour-12h/nuit-12h. Les cages, biberons et l'eau ont été stérilisés en autoclave à 120 °C pendant 30 minutes et les aliments ainsi que les litières sont traitées par

irradiation γ . Toutes les manipulations ont été réalisées aseptiquement sous une hotte à flux laminaire.

Les souris ont été soumises à une anesthésie générale par injection i.p. de 0,3 à 0,4 ml de hypnomidate à 2 mg/ml. 1×10^7 cellules tumorales humaines coliques HT29 en suspension dans 200 μ l de PBS ont ensuite été injectées en sous-cutanée, dans le dos des souris. Au 10^{ème} jour de greffe la longueur de la tumeur atteint environ 1 cm.

201 mg de chlorhydrate d'harimine ont été dissous dans 8 ml d'eau et la solution obtenue a été stérilisée par filtration sur une membrane de porosité 0,22 μ m.

Au dixième jour suivant la greffe, l'harimine a été administrée par voie orale (*per os*) à l'aide d'une sonde gastrique à raison de 0 (témoin), 100, 125, 150, 175 et 200 mg/kg/jour pendant 60 jours respectivement à 6 groupes de 5 souris.

Le volume approximatif de la tumeur a été calibré et calculé régulièrement selon la formule :

$$\text{Volume (cm}^3\text{)} = \text{longueur (cm)} \times \text{largeur (cm)} \times \text{hauteur (cm)} \times 0,5$$

Résultats

Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 2** et dans la **Figure 1**.

Tableau 2 : traitement par l'harimine de souris xenogreffées par des cellules tumorales humaines HT29

Groupe	Dose d'harimine (mg/kg/jour)	Volume moyen des tumeurs des souris traitées par rapport au volume moyen des tumeurs des souris non traitées (T/C) (%)			
		Jour 30	Jour 40	Jour 50	Jour 60
1	0	100	100	100	100
2	100	74	77	84	105
3	125	55	58	54	67
4	150	41	46	42	51
5	175	40	10	30	40
6	200	-	-	-	-

L'action inhibitrice de l'harimine sur la croissance des tumeurs s'est manifestée de manière dose dépendante entre 125 à 175 mg. La dose de 100 mg/kg/jour a un très faible effet. La dose de 125 mg/kg/jour commence à montrer un effet significatif : le volume de la tumeur atteint 55 à 67 % du volume de la tumeur du groupe non traité. A la dose de 150 mg/kg/jour, le volume de la tumeur représente seulement 42 % de celui du groupe témoin

jusqu'au jour 50, mais atteint 51 % au 60^{ème} jour. La dose de 175 mg/kg/jour s'est montrée efficace avec T/C = 40 %, pendant toute la durée de traitement. La dose de 200 mg/kg/jour n'a pas été tolérée, les souris sont mortes après quelques jours de traitement.

5 EXEMPLE 4

Activité antitumorale *in vivo* du cyclophosphamide, seul ou en association avec l'harmine

10 L'activité antitumorale du cyclophosphamide, seul ou en association avec l'harmine, a été mesurée selon la méthodologie de l'Exemple 3.

15 150 mg de cyclophosphamide (Sigma) ont été dissous dans 8 ml d'eau et la solution obtenue a été stérilisée par filtration sur une membrane de porosité 0,22 µm. Les souris ont reçu soit 50, 100, ou 150 mg/kg/jour de cyclophosphamide seul, soit un mélange harmine 150 mg/kg/jour + cyclophosphamide 50 mg/kg/jour ou harmine 100 mg/kg/jour + cyclophosphamide 100 mg/kg/jour.

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 3 et dans les Figures 2A et 2B.

Tableau 3 : Traitement par le cyclophosphamide, seul ou en association avec l'harmine, de souris xenogreffées par des cellules tumorales humaines HT29

20

Groupe	Dose d'harmine (mg/kg/jour)	Dose de cyclophosphamide (mg/kg/jour)	Volume moyen des tumeurs des souris traitées par rapport au volume moyen des tumeurs des souris non traitées (T/C) (%)				
			Jour 15	Jour 30	Jour 40	Jour 50	Jour 60
1	0	0	100	100	100	100	100
2	0	50	63	42	37	36	32
3	0	100	47	25	18	14	15
4	0	150	4	-	-	-	-
5	150	50	20	10	7	8	9
6	100	100	36	16	11	10	9

25 Lorsque le cyclophosphamide est administré seul (Tableau 3, Figures 2A, 2B), la dose de 50 mg/kg/jour conduit à un rapport T/C de 40 à 30 %. La dose de 100 mg/kg/jour a inhibé très fortement la croissance tumorale: T/C de 25 à 15 %. A la dose de 150 mg/kg/jour, le volume de tumeur n'a pratiquement pas augmenté, mais les souris n'ont pas supporté cette dose et sont toutes mortes aux environs du 15^{ème} jour de traitement.

Lors de l'administration simultanée de l'harmine 150 mg avec le cyclophosphamide 50 mg/kg/jour (**Tableau 3, Figure 2B**), le volume tumoral est demeuré stationnaire avec un rapport T/C à moins de 10 % jusqu'au 60^{ème} jour du traitement. L'association harmine - cyclophosphamide présente donc un effet synergique sur l'inhibition de la croissance tumorale, par rapport à l'utilisation d'harmine seule et de cyclophosphamide seul aux concentrations utilisées dans le mélange. Ceci permet d'envisager l'utilisation de cette association pour le traitement des cancers.

Toutefois, il convient de noter que l'association de l'harmine 150 mg/kg/jour avec 50 mg/kg/jour de cyclophosphamide a été mal tolérée à partir de 30^{ème} jour. Le symptôme d'intoxication cumulative est mis en évidence par le jaunissement du pelage ou l'apparition d'oedème par un trouble hépato-rénal qui disparaissent par arrêt du cyclophosphamide. Il a donc fallu arrêter l'administration journalière de cyclophosphamide et passer à un cycle 7 jours de repos-3 jours de traitement. L'harmine par contre a été donnée sans interruption. Les souris ayant subi ce traitement combiné et ménagé ne présentent pas de signe d'intoxication et 75 % des souris ainsi traitées ont survécu plus de 100 jours avec un volume tumoral de moins de 1 cm³.

L'association harmine 100 mg/kg/jour + cyclophosphamide 100 mg/kg/jour donne une inhibition de la croissance tumorale semblable, avec un rapport T/C proche de 10 % (**Tableau 3, Figure 2A**).

EXEMPLE 5

Activité antitumorale *in vivo* de la 5-fluorouracile, seule ou en association avec l'harmine

L'activité antitumorale de la 5-fluorouracile, seule ou en association avec l'harmine, a été mesurée selon la méthodologie de l'**Exemple 3**.

50 mg de 5-fluorouracile (*Sigma*) ont été dissous dans 8 ml d'eau et la solution obtenue a été stérilisée par filtration sur une membrane de porosité 0,22 µm. Les souris ont reçu soit 3, 6, 9, 12, ou 24 mg/kg/jour de 5-fluorouracile seule, soit un mélange harmine 150 mg/kg/jour + 5-fluorouracile 12 mg/kg/jour.

Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 4** et dans les **Figures 3A et 3B**.

Tableau 4 : Traitement par la 5-fluorouracile, seule ou en association avec l'harmine, de souris xenogreffées par des cellules tumorales humaines HT29

Groupe	Dose d'harmine (mg/kg/jour)	Dose de 5-fluorouracile (mg/kg/jour)	Volume moyen des tumeurs des souris traitées par rapport au volume moyen des tumeurs des souris non traitées (T/C) (%)				
			Jour 15	Jour 30	Jour 40	Jour 50	Jour 60
1	0	0	100	100	100	100	100
2	0	3	43	56	66	61	86
3	0	6	37	53	60	64	70
4	0	9	41	41	59	52	59
5	0	12	73	66	54	47	59
6	0	24	17	54	54	-	-
7	150	12	25	26	22	21	23

Lorsque la 5-fluorouracile est délivrée seule *per os*, à des doses comprises entre 3 et 12 mg/kg/jour, pendant 60 jours (**Tableau 4** et **Figure 3A**), les tumeurs (HT29) continuent de croître. Avec la dose de 12 mg/kg/j, la taille des tumeurs croît lentement jusqu'à J50 (T/C=52%), puis les tumeurs se remettent à croître plus rapidement, pour atteindre à J60 une taille semblable à celle observée avec la dose de 9 mg/kg/j. La dose de 24 mg/kg/j, administrée avec une alternance de 6 jours de traitement et de 6 jours de repos, est efficace jusqu'au 20ème jour du traitement (T/C=17 %) mais, par la suite, l'efficacité décroît : au 30^{ème} jour (T/C=54 %). Cette dose devient létale entre les 35 et le 45^{ème} jour d'administration.

L'harmine 150 mg/kg/j a été administrée simultanément en combinaison avec des doses croissantes de 5-fluorouracile : 3, 6, 9 et 12 mg/kg/j respectivement.

Seule l'association harmine 150 mg/kg/jour + 5-fluorouracile 12 mg/kg/jour est portée dans le **Tableau 4**. Cette association, administrée en cycle de 6 jours de traitement et 6 jours de repos, possède des effets synergiques sur l'inhibition de la croissance tumorale (**Tableau 4, Figure 3B**) et a pu maintenir le volume tumoral inférieur à 1,3 cm³ même au 60^{ème} jour de traitement, avec 23 % de T/C.

EXEMPLE 6

Activité antitumorale *in vivo* de la vinblastine, seule ou en association avec l'harmine

L'activité antitumorale de la vinblastine est dose-dépendante entre 0,125 et 0,5 mg/kg/j jusqu'au 40ème jour, par administration sous cutanée. Une dose supérieure à 1 mg/kg/j n'a pas été supportée par les souris NOD-SCID au-delà du 6^{ème} jour.

Aucun effet synergique n'a été observé pour les combinaisons harmine 150 mg/kg/j et vinblastine 0,125, 0,25 et 0,5 mg/kg/j respectivement.

EXEMPLE 7**Activité antitumorale *in vivo* de l'harmalacidine, seule ou en association avec le cyclophosphamide**

5 L'activité antitumorale de l'harmalacidine, seule ou en association avec le cyclophosphamide, a été mesurée selon la méthodologie de l'**Exemple 3**.

10 100 mg de chlorhydrate dihydraté d'harmalacidine ont été dissous dans 8 ml d'eau et la solution obtenue a été stérilisée par filtration sur une membrane de porosité 0,22 µm. Les souris ont reçu soit 25, 50, ou 100 mg/kg/jour de l'harmalacidine seule, soit un mélange harmalacidine à 25 ou 50 mg/kg/jour + cyclophosphamide 50 mg/kg/jour.

Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 5** et dans la **Figure 4**.

Tableau 5: Traitement par l'harmalacidine, seule ou en association avec le cyclophosphamide, de souris xenogreffées par des cellules tumorales humaines HT29

Groupe	Dose d'harmalacidine (mg/kg/jour)	Dose de cyclophosphamide (mg/kg/jour)	Volume moyen des tumeurs des souris traitées par rapport au volume moyen des tumeurs des souris non traitées (T/C) (%)				
			Jour 15	Jour 30	Jour 40	Jour 50	Jour 60
1	0	0	100	100	100	100	100
2	25	0	81	72	70	65	77
3	50	0	42	56	48	45	57
4	100	0	mort	-	-	-	-
5	25	50	45	29	26	23	25
6	50	50	60	32	24	20	20

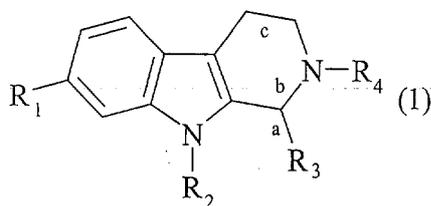
15 Lorsque l'harmalacidine est délivrée seule *per os*, à des doses de 25 et 50 mg/kg/jour, pendant 60 jours (**Tableau 5** et **Figure 4**), les tumeurs (HT29) croissent lentement jusqu'à J50 (T/C=65 et 45%), puis se remettent à croître plus rapidement, pour atteindre à J60 T/C=77 et 57%. La dose de 100 mg/kg/j n'a pas été supportée plus de 10 jours.

20 L'harmalacidine 25 ou 50 mg/kg/j a été administrée simultanément en combinaison avec la cyclophosphamide 50 mg/kg/j.

25 Cette association, administrée en cycle de 5 jours de traitement et 2 jours de repos, manifeste des effets synergiques sur l'inhibition de la croissance tumorale (**Tableau 5**, **Figure 4**) et a pu maintenir le volume tumoral inférieur à 1,5 et 1,2 cm³ même au 60^{ème} jour de traitement, avec respectivement 25 et 20 % de T/C.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un composé de formule générale (1)



dans laquelle :

10 - R₁ représente H, OH, ou un groupement alkoxy de 1 à 12 atomes de carbone,

- R₂ représente H, un groupement alkoxy-carbonyle de 1 à 12 atomes de carbone, notamment le groupement tert-butoxy-carbonyle, ou un groupement alkyle de 1 à 12 atomes de carbone,

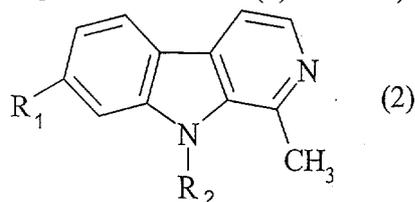
15 - R₃ représente O ou CH₃, sous réserve que, lorsque R₃ représente O, alors a représente une double liaison, b et c représentent une simple liaison et R₄ représente H, et que lorsque R₃ représente CH₃ alors a représente une simple liaison, b et c représentent une double liaison et R₄ ne représente aucun groupement ;

20 en association avec au moins un composé inhibant la réplication de l'ADN, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers, tels que les cancers du colon, les leucémies, les myélomes, les cancers du sein, les neuroblastomes, les hépatocarcinomes, les cancers du poumon, les cancers de la prostate, les cancers de l'ovaire, les cancers du testicule, les cancers gastriques, les cancers pancréatiques, ou

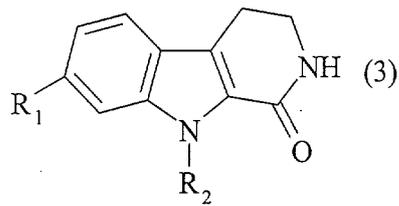
25 les rétinoblastomes.

2. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle le composé de formule générale (1) correspond :

- aux composés de formule (2) suivante,



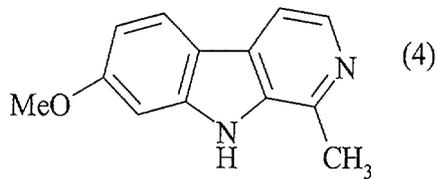
- ou aux composés de formule (3) suivante,



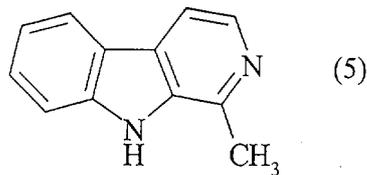
dans lesquelles R_1 et R_2 sont tels que définis dans la revendication 1.

10 3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle le composé de formule générale (1) correspond à :

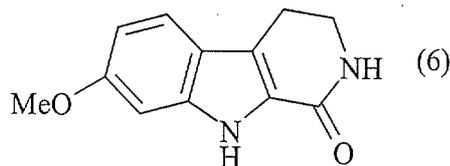
- l'harmine (4) :



- l'harmane (5)



- ou à l'harmalacidine (6)



30 4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, dans laquelle le composé inhibant la réplication de l'ADN est choisi parmi le groupe comprenant :

- un agent alkylant, tel que le cyclophosphamide, le carboplatine, le cisplatine, la mitomycine C ou le thiotépa ;
- un antimétabolite, tel que la 5-fluorouracile, l'ara C ou le méthotrexate ;
- ou un agent inhibant la topoisomérase II, tel que la doxorubicine, la mitoxantrone ou l'amsacrine.

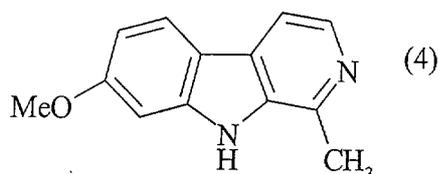
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, d'harmine ou d'harmalacidine, et de cyclophosphamide.

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, d'harmine ou d'harmalacidine, et de 5-fluorouracile.

7. Composition pharmaceutique comprenant à titre de substance active au moins un composé de formule générale (1) en association avec au moins un composé inhibant la réplication de l'ADN et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

8. Composition pharmaceutique selon la revendication 7, dans laquelle le composé de formule générale (1) correspond à :

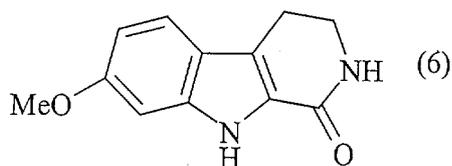
- l'harmine (4) :



- l'harmane (5)



- ou à l'harmalacidine (6)



9. Composition pharmaceutique selon la revendication 7 ou 8, dans laquelle le composé inhibant la réplication de l'ADN est choisi parmi le groupe comprenant :

- un agent alkylant, tel que le cyclophosphamide, le carboplatine, le cisplatine, la mitomycine C ou le thiotépa ;

- un antimétabolite, tel que la 5-fluorouracile, l'ara C ou le méthotrexate ;

- ou un agent inhibant la topoisomérase II, tel que la doxorubicine, la mitoxantrone ou l'amsacrine.

10. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 7 à 9, convenant pour une administration par voie orale ou intraveineuse.

5 11. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 7 à 10, comprenant à titre de substance active de l'harmine ou de l'harmalacidine, en association avec du cyclophosphamide et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

10 12. Composition pharmaceutique selon la revendication 11, convenant pour l'administration par voie orale :
d'environ 1 à environ 10 mg/kg/j d'harmine, ou d'environ 1 à environ 5 mg/kg/j d'harmalacidine, et d'environ 1 à environ 5 mg/kg/j de cyclophosphamide.

15 13. Composition pharmaceutique selon la revendication 11, convenant pour l'administration par voie intraveineuse :
d'environ 1 à environ 3 mg/kg/j d'harmine, ou d'environ 1 à environ 3 mg/kg/j d'harmalacidine, et d'environ 1 à environ 5 mg/kg/j de cyclophosphamide.

20 14. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 7 à 10, comprenant à titre de substance active de l'harmine ou de l'harmalacidine, en association avec de la 5-fluorouracile et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

25 15. Composition pharmaceutique selon la revendication 14, convenant pour l'administration par voie orale :
d'environ 1 à environ 10 mg/kg/j d'harmine, ou d'environ 1 à environ 5 mg/kg/j d'harmalacidine, et d'environ 1 à environ 10 mg/kg/j de 5-fluorouracile.

30 16. Composition pharmaceutique selon la revendication 14, convenant pour l'administration par voie intraveineuse :
d'environ 1 à environ 3 mg/kg/j d'harmine, ou d'environ 1 à environ 3 mg/kg/j d'harmalacidine, et d'environ 1 à environ 5 mg/kg/j de 5-fluorouracile.

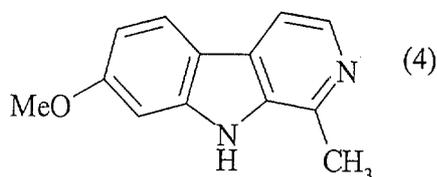
17. Produits contenant

- au moins un composé de formule générale (1), et

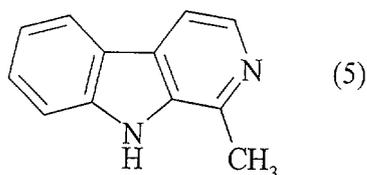
- au moins un composé inhibant la réplication de l'ADN,
 comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans
 le temps dans le cadre de la préparation d'un médicament destiné au traitement des
 cancers, tels que les cancers du colon, les leucémies, les myélomes, les cancers du sein,
 les neuroblastomes, les hépatocarcinomes, les cancers du poumon, les cancers de la
 prostate, les cancers de l'ovaire, les cancers du testicule, les cancers gastriques, les
 cancers pancréatiques, ou les rétinoblastomes.

18. Produits selon la revendication 17, dans lesquels le composé de formule générale (1)
 correspond à :

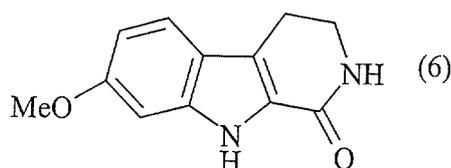
- l'harmine (4) :



- l'harmane (5)



- ou à l'harmalacidine (6)



19. Produits selon la revendication 17 ou 18, dans lesquels le composé inhibant la
 réplication de l'ADN est choisi parmi le groupe comprenant :

- un agent alkylant, tel que le cyclophosphamide, le carboplatine, le cisplatine, la mitomycine C ou le thiotépa ;
- un antimétabolite, tel que la 5-fluorouracile, l'ara C ou le méthotrexate ;
- ou un agent inhibant la topoisomérase II, tel que la doxorubicine, la mitoxantrone ou l'amsacrine.

20. Produits selon l'une des revendications 17 à 19, contenant

- de l'harmine ou de l'harmalacine, et
- de la 5-fluorouracile,

comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps dans le cadre de la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers, tels que les cancers du colon, les cancers du sein, les hépatocarcinomes, les cancers du poumon, les cancers de la prostate, les cancers de l'ovaire, les cancers gastriques, ou les cancers pancréatiques.

21. Produits selon l'une des revendications 17 à 19, contenant :

- de l'harmine ou de l'harmalacine, et
- du cyclophosphamide,

comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps dans le cadre de la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers, tels que les cancers du colon, les leucémies, les myélomes, les cancers du sein, les neuroblastomes, les hépatocarcinomes, les cancers du poumon, les cancers de l'ovaire, les cancers du testicule, ou les rétinoblastomes.

1/4

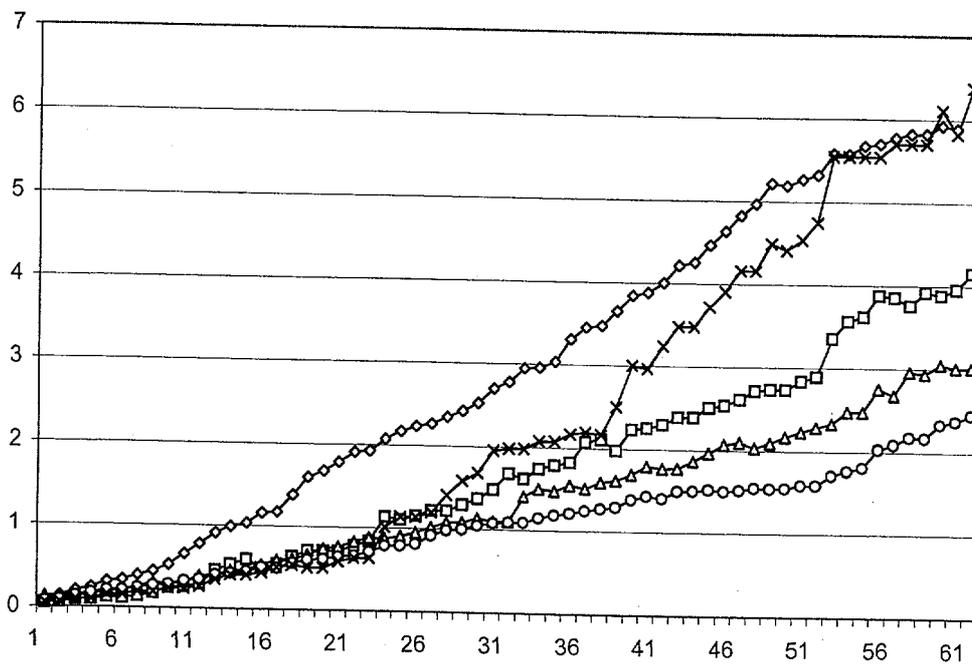


Figure 1

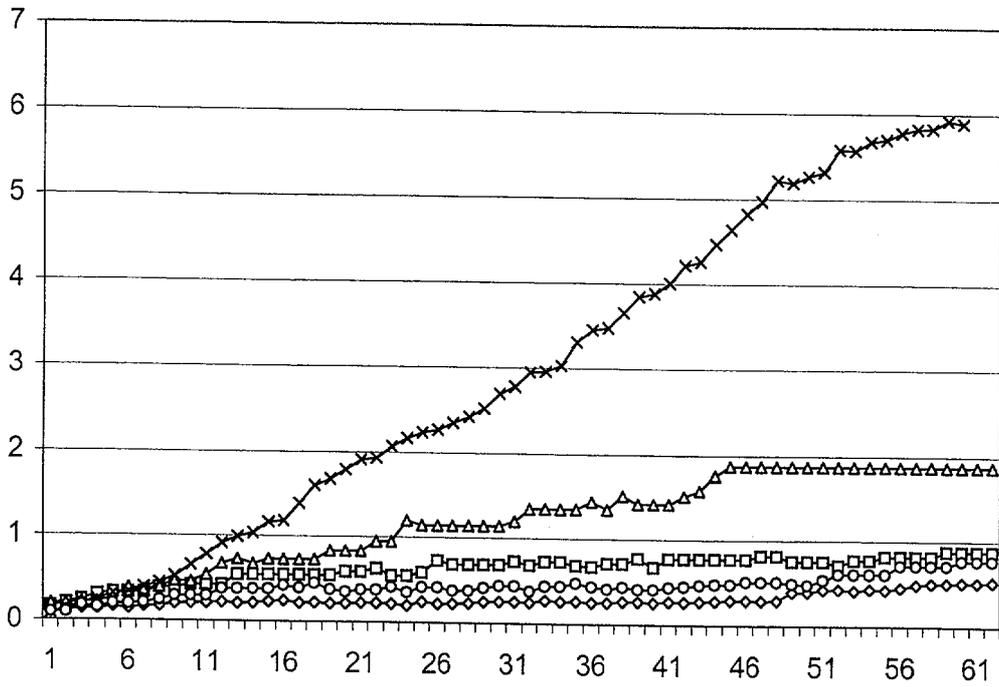


Figure 2A

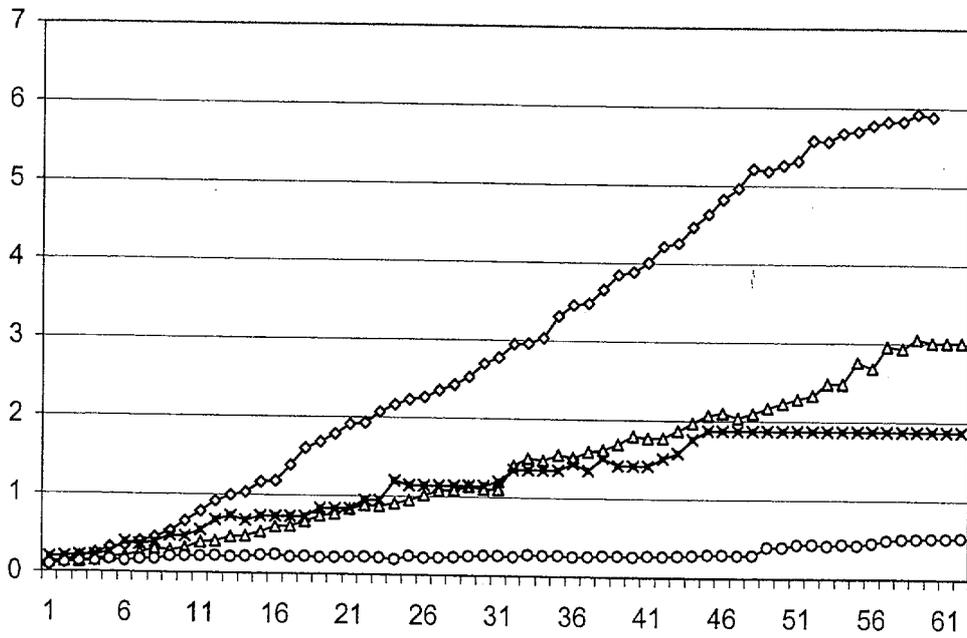


Figure 2B

3/4

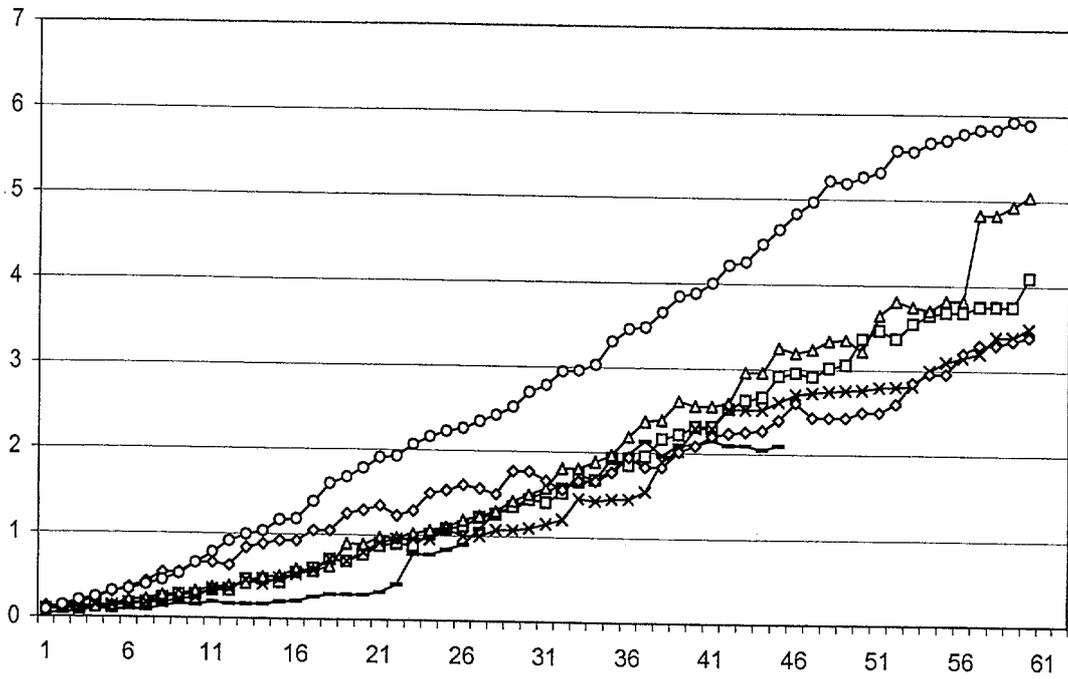


Figure 3A

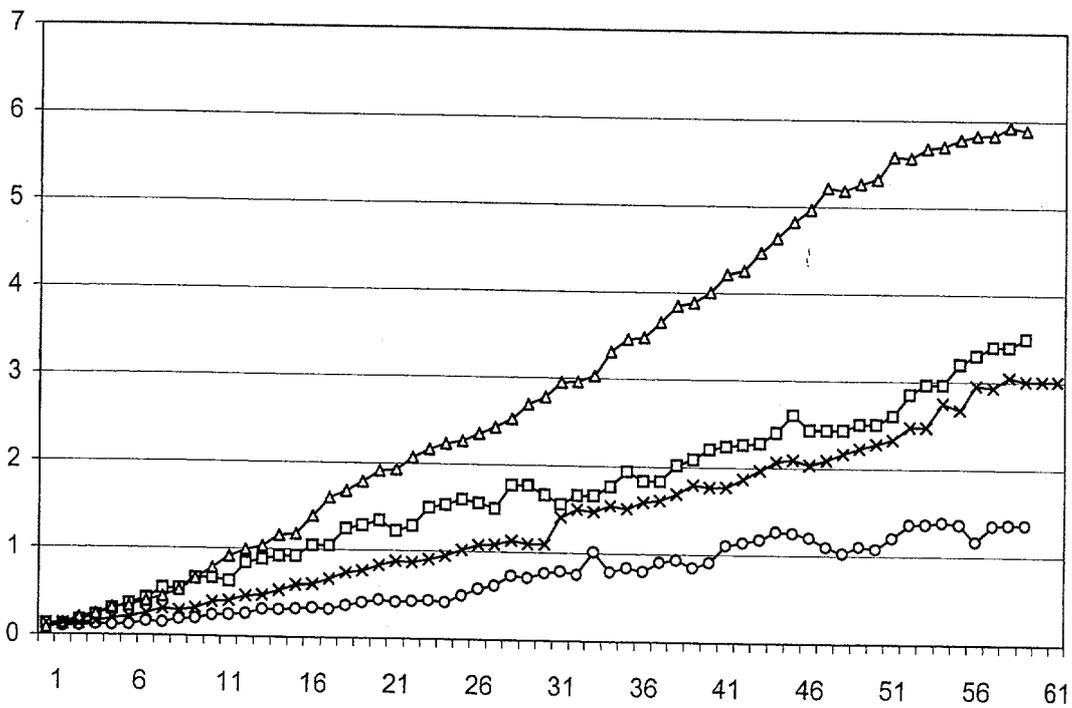


Figure 3B

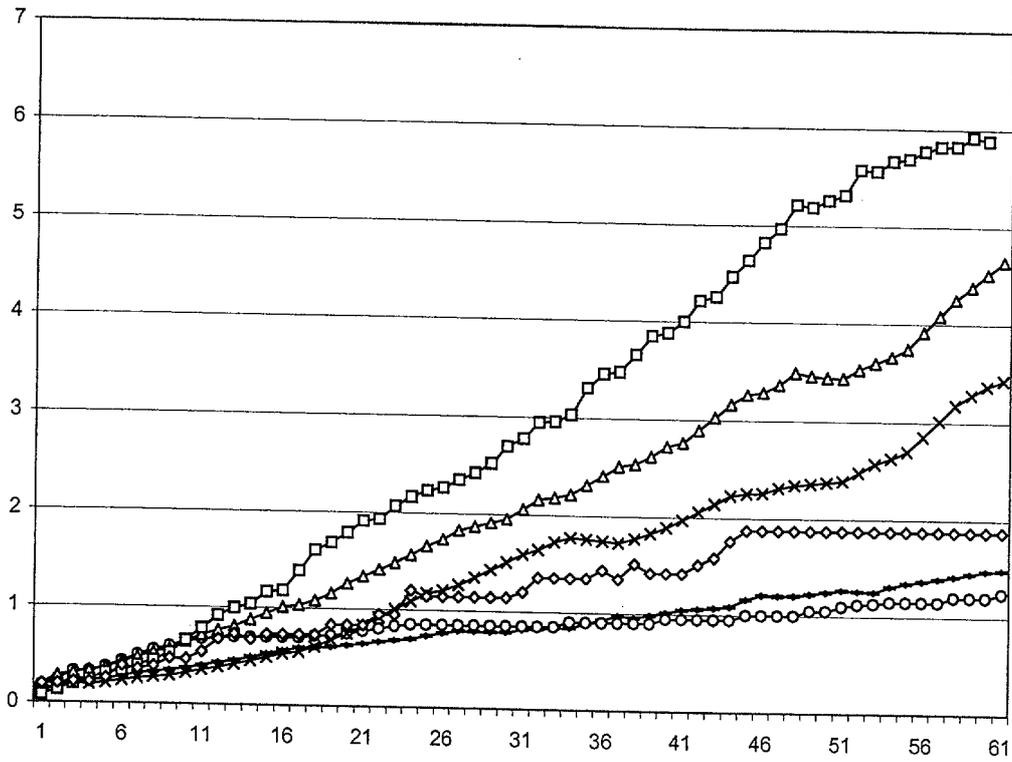


Figure 4



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 656377
FR 0404646

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	GB 2 303 627 A (THE * ARAB PHARMACEUTICAL MANUFACTURING CO LTD; * UNIVERSITY OF MOSUL) 26 février 1997 (1997-02-26) * revendications *	1-4, 7-13, 17-19	A61K31/437 A61P35/00
Y	----- KUSURKAR R S ET AL: "Efficient one-pot synthesis of anti HIV and antitumor compounds: harman and substituted harmans" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 44, no. 25, 16 juin 2003 (2003-06-16), pages 4761-4763, XP004426888 ISSN: 0040-4039 * page 1, colonne 1, alinéa 1 *	1-21	
Y	----- ISHIDA J ET AL: "Antitumor Agents 201. Cytotoxicity of Harmine and beta-Carboline Analogs" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 9, no. 23, 6 décembre 1999 (1999-12-06), pages 3319-3324, XP004183731 ISSN: 0960-894X * page 3322, alinéa 3 - page 3323, alinéa 2 *	1-21	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			A61K
			----- -/--
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
1 mars 2005		Leherte, C	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement
national

FA 656377
FR 0404646

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	SONG Y ET AL: "Specific inhibition of cyclin-dependent kinases and cell proliferation by harmine" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 317, no. 1, 23 avril 2004 (2004-04-23), pages 128-132, XP004496939 ISSN: 0006-291X * abrégé *	1-21	
Y	GOODMAN GILMAN A ET AL: "The pharmacological basis of therapeutics, PASSAGE" GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, NEW YORK : MCGRAW-HILL, US, 2001, pages 1383-1385, XP002319518 ISBN: 0-07-135469-7 * le document en entier *	1-21	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		1 mars 2005	Leherte, C
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0404646 FA 656377**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 01-03-2005

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB 2303627	A	26-02-1997	AUCUN

**RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 656377
FR 0404646

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:

Revendications ayant fait l'objet de recherches complètes:

4 5 6 9 11 12 13 14 15 16 19 20 21

Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes:

1-3 7 8 10 17 18

Raison pour la limitation de la recherche:

Les revendications 1-3, 7, 8, 10, 17 et 18 présentes ont trait à un composé défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir: "composé inhibitant la réplication de l'ADN". Les revendications couvrent tous les composés présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article L.612-6 CPI et/ou un exposé au sens de l'Article L.612-5 CPI que pour un nombre très limité de tels composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le composé au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. En conséquence, la recherche n'a été effectuée que pour les parties des revendications dont l'objet apparaît être clair, fondé et suffisamment exposé, à savoir les parties concernant les composés explicitement mentionnés dans les revendications.