(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 608 160**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **86 17507**

(51) Int Cl⁴ : C 07 K 5/10, 7/06; A 61 K 37/02.

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 15 décembre 1986.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de la mise à disposition du public de la demande :** BOPI « Brevets » n° 24 du 17 juin 1988.

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) et Société dite : LABORATOIRE L. LAFON.* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** Gérard Armand Marguerie de Rotrou.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire(s) :** Cabinet Lavoix.

(54) Nouveaux dérivés peptidiques et leur application notamment en thérapeutique.

(57) L'invention a pour objet des dérivés peptidiques de formule :

$$X^1 - X^2 - Gly - Asp - X^3 - X^4 \quad (I)$$

dans laquelle :

X^1 représente l'hydrogène, un résidu L-Arg, D-Arg ou Cys ou un groupe N-protecteur;

X^2 représente un résidu L-Arg ou D-Arg;

X^3 représente un résidu L-Trp, D-Trp, L-Leu, D-Leu, L-Ile, D-Ile, L-Phe, D-Phe ou un enchaînement de 2 ou 3 de ces résidus;

X^4 représente un groupe —OH, $-NH_2$, $-OR^1$ avec R^1 représentant un radical alkyle en C_1 à C_4, NHR^2 avec R^2 représentant un radical alkyle en C_1 à C_4, ou un résidu Cys.

Ces dérivés sont utiles en thérapeutique en raison de leur activité antiagrégante.

FR 2 608 160 - A1

La présente invention concerne de nouveaux dérivés peptidiques ayant une activité antiagrégante, leur procédé de préparation et leurs applications en thérapeutique et comme agents de diagnostic.

De façon plus précise, elle concerne des analogues peptidiques d'une séquence du fibrinogène utilisables notamment comme antagonistes du fibrinogène vis à vis des plaquettes sanguines.

On sait qu'au cours de l'hémostase les plaquettes sanguines adhèrent au sous-endothélium du vaisseau lésé, secrètent leur contenu granulaire après stimulation et agrègent les unes aux autres pour former un thrombus plaquettaire. L'agrégation dépend des contacts qui s'établissent entre membranes de plaquettes adjacentes. Cette réaction est nécessaire pour l'arrêt d'un saignement. Elle a cependant de nombreuses déviations pathologiques, notamment dans les cas de thromboses veineuses ou artérielles, au cours du développement d'une plaque d'athérome, ou de la formation de microthrombi qui peuvent obstruer la microcirculation périphérique ou cérébrale. Le contrôle et la régulation de l'agrégation plaquettaire sont donc un objectif majeur dans la prévention de la thrombose et de l'athérosclérose et de nombreuses études sont consacrées à la recherche et au développement de molécules aux propriétés antiagrégantes.

Dans ce phénomène, le fibrinogène a un rôle important. Ainsi dans le plasma de malades atteints d'afibrinogénémie congénitale, l'agrégation plaquettaire est fortement diminuée ou absente et ce défaut est corrigé par l'injection de fibrinogène. De même en l'absence de fibrinogène, des plaquettes lavées n'agrègent pas à l'ADP ou à l'épinéphrine. La présence de fibrinogène est donc une nécessité pour le dévelop-

pement normal d'un thrombus plaquettaire. La participation du fibrinogène à l'agrégation est due à l'induction d'un récepteur spécifique pour cette protéine sur la membrane de la plaquette activée. Tous les stimuli physiologiques de la plaquette induisent une classe unique de récepteur et l'interaction du fibrinogène avec ce récepteur régule l'agrégation plaquettaire. Il existe donc un mécanisme de l'agrégation plaquettaire, commun à tous les inducteurs, qui dépend de l'interaction entre le fibrogène et son récepteur. L'importance physiologique de cette voie de l'agrégation plaquettaire dépendante du fibrinogène est attestée par l'étude des thrombasthénies de Glanzmann dont les plaquettes ne fixent pas le fibrinogène et n'agrègent pas en réponse à tous les stimuli physiologiques de la cellule.

En résumé, le récepteur du fibrinogène n'est pas exprimé sur la plaquette circulante, il est induit dès que la cellule est stimulée. Cette induction peut être dépendante ou indépendante de la réaction de sécrétion. Tous les stimuli expriment le même récepteur et l'interaction entre le fibrincgène et le récepteur conduit directement à l'agrégation. La dissociation du fibrinogène lié à la plaquette a pour conséquence la désagrégation des plaquettes.

Dans ce contexte il est clair que si l'interaction entre le fibrinogène et son récepteur plaquettaire pouvait être régulée, ceci constituerait un moyen pour contrôler l'agrégation in vitro et in vivo.

La présente invention vise précisément à fournir de nouveaux agents qui permettent d'inhiber, de réguler ou de mesurer sélectivement la voie de l'agrégation dépendante du fibrinogène.

Des séquences peptidiques issues de la molécule de fibrinogène ont déjà été identifiées comme

inhibant la fixation de cette protéine sur les plaquettes et bloquant ainsi leur agrégation. Ainsi E. Plow et coll. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 8057, 1985) ont décrit l'activité de la séquence Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)* présente dans la chaîne alpha du fibrinogène.

La présente invention a pour objet des analogues peptidiques de l'extrémité C-terminale de la chaîne alpha du fibrinogène qui présentent un effet inhibiteur de la liaison fibrinogène-plaquette et de l'agrégation plaquettaire.

Ces dérivés peptidiques répondent à la formule générale suivante :

$$X^1 - X^2 - Gly - Asp - X^3 - X^4 \qquad (I)$$

dans laquelle

X^1 représente l'hydrogène, un résidu L-Arg, D-Arg ou Cys ou un groupe N-protecteur

X^2 représente un résidu L-Arg ou D-Arg

X^3 représente un résidu L-Trp,D-Trp,L-Leu,D-Leu,L-Ile,D-Ile,L-Phe,D-Phe ou un enchaînement de 2 ou 3 de ces résidus

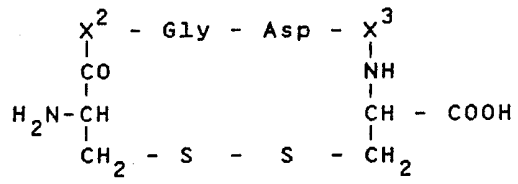
X^4 représente un groupe $-OH, -NH_2, -OR^1$ avec R^1 représentant un radical alkyle en C_1 à C_4, NHR^2 avec R^2 représentant un radical alkyle en C_1 à C_4, ou un résidu Cys.

Dans le cas où $X^1 = X^4 =$ Cys le dérivé peptidique peut être cyclisé par un pont disulfure en un

---

* La signification des symboles et abréviations utilisées est donnée en annexe.

composé de formule



Les groupes N-protecteurs physiologiquement acceptables sont notamment les groupes protecteurs de l'attaque en N-terminal des enzymes exopeptidases. Comme exemples de tels groupes on peut citer les groupes acyles tels que les groupes t-butyloxycarbonyle (Boc), tert-amyl-oxycarbonyle ($^{+}$Aoc), benzyloxycarbonyle, benzoyle, acétyle, formyle, propanoyle, butanoyle, phénylacétyle, phenylpropanoyle, cyclo pentylcarbonyle.

La présente invention englobe également les équivalents des dérivés peptidiques de formule I dans lesquels chaque liaison peptidique (-CO-NH-) entre deux résidus d'acide aminé de la formule générale I est remplacée par les structures suivantes :

- $CO-N(CH_3)-$; $-CO-O-$; $-CH_2-NH-$; $-CS-NH-$;
- $CO-CH_2$; CH_2-S- ; $-CHOH-CH_2-$; $-HN-CO-$;
- $CH=CH-$; $-CH_2-CH_2-$.

ou dans lesquels le squelette peptidique présente un ou plusieurs groupes intercalés tels que des groupes $-CH_2-$, $-NH-$, $-O-$.

Un dérivé peptidique préféré est un dérivé de formule

H - Arg - Gly - Asp - Trp - OH

La présente invention a également pour objet - une composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif un dérivé peptidique de formule I

- un agent de diagnostic comprenant un dérivé de peptidique de formule I

Les dérivés peptidiques de formule I peuvent être préparés de manière classique par synthèse peptidique en phase liquide ou solide par couplages successifs des différents résidus d'acides aminés à incorporer (de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale en phase liquide, ou de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale en phase solide) et dont les extrémités N-terminales et les chaînes latérales réactives sont préalablement bloquées par des groupements tels que ceux mentionnés ci-dessous :

1) Extrémité N-terminale protégée par : Boc
Bpoc
Fmoc

2)

Résidu	Groupement bloquant la chaîne latérale
Arginyle	tosyle
Asparagyle	H, xanthyle
Cystéyle	acétamidométhyle(Acm), 4-méthylbenzyle (Meb), 4-méthoxybenzyle(Mob), S-benzyle
Isoleucyle	H
Leucyle	H
Phénylalanyle	H
Propyle	H

On peut utiliser différentes méthodes de couplage :

1. Couplage des résidus par un carbodiimide (ex : DCC, EDC) avec ou sans catalyse (ex : HOBT) ou autre agent couplant (ex : EEDQ)

2. Utilisation des acides aminés sous forme d'anhydrides symétriques préformés

3. Utilisation des acides aminés sous forme d'esters activés (ex : p-nitrophénylester, HOBT ester) et couplage par l'intermédiaire de DCC.

En synthèse en phase solide (SPPS) le tableau I ci-dessous mentionne les différents types de résine utilisable ainsi que les protections et méthodes adéquates pour les différentes étapes.

Tableau I

Système SPPS utilisé	Liaison peptide-résine	Protection en alpha	réactif de déprotection	protection chaine latérale	réactif de clivage
Classique	Benzyl ester	Boc	TFA, HCl	Benzyl	HF, HBr
Stable (longue chaine)	Pam	Boc	TFA, HCl	Benzyl	HF, HBr
	Benzyl ester	Bpoc	TFA dilué	Benzyl	HF
	Benzyl ester	Bpoc	TFA dilué	t-Butyl	HF
Labile	Ether résine	Bpoc	TFA dilué	t-Butyl	TFA
Orthogonal	Ether résine	Fmoc	Piperidine	t-Butyl	TFA
Synthèse de segment	Ether résine	Fmoc	Piperidine	Benzyl	TFA
	t-Butyl résine	Fmoc	Piperidine	Benzyl	TFA
	Hydrazide résine	Fmoc	Piperidine	Benzyl	TFA
Assemblement de segments	Benzyl ester	Fmoc	Piperidine	Benzyl	HF
Peptides amides	MBHA, BHA	Boc	TFA, HCl	Benzyl	HF
Peptides alcools	Benzyl ester	Boc	TFA, HCl	Benzyl	$LiBH_4$

En synthèse en phase solide le 1er acide aminé (extrémité C-terminale) à fixer sur la résine peut être soit acquis commercialement déjà attaché au support soit fixé par l'intermédiaire de sel de césium (méthode de Gisin), d'un sel de tétraméthylammonium (méthode de Loffet) ou d'un carbodiimide.

L'exemple suivant illustre la préparation des dérivés peptidiques de formule I

Exemple :

Synthèse du peptide

H-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (ou R G D W)

Ce peptide a été synthétisé en phase solide à partir d'une résine de type PAM (4-(oxyméthyl)-phénylacétamidométhyl) présubstituée Boc-Trp(CHO)-PAM-résine dont la substitution est de 0,34 mmol Trp/g. Les acides aminés protégés utilisés et leur milieu de solubilisation ont été les suivants :

Dérivés	Solvants
Boc-Asp (O Bzl)	DMC
Boc-Gly	DMC
Boc-Arg (Tos)	DMF

Chaque couplage a été réalisé en 2 heures par le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) catalysé par l'hydroxy benzotriazole (OHBT) et suivi par une acétylation de 30 minutes par l'anhydride acétique.

En cours de synthèse les déprotections par l'acide trifluoroacétique (TFA) et les couplages ont été contrôlés par un test de Kaiser.

Le clivage final a été réalisé par HF (10 ml HF/g) en présence d'éthanedithiol (1 ml/10 ml HF) pour protéger le tryptophane pendant 1 heure à 0°C. Après lavage à l'éther, le peptide a été extrait par de l'acide acétique 45% puis 10% et lyophilisé.

Cependant le groupement formyl (-CHO) utilisé comme protecteur du Trp pendant la synthèse est résistant à l'acide fluorhydrique (HF). Pour l'éliminer un 2ème traitement du peptide est nécessaire :

A cet effet on traite le peptide RGDW (For) par 75 ml d'hydroxylamine 0,03 M (H_2N-OH,HCl) basifiée à pH 9 par de l'ammoniaque pendant plusieurs heures, en suivant par spectre d'absorption optique la disparition du groupement formyl à 300 mn et l'apparition du Tryptophane libre à 280 mn.

Après filtration sur Millex SR-0,5 µ, le peptide obtenu a été purifié sur colonne de Sephadex G 10 éluée par de l'acide acétique à 25% puis lyophilisé 2 fois.

L'analyse d'acides aminés et le spectre d'absorption du RGDW montrent, ainsi que les chromatographies en couche mince et l'HPLC, un produit pur au point de vue peptidique et organique, mais révélant la présence d'une grande quantité de sel. Ceci s'explique par le traitement préalable de déprotection du Tryptophane par H_2N-OH,HCl en présence de NH_4OH qui entraîne la formation de chlorure d'ammonium non lyophilisable. Les chlorures ont donc dû être retenus par échange d'anion sur une colonne AG1-X_2 (forme acétate) et le peptide élué par de l'acide acétique à 0,1% (pH 3,5). L'acétate d'ammonium obtenu est lyophilisable.

Contrôle de pureté

1 . Chromatographie sur couche mince de silice avec détection par :

- ninhydrine (NH_2)
- TDM (NH)
- réactif d'Ehrlich (paradiméthylaminobenzaldéhyde) (spécifique du Trp)

Solvants de migration	Rf.
Butanol-1/Acide Acétique/Eau 4 1 1	0,1
Méthanol/chloroforme/ammoniaque 25% 60 40 20	0,42

2.HPLC sur colonne analytique Spherisorb OD5.2 5 µ
Eluant : gradient d'Acétonitrile (TFA 0.1%) dans H_2O (TFA 0.1%), de 0 à 80% en 25 mn, à 1 ml/mn.
Détection : Densité optique à 205-215 mn (liaison peptidique) et à 270-290 mn (Trp)
T Rétention RGDW : 15 mn soit 48% d'acétonitrile (TFA 0,1%).

3. Analyse d'acides aminés

Après hydrolyse à 110°C pendant 27 heures par HCl/Acide propionique (50/50) en présence de mercaptoéthanol (0,1%).

	Equivalent molaire
Trp	ND
Asp	1
Cly	0,92
Arg	0,95

On donnera ci-après des résultats des études pharmacologiques mettant en évidence les propriétés des dérivés peptidiques de formule I

1. Inhibition de la liaison plaquette-fibrinogène

Préparation des plaquettes

Les plaquettes sont isolées à partir de 60 ml de sang humain prélevé sur un tampon anticoagulant, l'ACD, à raison d'1 volume d'ACD pour 6 volumes de sang.

L'ACD a la composition suivante :

Citrate trisodique 5 H_2O		5,95 g
Acide citrique		3,41 g
Dextrose		5 g
H_2O	qsp	250 ml

Le sang est ensuite centrifugé 20 mn à 1000 t/mn (centrifugeuse JOUAN E 96) à température ambiante.

Le PRP (plasma riche en plaquettes) est décanté et additionné de PGE_1 $0,1.10^{-6}$M puis centrifugé 15 mn à 2000 t/mn.

Les plaquettes obtenues dans le culot sont alors reprises par 1 ml de tampon Tyrode-albumine pH 7,2 préparé selon la composition suivante :

Tampon Tyrode (solution mère) :

NaCl	1,3 M
KCl	0,026 M
$NaHCO_3$	0,12 M

Tampon Tyrode-albumine :

solution mère	1/10	M
D-glucose	0,0055	M
albumine	2%	
HCl 1M qsp	pH 7,2	

Les plaquettes sont lavées sur une colonne de Sépharose CL 2B par du tampon tyrode-albumine pH 7,2 puis les plaquettes recueillies sont diluées à la concentration de 2.10^8 pl./ml.

Les essais sont réalisés sur 4.10^7 plaquettes en présence de $CaCl_2$ (0,5 mM), de ^{125}I-fibrinogène ($0,1.10^{-6}$M) et de différentes concentrations de peptide, et la stimulation des plaquettes est provoquée par de l'ADP (5.10^{-6}M). Après 15 mn d'incubation et dépôt sur une solution de saccharose à 15% le complexe ^{125}I-fibrinogène-plaquette est isolé par centrifugation à 12000 t/mn pendant 2 mn.

Les résultats sont donnés sous forme de CI50 dans le tableau II. Ce tableau donne également la séquence du peptide.

2. Inhibition de l'agrégation plaquettaire

L'effet des peptides synthétiques sur l'agrégation plaquettaire a été étudié sur des plaquettes isolées comme précédemment pour l'étude de la liaison au fibrinogène. La stimulation des plaquettes est également obtenue par l'ADP 5.10^{-6}M et l'essai réalisé en présence de fibrinogène $1,1.10^{-6}$M et de $CaCl_2$ $0,5.10^{-6}$M.

Les résultats sont donnés dans le tableau II et mettent en évidence une activité inhibitrice sur l'agrégation plaquettaire des peptides de formule I.

Tableau II

Peptide	Nomenclature	Inhibition IC50 (µM)	
		Liaison plaquettaire Fibrinogène	Agrégation
Arg - Gly - Asp - Trp	RGDW	3,6	10

Les dérivés peptidiques de formule I peuvent être utilisés notamment pour le traitement et la prévention des thromboses, en particulier dans les états préthrombotiques pour bloquer l'agrégation plaquettaire.

Ils peuvent également exercer un effet inhibiteur sur

- l'adhésion des plaquettes sanguines aux cellules endothéliales des parois vasculaires ou du sous endothélium.
- l'athérogénèse

- le développement de métastases
- la réponse inflammatoire

Les compositions thérapeutiques selon l'invention peuvent être administrées à l'homme ou aux animaux par voie orale ou parentérale.

Elles peuvent être sous la forme de préparation solides, semi-solides ou liquides. Comme exemples, on peut citer les comprimés, les gélules, les solutions ou les suspensions injectables.

Dans ces compositions le principe actif est généralement mélangé avec un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables habituels bien connus de l'homme de l'art.

Les compositions thérapeutiques peuvent contenir notamment de 1 à 60% en poids de principe actif.

La quantité de principe actif administrée dépend évidemment du patient qui est traité, de la voie d'administration et de la sévérité de la maladie. Elle est généralement de 1 à 500 mg.

ANNEXE

Abréviations usuelles de la chimie des peptides

BHA	:	benzylhydrylamine (résine)
Boc	:	tert-butyloxycarbonyle
Bpoc	:	2-(4-biphénylyl)propyl(-2)oxycarbonyle
Bzl	:	benzyle
Clz	:	2-chlorobenzyloxycarbonyle
DCC	:	dicyclohexylcarbodiimide
DCM	:	dichlorométhane
DMF	:	diméthylformamide
EDC	:	N-ethyl-N'-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EEDQ	:	N-ethyloxycarbonyl-2-ethyloxy-1,2-dihydroquinoline
Fmoc	:	9-fluorénylméthyloxycarbonyle
HOBT	:	1-hydroxybenzotriazole
MBHA	:	4-méthylbenzhydrylamine (résine)
TDM	:	N,N,N',N',tétraméthyl-4,4'-diaminodiphénylméthane
TFA	:	acide trifluoroacétique
Tos	:	tosyle
Xan	:	xanthyle

Symboles des acides aminés

A	Ala	alanine
C	Cys	cystéine
D	Asp	acide aspartique
E	Glu	acide glutamique
F	Phe	phénylalanine
G	Gly	glycine
H	His	histidine
I	Ile	isoleucine
K	Lys	lysine
L	Leu	leucine
M	Met	méthionine
N	Asn[2]	asparagine
P	Pro	proline
Q	Glu[2]	glutamine
R	Arg	arginine
S	Ser	serine
T	Thr	thréonine
V	Val	valine
W	Trp	tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

REVENDICATIONS

1. Dérivés peptidiques de formule

$$X^1 - X^2 - Gly - Asp - X^3 - X^4 \quad (I)$$

dans laquelle

X^1 représente l'hydrogène, un résidu L-Arg, D-Arg ou Cys ou un groupe N-protecteur

X^2 représente un résidu L-Arg ou D-Arg

X^3 représente un résidu L-Trp,D-Trp,L-Leu,D-Leu,L-Ile,D-Ile,L-Phe,D-Phe ou un enchaînement de 2 ou 3 de ces résidus

X^4 représente un groupe $-OH, -NH_2, -OR^1$ avec R^1 représentant un radical alkyle en C_1 à C_4, NHR^2 avec R^2 représentant un radical alkyle en C_1 à C_4, ou un résidu Cys.

2. Peptide de formule

H - Arg - Gly - Asp - Trp - OH

3. Composition thérapeutique, caractérisé en ce qu'elle contient à titre de principe actif un dérivé peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2.

4. Agent de diagnostic, caractérisé en ce qu'il contient un dérivé peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2.