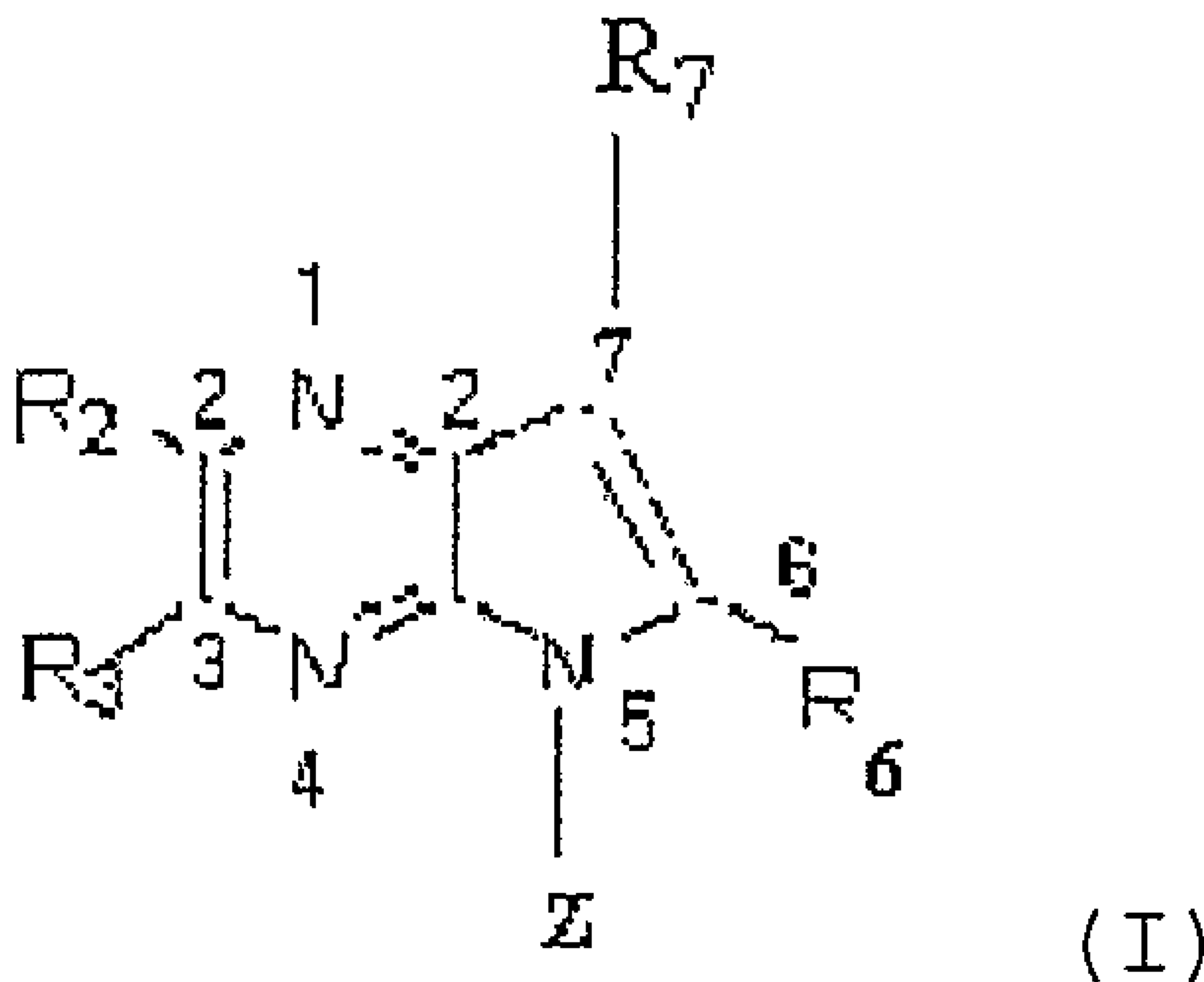




(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2005/10/14  
 (87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2006/04/27  
 (85) Entrée phase nationale/National Entry: 2007/04/05  
 (86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2005/002558  
 (87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2006/042950  
 (30) Priorité/Priority: 2004/10/15 (FR0410962)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *A61K 31/4985* (2006.01),  
*A61P 1/00* (2006.01), *A61P 11/00* (2006.01)  
 (71) Demandeurs/Applicants:  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS), FR;  
UNIVERSITE DE POITIERS, FR  
 (72) Inventeurs/Inventors:  
BECQ, FREDERIC, FR;  
MEIJER, LAURENT, FR;  
METTEY, YVETTE, FR  
 (74) Agent: BERESKIN & PARR

(54) Titre : UTILISATION DE DERIVES DE PYRROLO- PYRAZ INES POUR LE TRAITEMENT DE LA MUCOVISCIDOSE  
 (54) Title: USE OF PYRROLOPYRAZINE DERIVATIVES FOR THE PRODUCTION OF MEDICAMENTS FOR THE  
TREATMENT OF MUCOVISCIDOSIS AND DISEASES RELATED TO PROTEIN ADDRESSING ERRORS IN CELLS



(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention a pour objet l'utilisation de dérivés de pyrrolo-pyrazines pour fabriquer des médicaments pour le traitement de la mucoviscidose et de maladies liées à un défaut d'adressage des protéines dans les cellules, ces dérivés répondant à la formule (I): dans laquelle - R2 et R3 sont identiques ou différents et représentent H, C1-C6 alkyl, ledit alkyl étant une chaîne alkyle droite ou ramifiée, le cas échéant substituée, - R6 est un cycle aromatique Ar ou un cycloalkyle, le cas échéant substitué, ledit cycloalkyle étant le cas échéant substitué par un groupe aryle qui peut être également substitué, - R7 est H, C1-C6 alkyl, (alk.)n-hal., CH<sub>2</sub>-CH = CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-cycloalkyl, CH<sub>2</sub>-Ar, - Z est H ou CH<sub>3</sub>.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
27 avril 2006 (27.04.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2006/042950 A3**(51) Classification internationale des brevets :  
A61K 31/4985 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01)  
A61P 11/00 (2006.01)(74) Mandataires : PEAUCELLE, Chantal etc.; CABINET  
ARMENGAUD AINE, 3, Avenue Bugeaud, F-75116  
PARIS (FR).(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2005/002558(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA,  
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,  
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(22) Date de dépôt international :  
14 octobre 2005 (14.10.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

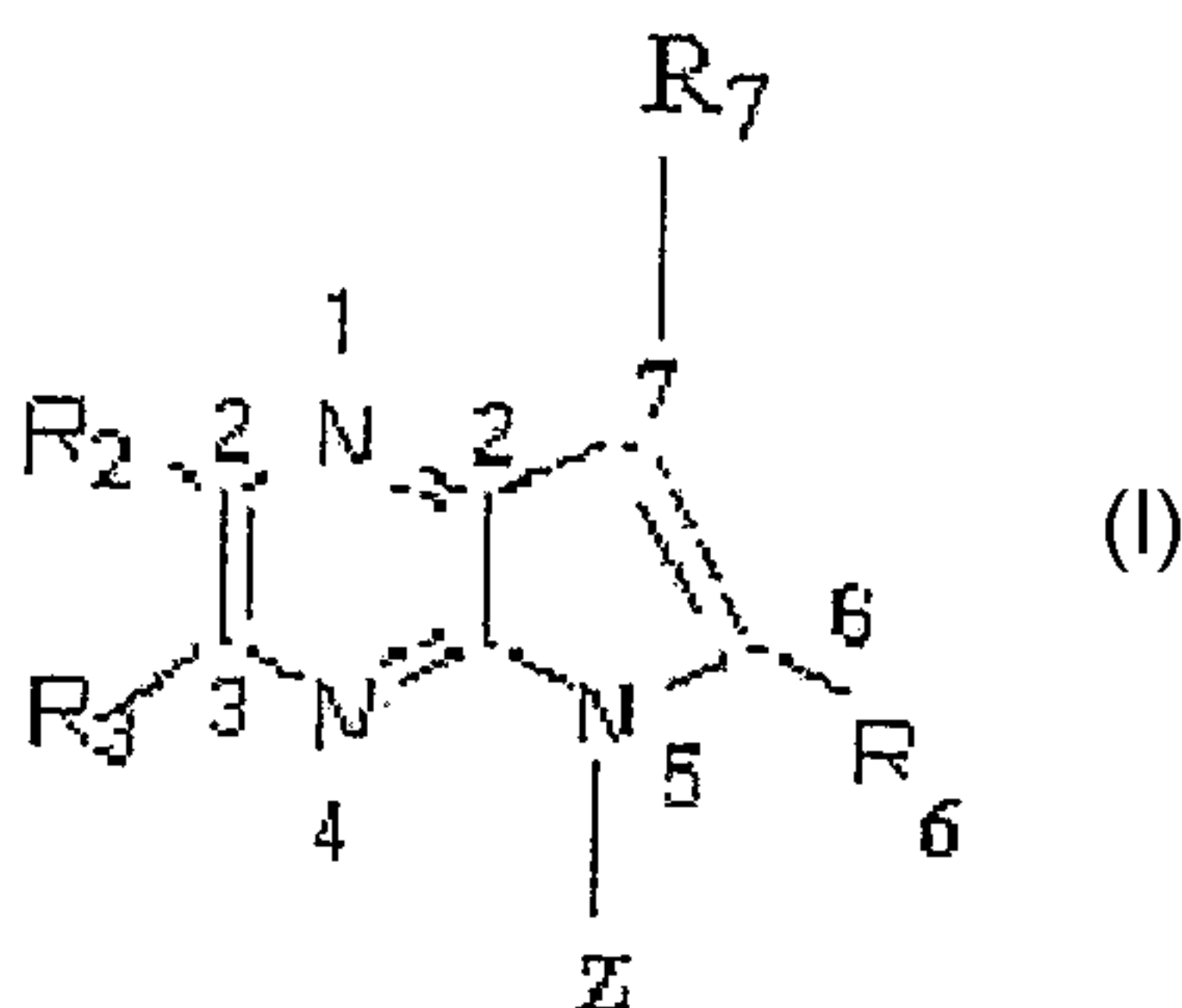
(30) Données relatives à la priorité :  
0410962 15 octobre 2004 (15.10.2004) FR(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasienn (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-  
ENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, Rue Michel-Ange,  
F-75794 PARIS CEDEX 16 (FR). UNIVERSITE DE  
POITIERS [FR/FR]; 15 Rue de l'Hôtel Dieu, F-86034  
POITIERS CEDEX (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(72) Inventeurs; et  
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BECQ,  
Frédéric [FR/FR]; 86 Route de Ligugé, F-86280  
POITIERS (FR). MEIJER, Laurent [FR/FR]; 16,  
Rue de Bir-Hakeim, F-29680 ROSCOFF (FR). METTEY,  
Yvette [FR/FR]; 5, Rue de l'Ancienne Comédie, F-86000  
POITIERS (FR).(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 29 juin 2006En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégés,  
se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.(54) Title: USE OF PYRROLOPYRAZINE DERIVATIVES FOR THE PRODUCTION OF MEDICAMENTS FOR THE TREAT-  
MENT OF MUCOVISCIDOSIS AND DISEASES RELATED TO PROTEIN ADDRESSING ERRORS IN CELLS

(54) Titre : UTILISATION DE DERIVES DE PYRROLO- PYRAZ INES POUR LE TRAITEMENT DE LA MUCOVISCIDOSE

(57) Abstract: The invention relates to the use of pyrrolopyrazine derivatives for the  
production of medicaments for the treatment of mucoviscidosis and diseases related to  
protein addressing errors in cells, said derivatives being of formula (I): where R2 and  
R3 independently = H, C1-C6 straight or branched chain optionally-substituted alkyl,  
R6 = an aromatic ring Ar or cycloalkyl, optionally substituted, said cycloalkyl option-  
ally substituted by an aryl group which may equally be substituted, R7 = H, C1-C6  
alkyl, (alk.)<sub>n</sub>-Hal, CH<sub>2</sub>-CH = CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-cycloalkyl, CH<sub>2</sub>-Ar and Z = H or CH<sub>3</sub>.(57) Abrégé : L'invention a pour objet l'utilisation de dérivés de pyrrolo-pyrazines  
pour fabriquer des médicaments pour le traitement de la mucoviscidose et de maladies  
liées à un défaut d'adressage des protéines dans les cellules, ces dérivés répondant à la  
formule (I): dans laquelle - R2 et R3 sont identiques ou différents et représentent H,  
C1-C6 alkyl, ledit alkyl étant une chaîne alkyle droite ou ramifiée, le cas échéant substituée, - R6 est un cycle aromatique Ar ou  
un cycloalkyle, le cas échéant substitué, ledit cycloalkyle étant le cas échéant substitué par un groupe aryle qui peut être également  
substitué, - R7 est H, C1-C6 alkyl, (alk.)<sub>n</sub>-hal., CH<sub>2</sub>-CH = CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-cycloalkyl, CH<sub>2</sub>-Ar, - Z est H ou CH<sub>3</sub>.

WO 2006/042950 A3

"UTILISATION DE DERIVES DE PYRROLO-PYRAZINES POUR LA  
FABRICATION DE MEDICAMENTS POUR LE TRAITEMENT DE LA  
MUCOVISCIDOSE ET DE MALADIES LIEES A UN DEFAUT D'ADRESSAGE DES  
PROTEINES DANS LES CELLULES"

5 L'invention vise l'utilisation de dérivés de pyrrolo-  
pyrazines pour fabriquer des médicaments capables de restaurer  
l'adressage de protéines du réticulum endoplasmique vers les  
membranes plasmiques. Elle vise tout particulièrement le  
traitement de la mucoviscidose.

10 La mucoviscidose (CF : *Cystic Fibrosis*) est la maladie  
génétique récessive, autosomique, létale la plus répandue dans  
les populations européennes et nord américaines. Le gène CF  
(locus 7q31) code pour la protéine trans-membranaire nommée  
CFTR (pour *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance*  
15 *Regulator*). Des mutations du gène CF provoquent un transport  
anormal d'eau et d'électrolytes à travers les membranes  
cellulaires de divers organes comme les poumons, les glandes  
sudoripares, l'intestin et le pancréas exocrine. Bien qu'il  
existe plus de 1000 mutations de la protéine CFTR, la mutation  
20 la plus fréquente (70 % des patients) est la délétion d'une  
phénylalanine dans le domaine NBF1 en position 508 (delF508).  
La principale cause de mortalité des patients CF est liée à  
cette délétion et conduit à des infections ou à une  
insuffisance pulmonaire provoquées par une augmentation de la  
25 viscosité du mucus. Cette viscosité entraîne l'occlusion des  
voies respiratoires et favorise les infections par les  
bactéries opportunistes. Une aggravation est de plus constatée  
au niveau digestif et notamment pancréatique (patient  
pancréatique-insuffisant). La protéine CFTR est une  
30 glycoprotéine de 1480 acides aminés, appartenant à la  
superfamille des transporteurs membranaires ABC. CFTR est un  
canal chlorure localisé dans la membrane plasmique apicale des  
cellules épithéliales pulmonaires chez les individus sains.

CFTR est responsable du transport trans-épithélial d'eau  
35 et d'électrolytes et permet chez un individu sain  
l'hydratation des voies aériennes pulmonaires.

Chez les patients CF, homozygotes pour la mutation

delF508, et plus généralement pour les mutants de classe II (mutations produisant une protéine absente de la membrane plasmique), cette protéine est absente des membranes plasmiques du fait d'un mauvais adressage de la protéine qui est retenue dans le réticulum endoplasmique (RE). L'hydratation des voies aériennes pulmonaires n'est plus fonctionnelle dans ce cas. La délétion delF508 perturbe le repliement du domaine NBF1 et empêche la maturation complète de la protéine qui est donc dégradée très tôt au cours de sa biosynthèse. Cependant, si la protéine delF508 atteint la membrane, elle fonctionne comme un canal chlorure.

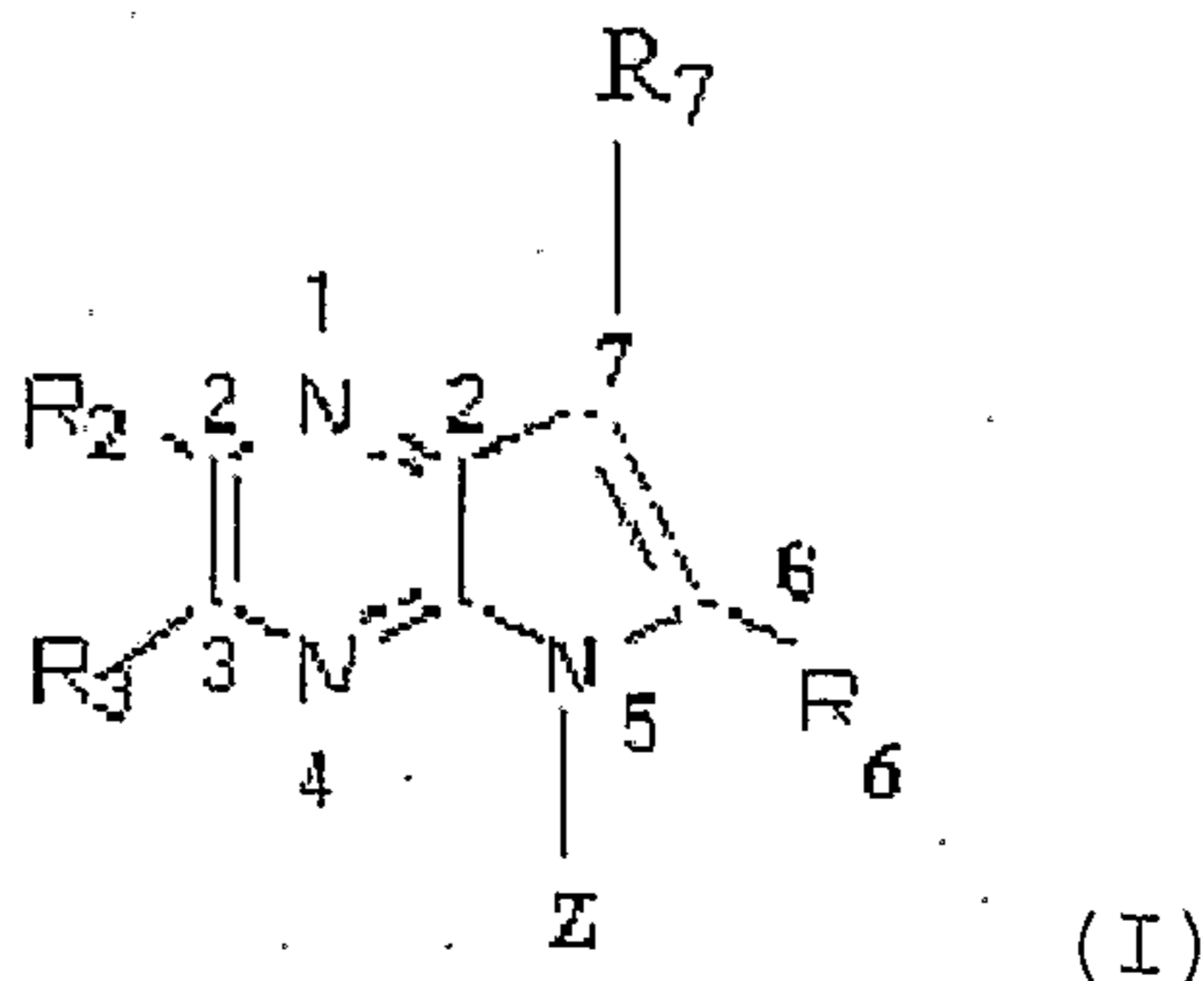
Une des clés d'un traitement de cette maladie consiste donc en un ré-adressage de delF508 vers la membrane plasmique des cellules au niveau de laquelle l'activité de transport de delF508 peut être stimulée par des agonistes physiologiques.

De manière surprenante, les inventeurs ont mis en évidence que des dérivés notamment connus pour leur effet anti-prolifératif étaient capables d'activer le CFTR sauvage et des formes mutées et de provoquer une re-localisation membranaire de la protéine delF508-CFTR restaurant ainsi sa capacité de transport trans-membranaire. De manière générale ces dérivés sont capables de restaurer un défaut d'adressage des protéines dans les cellules.

De plus, ces dérivés présentent l'intérêt d'une innocuité élevée.

L'invention a donc pour but de fournir une nouvelle utilisation de ces dérivés pour fabriquer des médicaments pour le traitement de la mucoviscidose et de maladies liées à un défaut d'adressage des protéines dans les cellules.

Les dérivés utilisés conformément à l'invention répondent à la formule (I):



(I)

dans laquelle

- R2 et R3 sont identiques ou différents et représentent H, C1-C6 alkyl, ledit alkyl étant une chaîne alkyle droite ou ramifiée, le cas échéant substituée,

5 - R6 est un cycle aromatique Ar ou un cycloalkyle, le cas échéant substitué, ledit cycloalkyle étant le cas échéant substitué par un groupe aryle qui peut être également substitué,

10 - R7 est H, C1-C6 alkyl, (alk.)<sub>n</sub>-hal., CH<sub>2</sub>-CH = CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-cycloalkyl, CH<sub>2</sub>-Ar,

- Z est H ou CH<sub>3</sub>.

De préférence, R2 et R3, et/ou Z et/ou R7 sont différents de H.

15 Ar est de préférence un phényl, naphtyl, furyl, thiényl, pyridyl, cyclopropyl phényl, phényl dioxolyl.

"Cycloalkyl" est un C3-C6 cycloalkyl.

Les substitutions du groupe alkyl, du cycle aromatique ou cycloalkyl sont choisies dans le groupe comprenant un ou plusieurs halogènes (F, Cl, Br, I, CF<sub>3</sub>), OH, NH<sub>2</sub>, N(H, alkyl),  
20 N(alkyl)<sub>2</sub>, O-alkyl, COOH, COO-alkyl, CONH<sub>2</sub>, CON(H, alkyl), CON(alkyl)<sub>2</sub>, NHCONH<sub>2</sub>, NHCON(H, alkyl), NHCON(alkyl)<sub>2</sub>, N(alkyl)CONH<sub>2</sub>, N(alkyl)CON(H, alkyl), N(alkyl)CON(alkyl)<sub>2</sub>, alkoxy, CN, O-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, O-SO<sub>2</sub>-N(H, alkyl), -O-SO<sub>2</sub>-N(alkyl)<sub>2</sub>, SH, S-alkyl. Un ou plusieurs substituants peuvent être présents.

25 "Alkyl" est un C1-C6 alkyl et comprend les isomères.

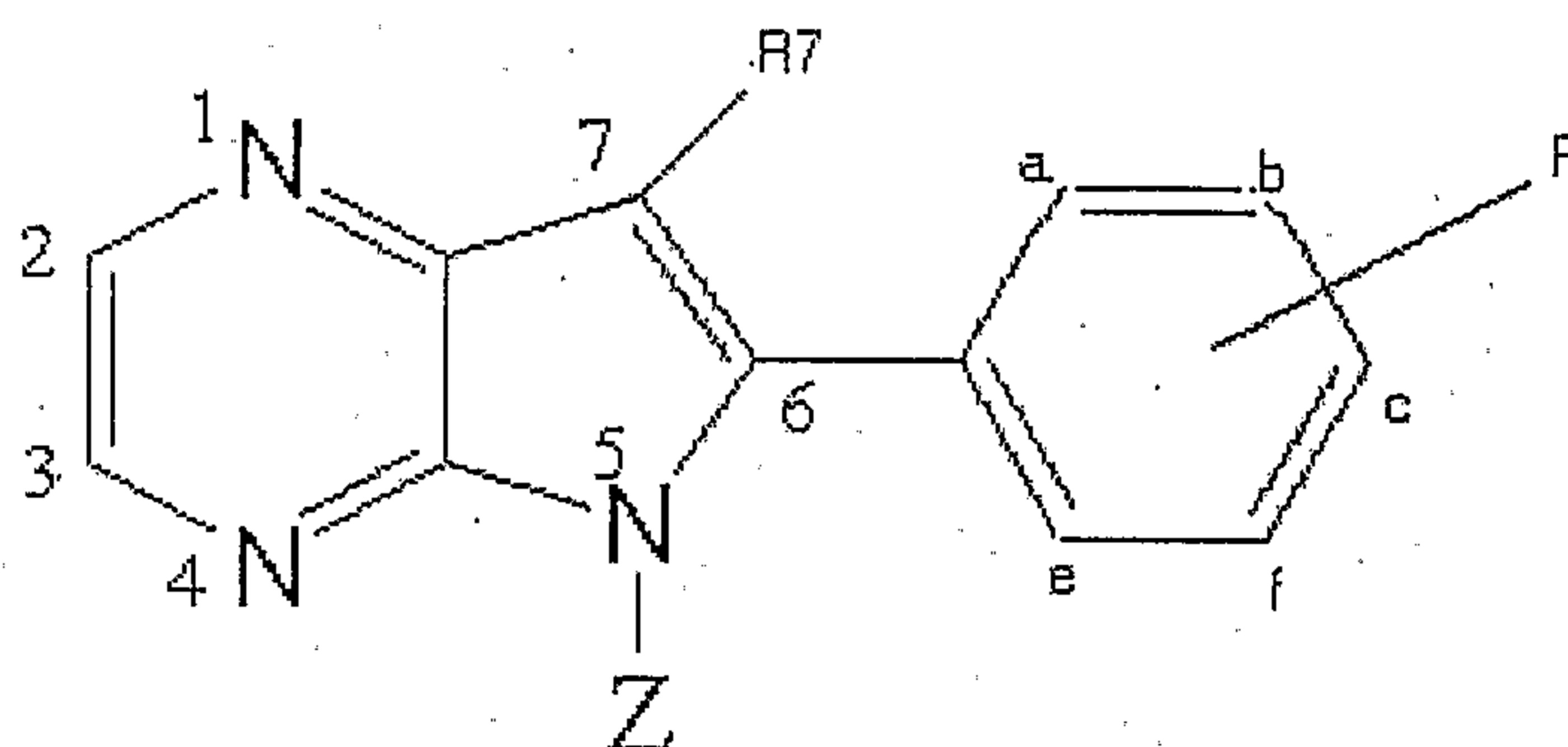
"Alkoxy" comprend un groupe C1-C6 alkyl.

"Alk." est un groupe C1-C6 alkylène, n est 1-6, et "hal." est F, Cl, Br, I or CF<sub>3</sub>.

30 Lesdits pyrrolo [2,3-b] pyrazines, également désignés par aloisines ci-après, sont capables de restaurer l'adressage de la protéine CFTR vers les membranes plasmiques des cellules et constituent donc des composés de grand intérêt pour le traitement de pathologies liées à de tels problèmes de défaut d'adressage.

Comme illustré par les exemples, ils sont particulièrement efficaces pour provoquer la re-localisation de la protéine delF508-CFTR dans la mucoviscidose où cette protéine est retenue dans le réticulum endoplasmique, et de restaurer ainsi sa capacité de transfert trans-membranaire.

Des dérivés préférés de pyrrolo-pyrazines présentent la formule (II):



(II)

10 dans laquelle

- le groupe phényl en position 6 est substitué par un, deux ou trois substituants R choisis dans le groupe comprenant :

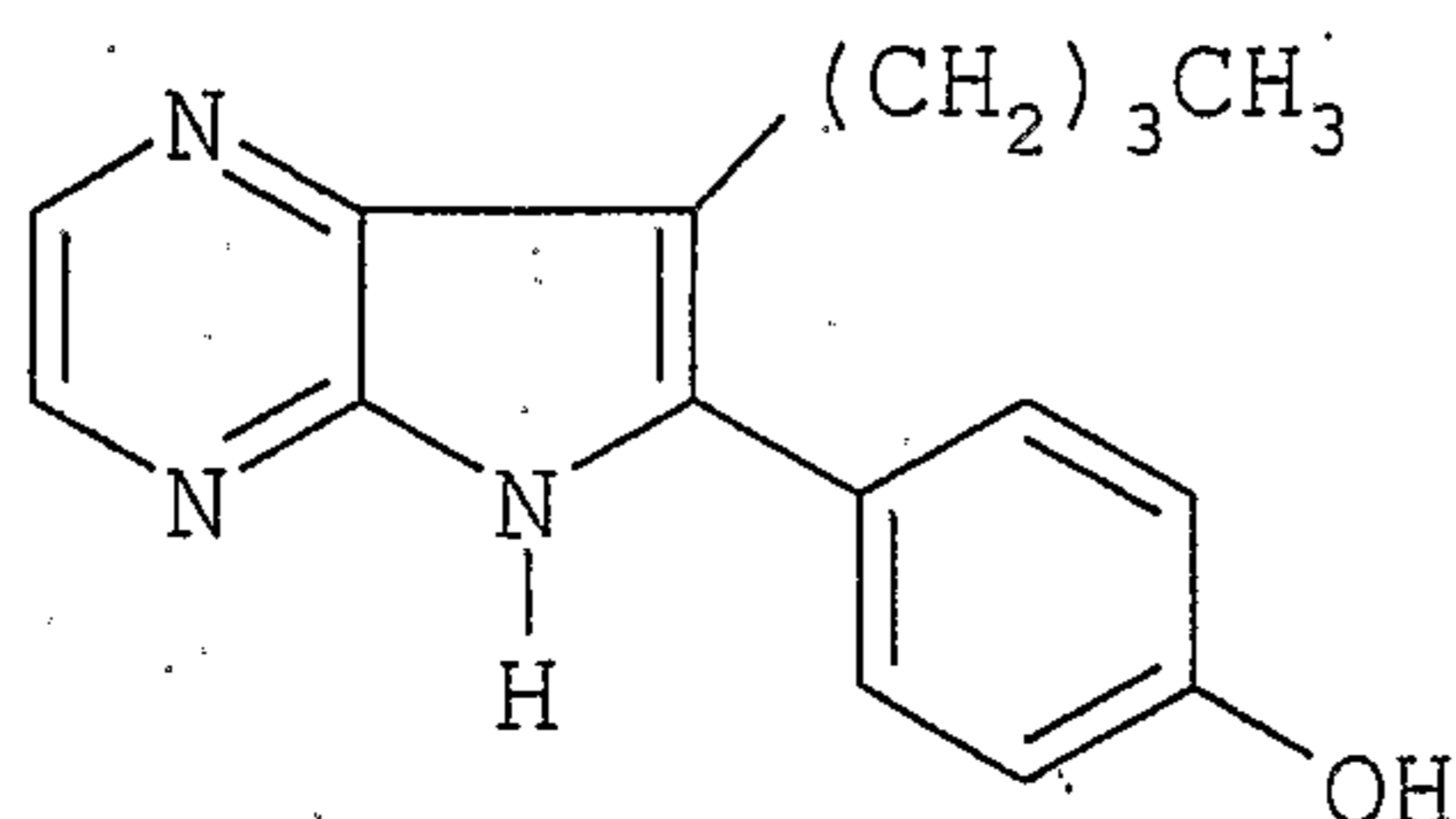
- H, -OH, alkyl, -O alkyl, hal., -NH<sub>2</sub>, -N(H,alkyl), -N(alkyl)<sub>2</sub>, -O-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -O-SO<sub>2</sub>-N(H, alkyl), -O-SO<sub>2</sub>-N(alkyl)<sub>2</sub>, -COOH, -COO-alkyl, CONH<sub>2</sub>, -CON(H,alkyl), -CON(alkyl)<sub>2</sub>,

- R7 est H, alkyl, (alk.)<sub>n</sub> hal., -CH<sub>2</sub>-CH = CH<sub>2</sub>, (alk.)<sub>n</sub>-cycloalkyl, alk.-Ar, et

- Z est H ou CH<sub>3</sub>.

20 Dans un groupe préféré, Z et/ou R7 sont différents de H.

Un composé tout particulièrement préféré correspond à l'aloïsine A répondant à la formule (III)



RM39 (Aloisine A)

(III)

Lors de l'élaboration des médicaments, les principes actifs, utilisés en quantités thérapeutiquement efficaces, sont mélangés avec les véhicules pharmaceutiquement acceptables pour le mode d'administration choisi. Ces véhicules peuvent être solides ou liquides.

Ainsi pour une administration par voie orale, les médicaments préparés sous forme de gélules, comprimés, dragées, capsules, pilules, gouttes, sirops et analogues. De tels médicaments peuvent renfermer de 1 à 100 mg de principe actif par unité.

Pour l'administration par voie injectable (intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire), les médicaments se présentent sous forme de solutions stériles ou stérilisables.

Ils peuvent être également sous forme d'émulsions ou de suspensions.

Les médicaments de l'invention sont plus particulièrement administrés sous forme d'aérosols.

Les doses par unité de prise peuvent varier de 1 à 50 mg de principe actif. La posologie quotidienne est choisie de manière à obtenir une concentration finale d'au plus 100  $\mu$ M en dérivé de pyrrolo-pyrazines dans le sang du patient traité.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention seront donnés dans les résultats rapportés ci-après afin d'illustrer l'invention.

Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 à 7 qui représentent, respectivement :

- les figures 1A à 1C, la formule de l'aloïsine A, l'activation du canal chlorure CFTR par l'aloïsine A sur des cellules CHO (fig.1B) et sur des cellules épithéliales pulmonaires humaines Calu-3 (fig.1C) ;

- le figures 2A et 2B, l'activation par l'aloïsine A de la protéine G551D-CFTR dans les cellules CHO (fig.2A) et la protéine delF508 dans les cellules épithéliales humaines pulmonaires de lignée CF15 (fig.2B) ;

- les figures 3A et 3B, l' $EC_{50}$  de l'aloïsine A à 50 $\mu$ M (fig.3A) et l'effet d'inhibiteurs de CFTR sur l'activité de delF508 après traitement par l'aloïsine A ;

5 - la figure 4, la localisation de delF508 chez des patients CF et son re-adressage vers la membrane après traitement par l'aloïsine A ;

10 - les figures 5A et 5B, les tests de toxicité de l'aloïsine A sur des cellules CHO-WT après incubation de 2 h (fig. 5A) et de 24 h (fig.5B),

- les figures 6A à 6C, l'immunolocalisation de delF508-CFTR après 2 h de traitement avec l'aloïsine A,

15 - la figure 7, l'activation de delF508-CFTR dans les cellules CF15 après traitement avec l'aloïsine A.

#### MATERIEL ET METHODES

##### *M1. Culture cellulaire*

20 Cellules CHO-WT : Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) sont des fibroblastes qui ont été transfectés avec le gène du CFTR sauvage (CFTR-WT). Ces cellules vont donc surexprimer la protéine CFTR.

25 Milieu de culture : Milieu MEM alpha (GIBCO) + 7 % de sérum de veau fœtal + 0,5 % de pénicilline/streptomycine + 100  $\mu$ M de méthotrexate (améthoptérine, Sigma).

Cellules CF15 : Les cellules CF15 sont des cellules épithéliales humaines d'origine nasale qui expriment le gène  $\Delta$ F508-CFTR.

30 Milieu de culture : Milieu DMEM + HAM F12 + 10 % de FCS + 0,6 % de pénicilline/streptomycine + facteurs de croissance (insuline 5  $\mu$ g/ml, transferrine 5  $\mu$ g/ml, épinéphrine 5,5  $\mu$ M, adénine 0,18 mM, EGF 10 ng/ml, T3 2 nM, hydrocortisone 1,1  $\mu$ M).

35 Cellules Calu-3 : Les cellules Calu-3 sont des cellules épithéliales humaines d'origine pulmonaire qui expriment le gène du CFTR sauvage.

Milieu de culture : Milieu DMEM/F12 avec glutamax + 7 % de sérum de veau fœtal + 1 % de pénicilline/streptomycine.

### M2. Immunomarquage

L'immunomarquage permet de visualiser la localisation cellulaire de la protéine CFTR grâce à un anticorps (Ac) primaire anti-CFTR, puis un anticorps secondaire anti-anticorps primaire marqué au fluorophore Cy3.

Les cellules sont préalablement ensemencées sur des lamelles dans du milieu de culture approprié. 3 lavages au TBS (NaCl : 157 mM, Tris base : 20  $\mu$ M, pH 7,4) de 5 min chacun sont effectués. Les cellules sont alors fixées par ajout de TBS-paraformaldéhyde (3 %) pendant 20 min. Après 3 lavages au TBS (5 min), les cellules sont incubées avec du TBS-triton 0,1 % (10 min) qui permet la formation de trous dans la membrane cellulaire, puis 3 lavages au TBS sont à nouveau effectués avant la mise en présence des cellules avec le TBS-BSA 0,5 %-saponine 0,05 % pendant 1 h. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire anti-C terminal CFTR (2  $\mu$ g/ml) pendant 1 h. 3 lavages au TBS-BSA-saponine de 5 min chacun sont réalisés avant l'incubation avec l'anticorps secondaire GAM-cy3 (1/400) pendant 1 h. Suite à 2 lavages au TBS de 5 min, les noyaux sont marqués par incubation au Topro3 (1/1000) pendant 5 min. Enfin, les lamelles peuvent être montées sur lame après 3 derniers lavages au TBS de 5 min. Les lames sont observées au microscope confocal (Bio-Rad) grâce à une excitation au laser aux longueurs d'onde appropriées. Afin de différencier le marquage entre Cy3 et Topro3 la couleur de fluorescence de Topro3 a été changée en bleu (couleur des noyaux).

### M3. Efflux de radiotraceurs

Les mesures de transport d'ions chlorure dans les cellules ont été réalisées à l'aide de la technique des efflux d'iodure radioactif (Becq et al., 1999 ; Dormer et al., 2001). Le traceur ( $^{125}$ I) est incorporé dans le milieu intracellulaire. Puis, la quantité de radiotraceur qui sort de la cellule est comptée après l'ajout de différents agents pharmacologiques. L'iodure est utilisé comme un traceur du transport d'ions chlorure.  $^{125}$ I a de plus l'avantage d'avoir une courte durée de vie comparée à celle d'autres marqueurs comme  $^{35}$ Cl (1/2 vie respective : 30 jours et 300 000 ans).

Les cellules sont mises en culture sur des plaques 24 puits dans un milieu adéquat. 2 rinçages avec du milieu d'efflux (NaCl : 136,6 mM, KCl : 5,4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,3 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,3 mM, NaHCO<sub>3</sub> : 4,2 mM, CaCl<sub>2</sub> : 1,3 mM, MgCl<sub>2</sub> : 0,5 mM, MgSO<sub>4</sub> : 0,4 mM, HEPES : 10 mM, D-glucose : 5,6 mM) sont effectués afin d'éliminer les cellules mortes qui relarguent la radioactivité de façon anarchique. Puis, les cellules sont mises à incuber avec 500 µl de charge (1 µCi/ml de <sup>125</sup>I Na) pendant 30 min pour les CHO-WT ou 1 h pour les CF15 et Calu-3. L'iodure s'équilibre de part et d'autre de la membrane cellulaire. Le robot (MultiPROBE, Packard) réalise les étapes suivantes : le milieu de charge est rincé avec du milieu d'efflux pour éliminer la radioactivité extracellulaire. Le surnageant est collecté toutes les minutes dans des tubes à hémolyse et le milieu est remplacé par un volume équivalent (500 µl). Les prélèvements des 3 premières minutes ne subissent pas l'addition de drogue, ils permettent d'obtenir une ligne de base stable, caractérisant la sortie passive des ions I. Les 7 prélèvements suivants sont obtenus en présence de la molécule à tester. A la fin de l'expérience, les cellules sont lysées par ajout de 500 µl de NaOH (0,1 N)/0,1 % SDS (30 min), ainsi, la radioactivité restée à l'intérieur de la cellule peut être déterminée. La radioactivité présente dans les tubes à hémolyse est comptée en coups par minute (cpm) grâce à un compteur gamma (Cobra II, Packard). Les résultats en cpm sont exprimés sous forme de vitesse de sortie d'iodure radioactif (R) d'après la formule suivante :  $R \text{ (min}^{-1}\text{)} = [\text{In}({}^{125}\text{I } t_1) - \text{In}({}^{125}\text{I } t_2)] / (t_1 - t_2)$  avec <sup>125</sup>I t<sub>1</sub> : cpm au temps t<sub>1</sub> ; <sup>125</sup>I t<sub>2</sub> : cpm au temps t<sub>2</sub>. Ce flux d'iodure est représenté sous forme de courbe. Afin de quantifier la sortie d'iodure due à l'administration de la molécule testée, on calcule le flux relatif suivant qui permet de s'affranchir du flux de base : Vitesse relative (min<sup>-1</sup>) = R<sub>pic</sub> - R<sub>basal</sub>. Enfin, ces résultats sont normalisés pour pouvoir comparer l'effet des différentes drogues entre elles. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne +/- SEM. Le test statistique de Student est utilisé pour comparer l'effet des drogues aux contrôles (les valeurs correspondantes à P < 0,01 sont

considérées comme statistiquement significatives).

#### **M4. Test de cytotoxicité**

Le test de toxicité au MTT est un test colorimétrique qui repose sur la capacité des déshydrogénases mitochondriales à métaboliser le MTT (sel de tétrazolium jaune) en formazan (pourpre). L'absorbance, proportionnelle à la concentration de colorant converti, peut être alors mesurée par spectrophotométrie. Les cellules sont mises à incuber sur des plaques 96 puits en présence de l'agent à tester pendant 2 h. 3 contrôles sont réalisés : 100 % cellules vivantes : cellules sans agent ; 0 % cellules vivantes : cellules laissées à l'air libre ; blanc : milieu sans cellule. Les cellules sont rincées avec du milieu RPMI sans rouge de phénol pour que la couleur du milieu n'interfère pas dans les mesures de l'absorbance. Puis, elles sont incubées pendant 4 h avec 100 µl de solution de RPMI supplémentée en MTT (0,5 mg/ml). Le milieu est alors éliminé, l'ajout de 100 µl de DMSO permet de solubiliser le colorant converti (formazan). L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 570 nm (pourpre) ; 630 nm (bruit de fond). Afin de s'affranchir du bruit de fond, le calcul suivant est effectué :  $DO_{réelle} = DO_{570nm} - DO_{630nm}$ . Puis, les résultats sont normalisés par rapport aux contrôles (100 % et 0 % de cellules vivantes) et sont présentés sous forme de moyenne +/- SEM.

#### **RESULTATS**

##### ***R1. L'aloïsine A active CFTR sauvage (wt), G551D et delF508***

Une première série d'expérimentations montre que l'aloïsine A est capable d'activer le canal chlorure CFTR dans les cellules CHO ( $EC_{50} = 152,1$  nM, figure 1A) et dans les cellules épithéliales pulmonaires humaines de lignée Calu-3 ( $EC_{50} = 140,1$  nM, figure 1B).

Deux formes mutées de CFTR ont été également testées. Il s'agit du mutant G551D et de delF508. La figure 2 montre que l'aloïsine A active la protéine G551D-CFTR dans la cellule CHO ( $EC_{50} = 1,5$  nM, figure 2A) et la protéine delF508 ( $EC_{50} = 110$  nM, figure 2B) dans les cellules épithéliales humaines pulmonaires de lignée CF15. après incubation des cellules à

27°C (une procédure qui permet de relocaliser la protéine delF508 vers la membrane).

Ces résultats démontrent que cette molécule est un activateur de CFTR sauvage, G551D et delF508.

5 **R2. Effet de l'aloïsine A sur l'adressage de delF508 dans les cellules CF15**

L'étude de l'adressage de la protéine delF508-CFTR a été réalisée en combinant des approches de pharmacologie, d'imagerie cellulaire, des tests biochimiques et électrophysiologiques sur des cellules CF15 épithéliales humaines pulmonaires homozygotes pour la délétion delF508.

Pour chaque expérience, l'addition d'un cocktail (Forskoline 10  $\mu$ M + Génistéine 30  $\mu$ M) permet l'activation du CFTR quand celui-ci est fixé à la membrane. Ainsi, un efflux d'iodure pourra être observé si l'adressage de delF508 a été restauré.

Les résultats, présentés sous forme d'histogramme ont été normalisés par rapport à un traitement de référence (traitement des cellules au MPB-91 250  $\mu$ M pendant 2 h) pour lequel on considère qu'on a 100 % d'activité CFTR.

La figure 3A montre qu'après un traitement de 2 h avec 100  $\mu$ M d'aloïsine A l'activité delF508-CFTR est restaurée.

Ces résultats démontrent ainsi que le traitement par l'aloïsine A des cellules CF15 pendant 2 h à 37°C restaure un adressage de la protéine delF508 et permet à celle-ci de fonctionner en tant que transporteur ionique.

En l'absence de traitement des cellules, la protéine delF508 n'est pas membranaire et il n'y a pas d'efflux d'iodure stimulé par le cocktail (Forskoline 10  $\mu$ M, Génistéine 30  $\mu$ M). L'EC<sub>50</sub> (concentration de la molécule qui donne 50 % de l'efficacité maximale) de l'aloïsine A a été déterminé à 50  $\mu$ M (figure 3A, n=4, pour chaque condition). Pour préciser l'effet observé des inhibiteurs connus de CFTR sur l'activité de delF508 ont été testés après traitement par l'aloïsine A. Les résultats présentés figure 3B montrent que ce transport est bloqué par le glibenclamide et le DPC mais insensible au DIDS et au calixarène. Ce profil pharmacologique correspond à celui de CFTR.

Chez les patients CF, la protéine delF508 est absente des membranes plasmiques du fait d'un mauvais adressage de la protéine qui est retenue dans le réticulum endoplasmique (RE). Par imagerie cellulaire dans les cellules CF15, delF508 est effectivement localisée dans des compartiments intracellulaires (figure 4). En revanche le traitement avec 100  $\mu$ M d'aloïsine A permet de rediriger la protéine delF508 vers la membrane comme le présente la figure 4.

L'immunolocalisation de delF508-CFTR dans des cellules CF15 est également représentée sur les figures 6A à 6C qui montrent respectivement, la figure 6A : la visualisation confocale de CFTR-delF508 dans des cellules CF15 avec un anticorps monoclonal anti-CFTR de souris ; la figure 6B : les cellules CF15 traitées 24 h à 27°C, utilisées comme témoin positif ; la figure 6C : les cellules CF15 traitées 2 h avec de l'aloïsine A (100 $\mu$ M).

Sur la figure 7, on a représenté l'activation de delF508-CFTR dans les cellules CF15 après traitement avec l'aloïsine A.

Les efflux d'iode ont été observés après 2 h d'incubation avec ces composés ou en l'absence de traitement.

Les cellules CF15 ayant subi un traitement 24 h à 27°C ont été utilisées comme contrôle positif et les cellules CF15 non traitées comme contrôle négatif (37°C).

Le tableau ci-dessous donne un résumé d'expériences de compétition réalisées par la technique d'efflux d'iode entre l'aloïsine A et la machinerie de la chaperone du RE.

	BFA 20 $\mu$ M	Tunicamycine 10 $\mu$ M	Swainsonine 100 $\mu$ M	Castanospermine 100 $\mu$ g/l	Thapsigargin 10 $\mu$ M	MG132 20 $\mu$ M	Geldanamycine 2.5 $\mu$ g/ml
Potentialisation de l'effet de l'aloïsine A		***	***	***	***	***	***
		Inhibiteurs de glycosylation		Inhibiteurs de calnexine		voie de dégradation des inhibiteurs	

- inhibition, \*\*P < 0.01 (Student's t-test)

On observe une inhibition de l'effet de l'aloïsine A par

la Brefeldine A (BFA), inhibiteur du trafic vésiculaire ERGIC, ce qui montre que l'aloïsine A induit un réadressage de la protéine delF508-CFTR.

### R3. Cytotoxicité de l'aloïsine A

5 Dans le but de tester la cytotoxicité de l'aloïsine A, des cellules CHO-WT ont été incubées 2 h (figure 5A) ou 24 h (figure 5B) avec différentes concentrations d'aloïsine A avant de subir le test de viabilité cellulaire au MTT. Les résultats  
10 montrent que les cellules sont viables pour toutes les concentrations. Cette molécule ne présente donc pas de cytotoxicité cellulaire.

Des expériences menées en efflux d'iode, en patch clamp ainsi qu'en chambre de Ussing ont montré que l'aloïsine A était un activateur des protéine CFTR sauvage et mutées  
15 (F508del, G551D, G1349D). Cette molécule affine présente des EC<sub>50</sub> variant de 1.5 à 303 nM suivant le mutant testé.

De plus, les expériences effectuées ont démontrés qu'un traitement des cellules CF15 (F508del/F508del) par l'aloïsine A permettait le réadressage de la protéine mutée F508del CFTR  
20 à la membrane.

Des expériences d'efflux d'iode ont montré que l'aloïsine A permet le réadressage de la protéine F508del-CFTR après 2 h de traitement avec une EC<sub>50</sub> de 49µM.

Ces résultats démontrent que l'aloïsine A est un activateur de  
25 CFTR à faible concentration mais que cette molécule peut aussi agir aussi comme chaperonne pharmacologique à forte concentration.

De plus, des études de toxicité de l'aloïsine A, réalisées chez l'animal, ont révélé une toxicité très faible.

30 Les résultats ci-dessus ont été également vérifiés avec d'autres dérivés de pyrrolo-pyrazines.

Exemple de formulation

On prépare une solution pour inhalation avec un nébuliseur ampoule à partir de chlorure de sodium, de chlorure de calcium déshydraté et d'eau pour préparations injectables.

L'aloïsine A est ajoutée comme ingrédient actif.

La solution est formulée dans des ampoules de 2,5ml.

Des ampoules renfermant 5, 10 mg ou 20 mg l'aloïsine sont ainsi préparées.

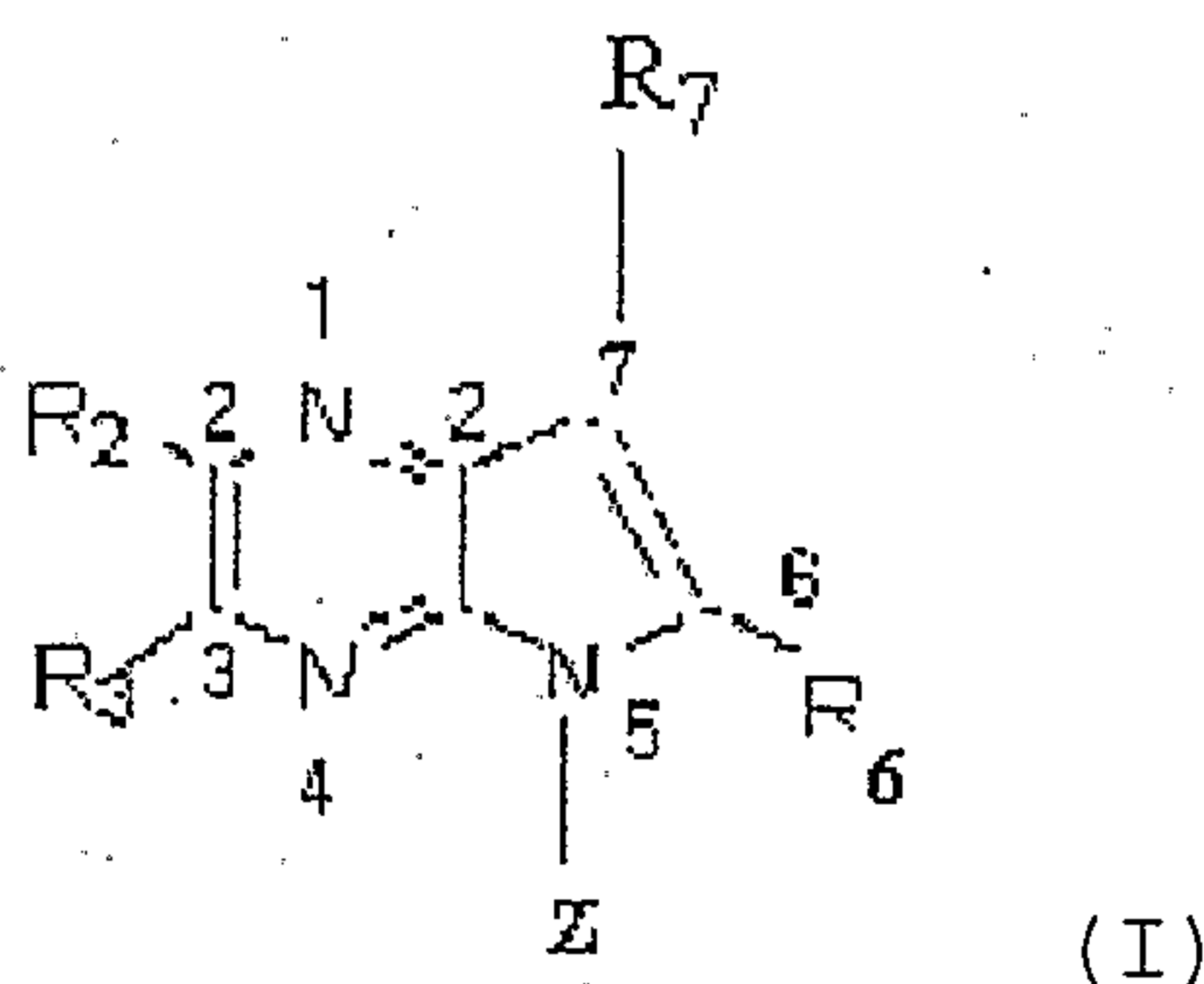
BIBLIOGRAPHIE

BECQ et al. (1999) Journal of Biological Chemistry 274,  
27415-27425.

10 DORMER et al. (2001) Journal of Cell Science 114, 4073-  
4081.

REVENDICATIONS

1/ Utilisation de dérivés de pyrrolo-pyrazines pour  
 5 fabriquer des médicaments pour le traitement de la  
 mucoviscidose et de maladies liées à un défaut d'adressage des  
 protéines dans les cellules, ces dérivés répondant à la  
 formule (I):



10

dans laquelle

- R2 et R3 sont identiques ou différents et  
 représentent H, C1-C6 alkyl, ledit alkyl étant une chaîne  
 alkyle droite ou ramifiée, le cas échéant substituée,

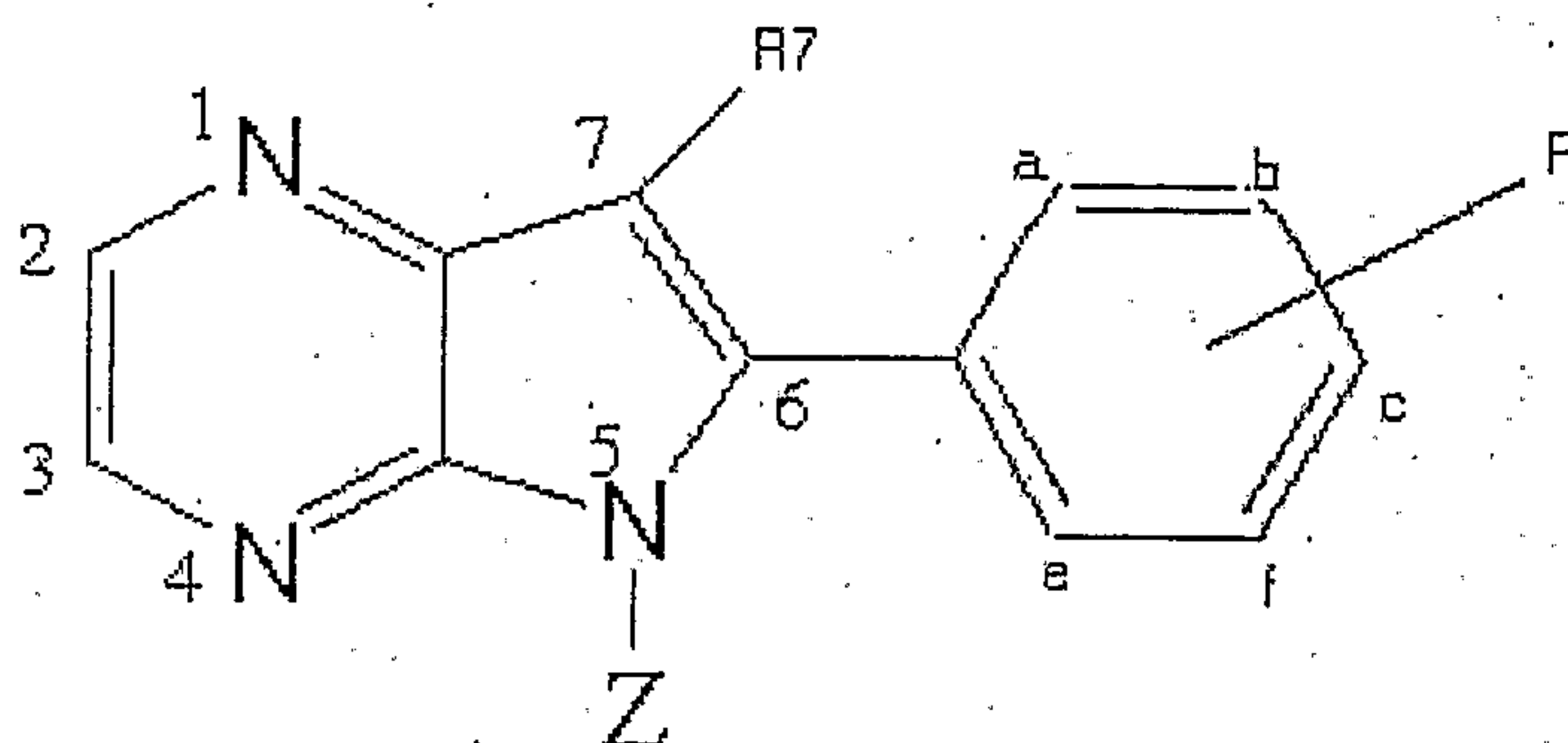
15 - R6 est un cycle aromatique Ar ou un cycloalkyle, le  
 cas échéant substitué, ledit cycloalkyle étant le cas échéant  
 substitué par un groupe aryle qui peut être également  
 substitué,

20 - R7 est H, C1-C6 alkyl, (alk.)<sub>n</sub>-hal., CH<sub>2</sub>-CH = CH<sub>2</sub>,  
 CH<sub>2</sub>-cycloalkyl, CH<sub>2</sub>-Ar,

- Z est H ou CH<sub>3</sub>.

2/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en  
 ce que R2 et R3, et/ou Z et/ou R7 sont différents de H.

3/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en  
 25 ce que lesdits dérivés de pyrrolo-pyrazines présentent la  
 formule (II):



(II)

dans laquelle

- le groupe phényl en position 6 est substitué par un, deux ou trois substituants R choisis dans le groupe comprenant :

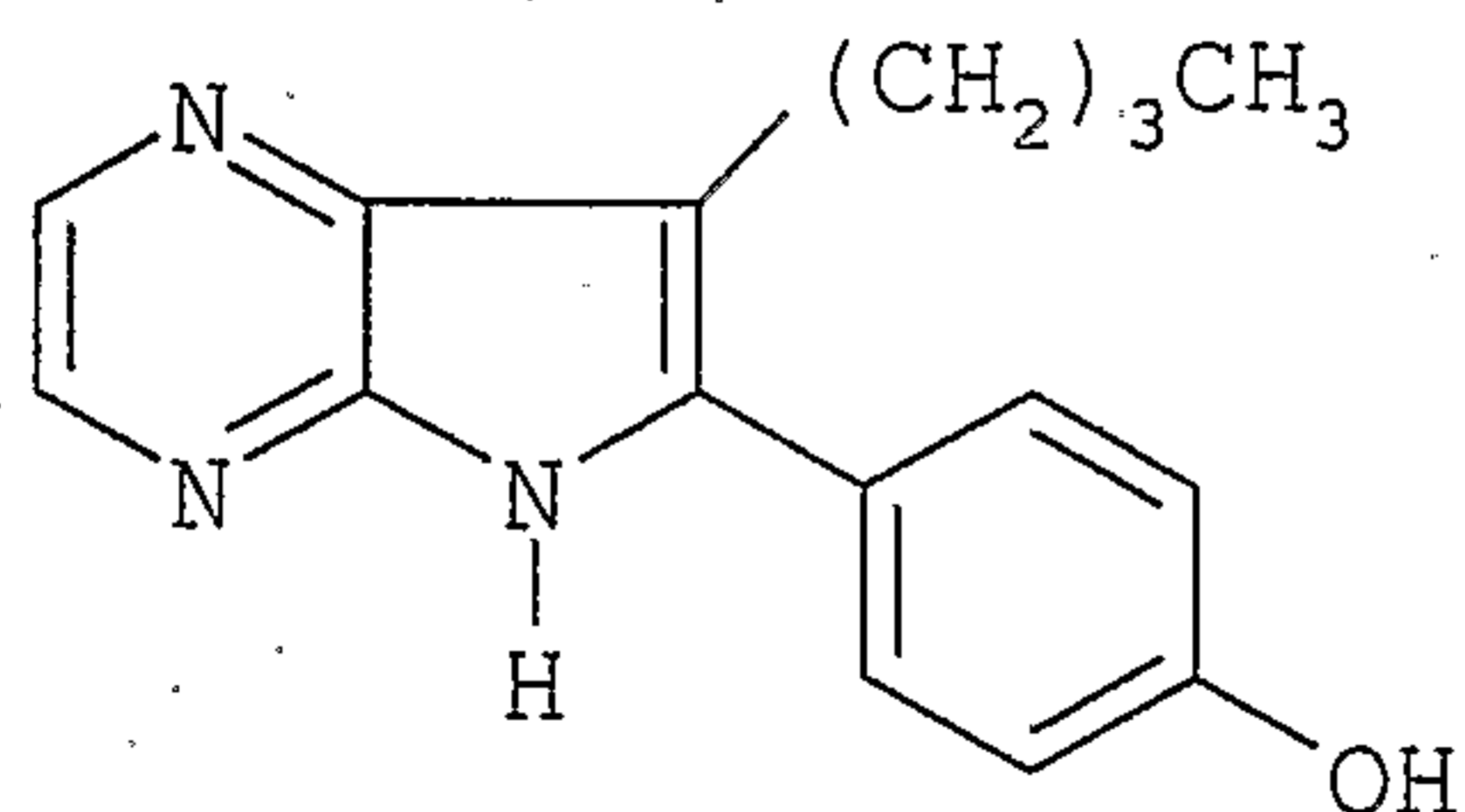
- H, -OH, alkyl, -O alkyl, hal., -NH<sub>2</sub>, -N(H,alkyl), -N(alkyl)<sub>2</sub>, -O-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -O-SO<sub>2</sub>-N(H, alkyl), -O-SO<sub>2</sub>-N(alkyl)<sub>2</sub>, -COOH, -COO-alkyl, CONH<sub>2</sub>, -CON(H,alkyl), -CON(alkyl)<sub>2</sub>,

- R<sub>7</sub> est H, alkyl, (alk.)<sub>n</sub> hal., -CH<sub>2</sub>-CH = CH<sub>2</sub>, (alk.)<sub>n</sub>-cycloalkyl, alk.-Ar, et

- Z est H ou CH<sub>3</sub>.

4/ Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que Z et/ou R<sub>7</sub> sont différents de H.

5/ Utilisation de l'aloisine A de formule (III)



RM39 (Aloisine A)

pour fabriquer des médicaments pour le traitement de la mucoviscidose.

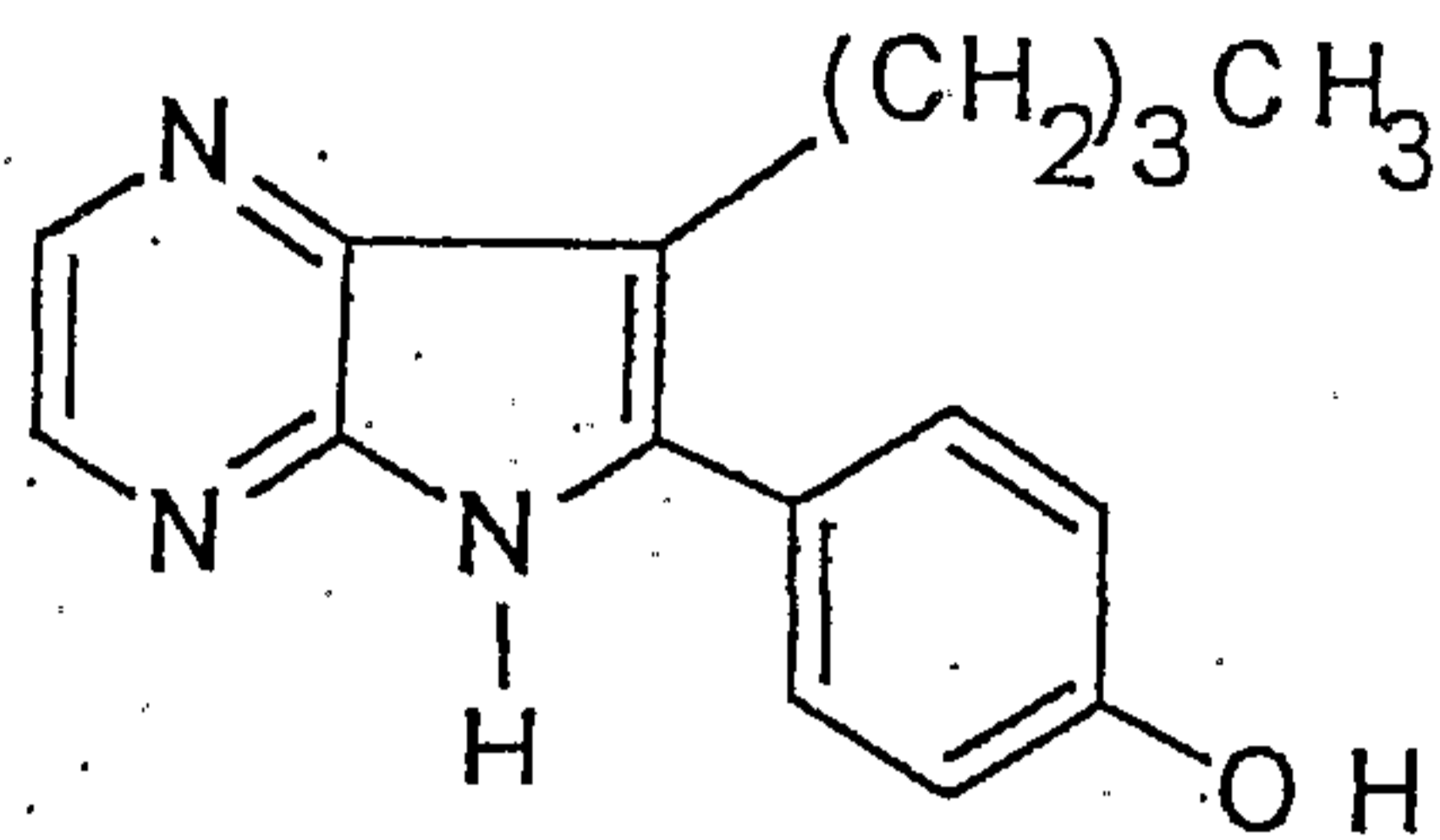
6/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les médicaments sont préparés pour une administration sous formes de gélules, comprimés, dragées ou capsules.

7/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les médicaments sont préparés pour une administration par voie injectable, sous forme de solution.

8/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les médicaments sont préparés pour une administration sous forme d'aérosol.

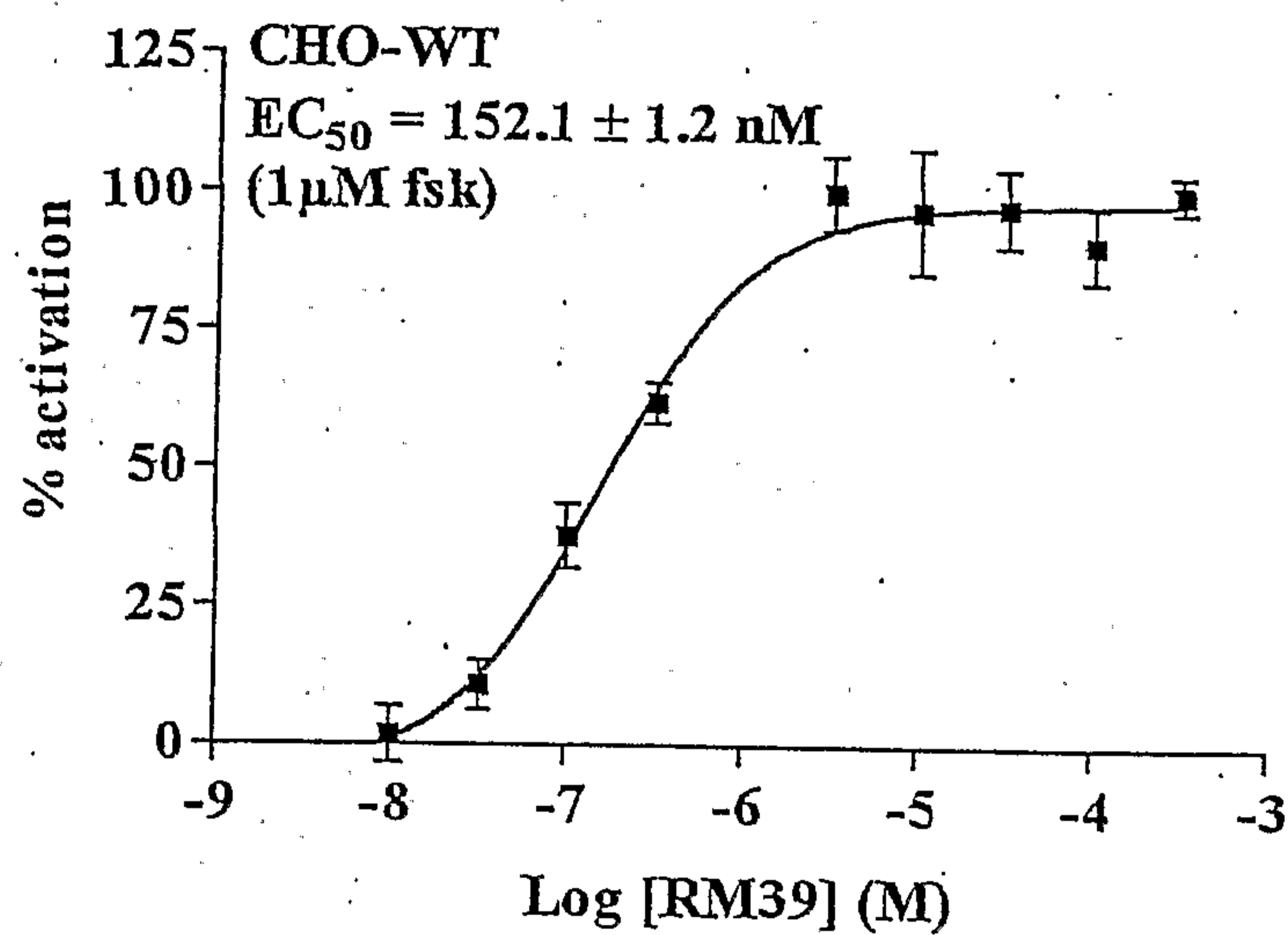
9/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour le traitement de la mucoviscidose.

A

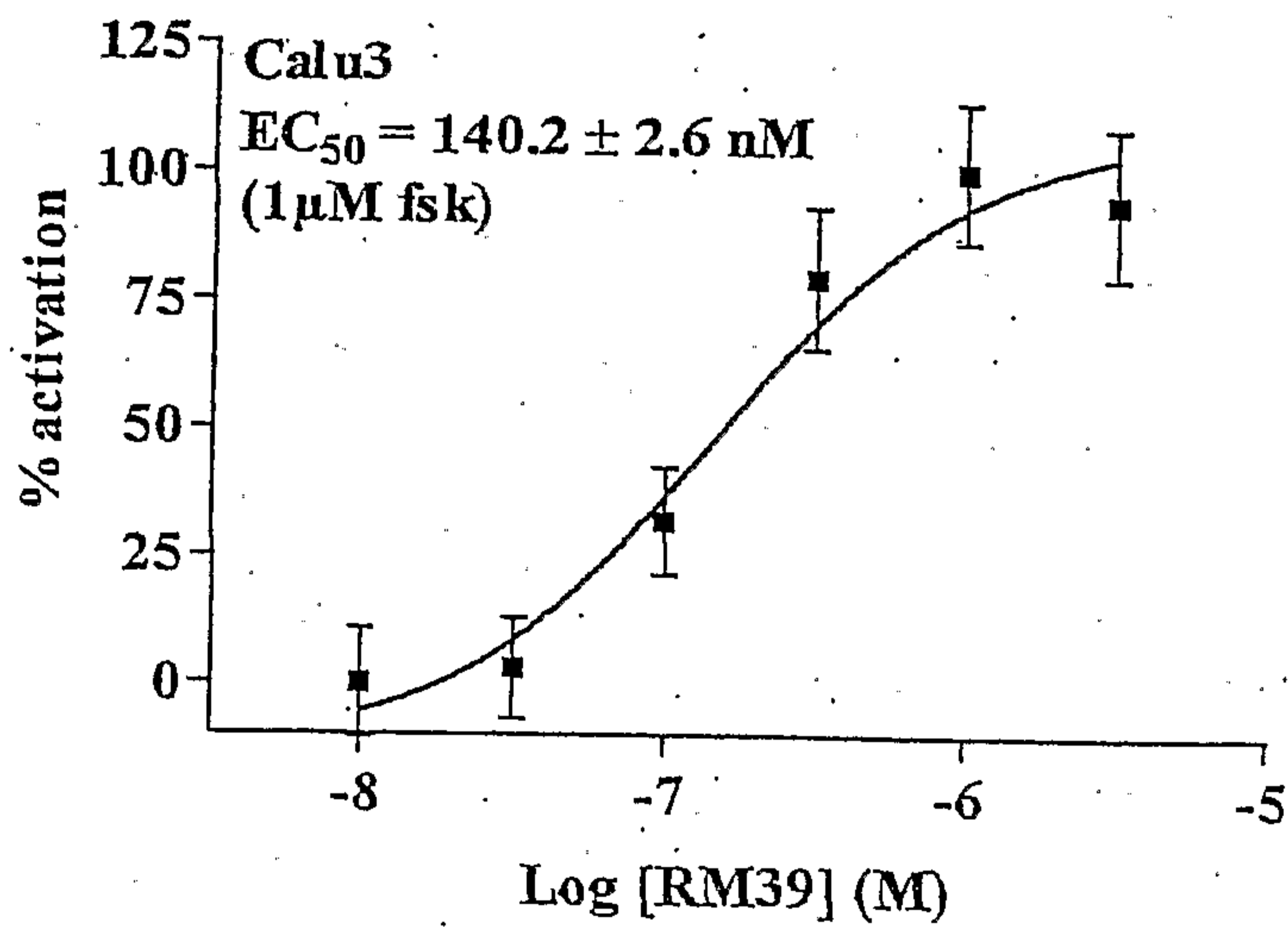


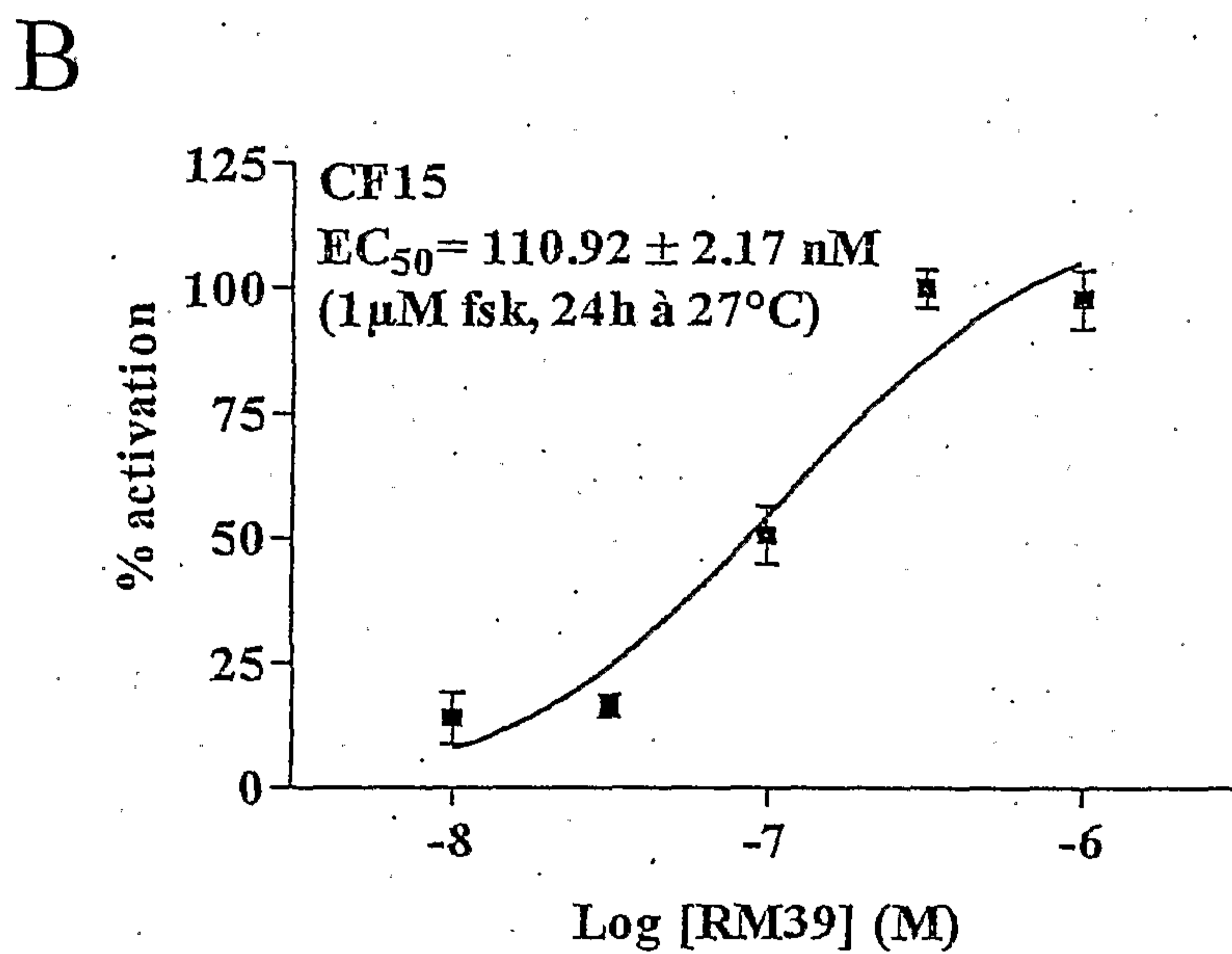
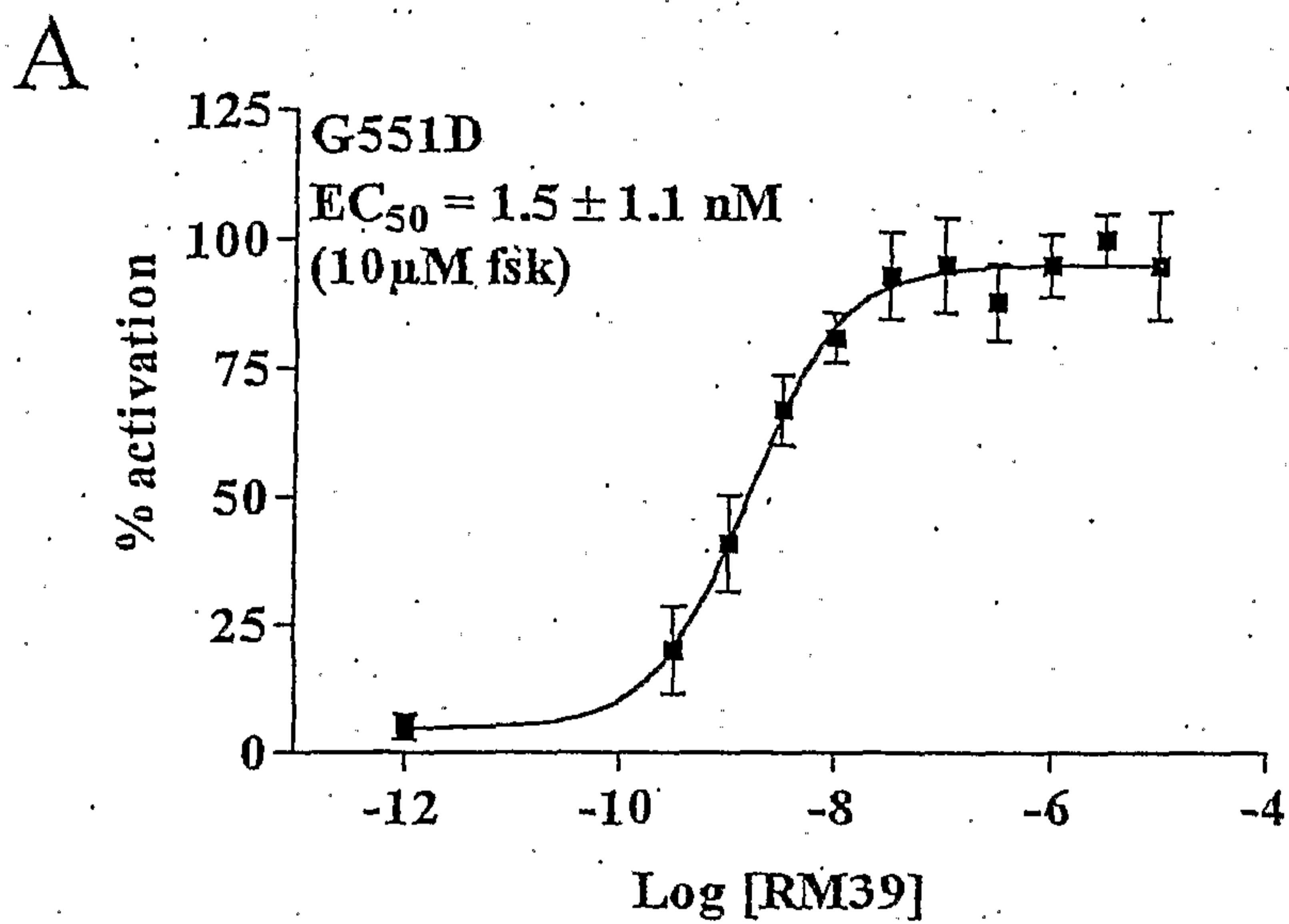
RM39 (Aloisine A)

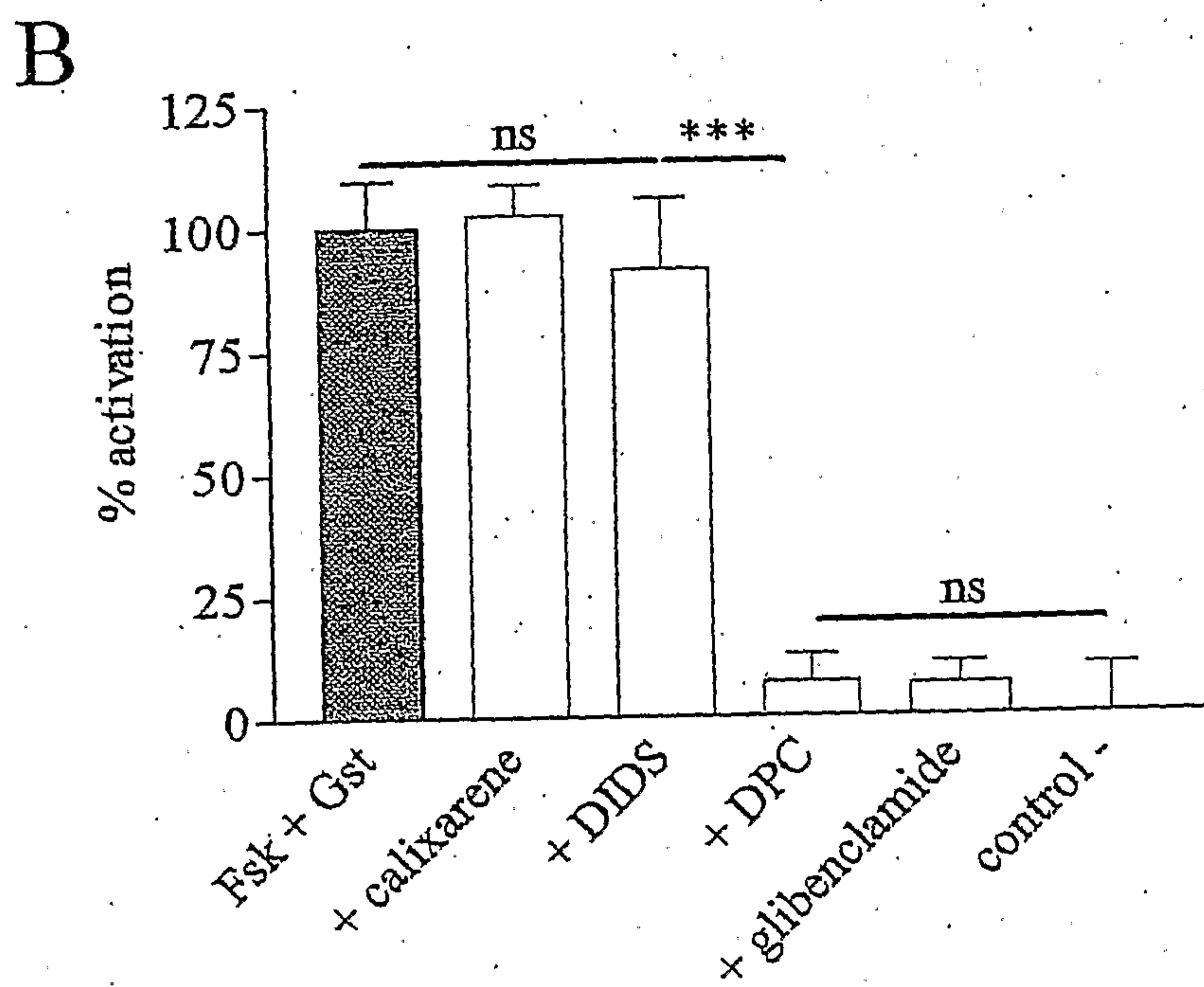
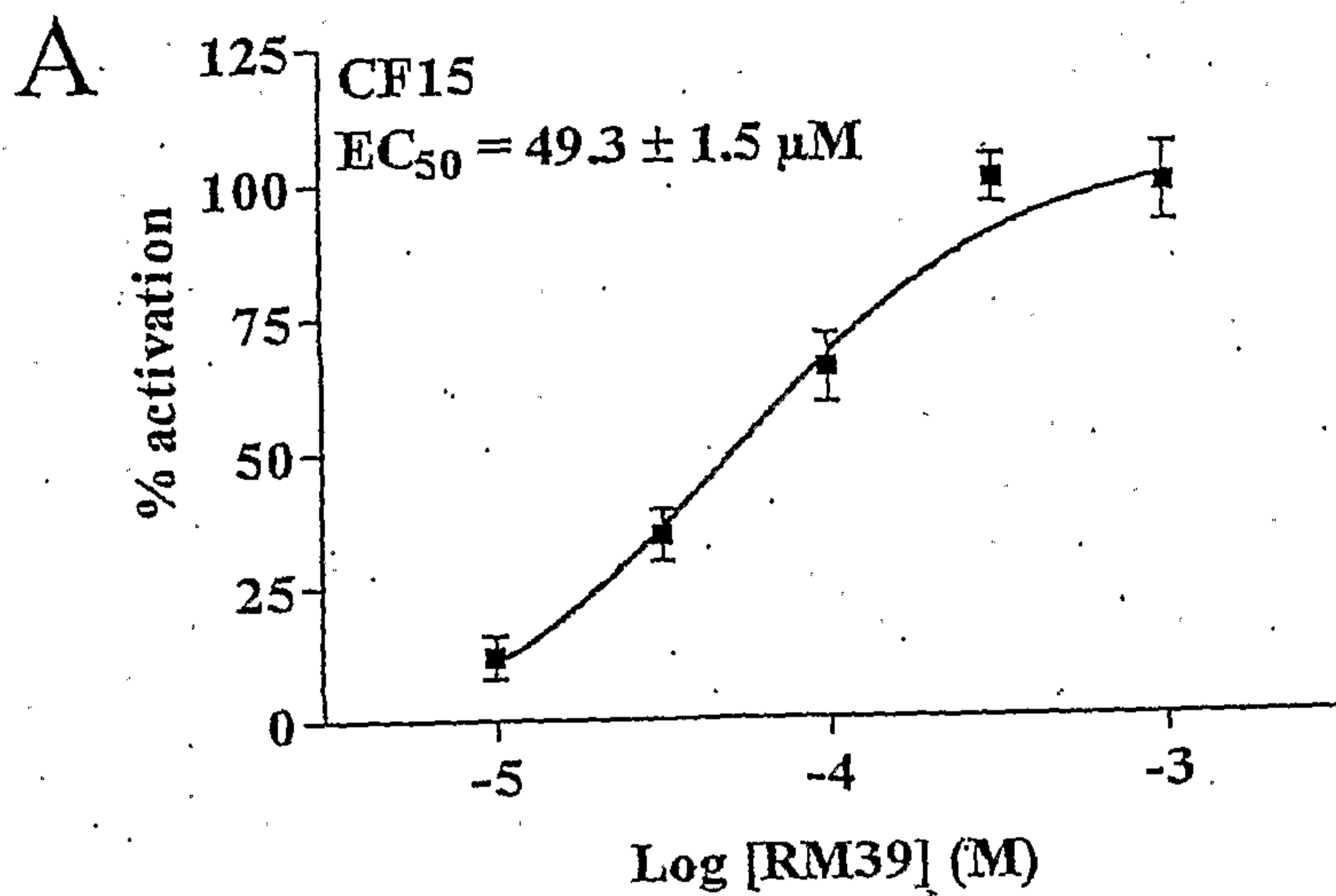
B



C



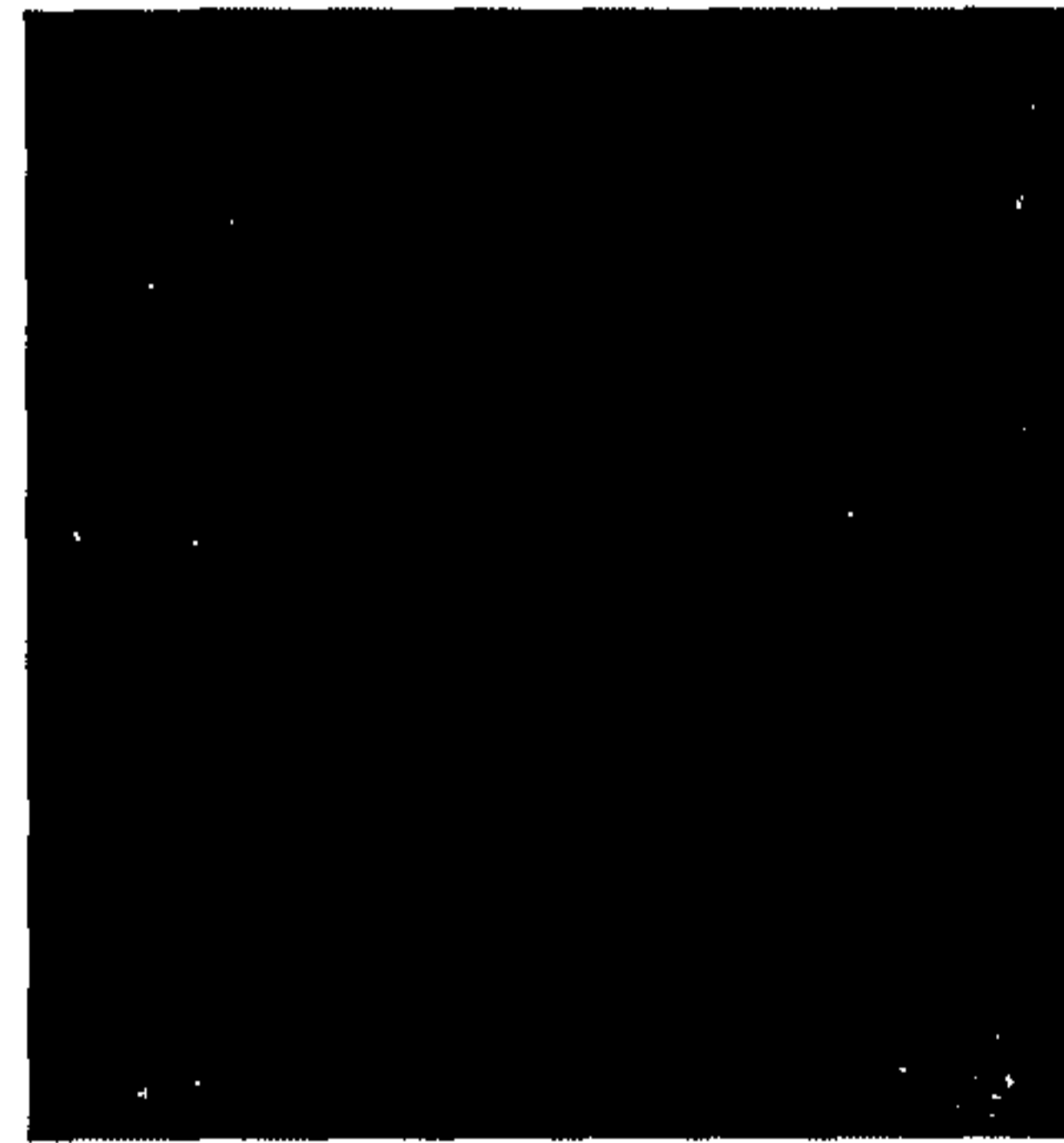




**Cellules pulmonaires humaines CF15**



**contrôle**



**+RM39 100μM**

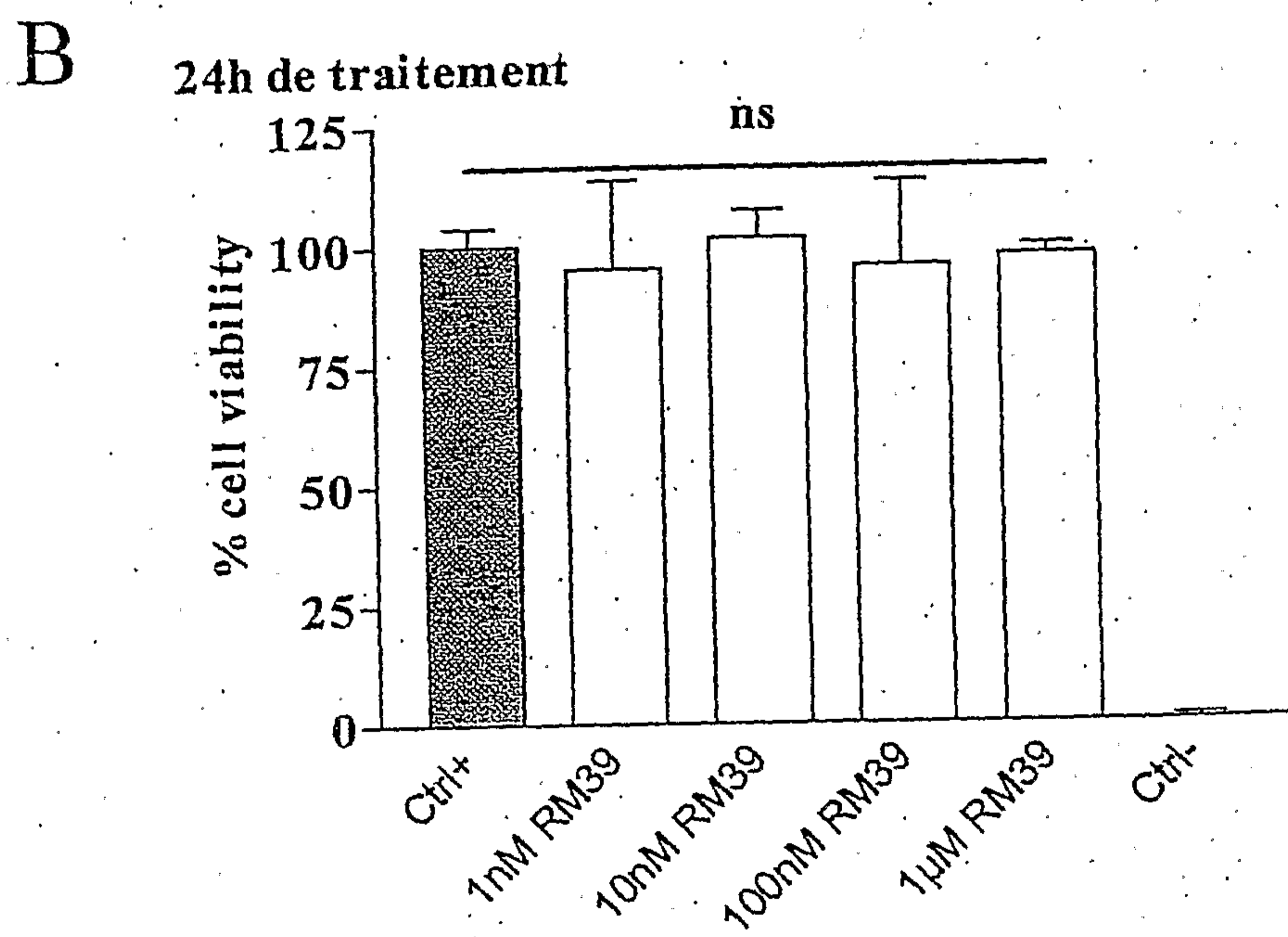
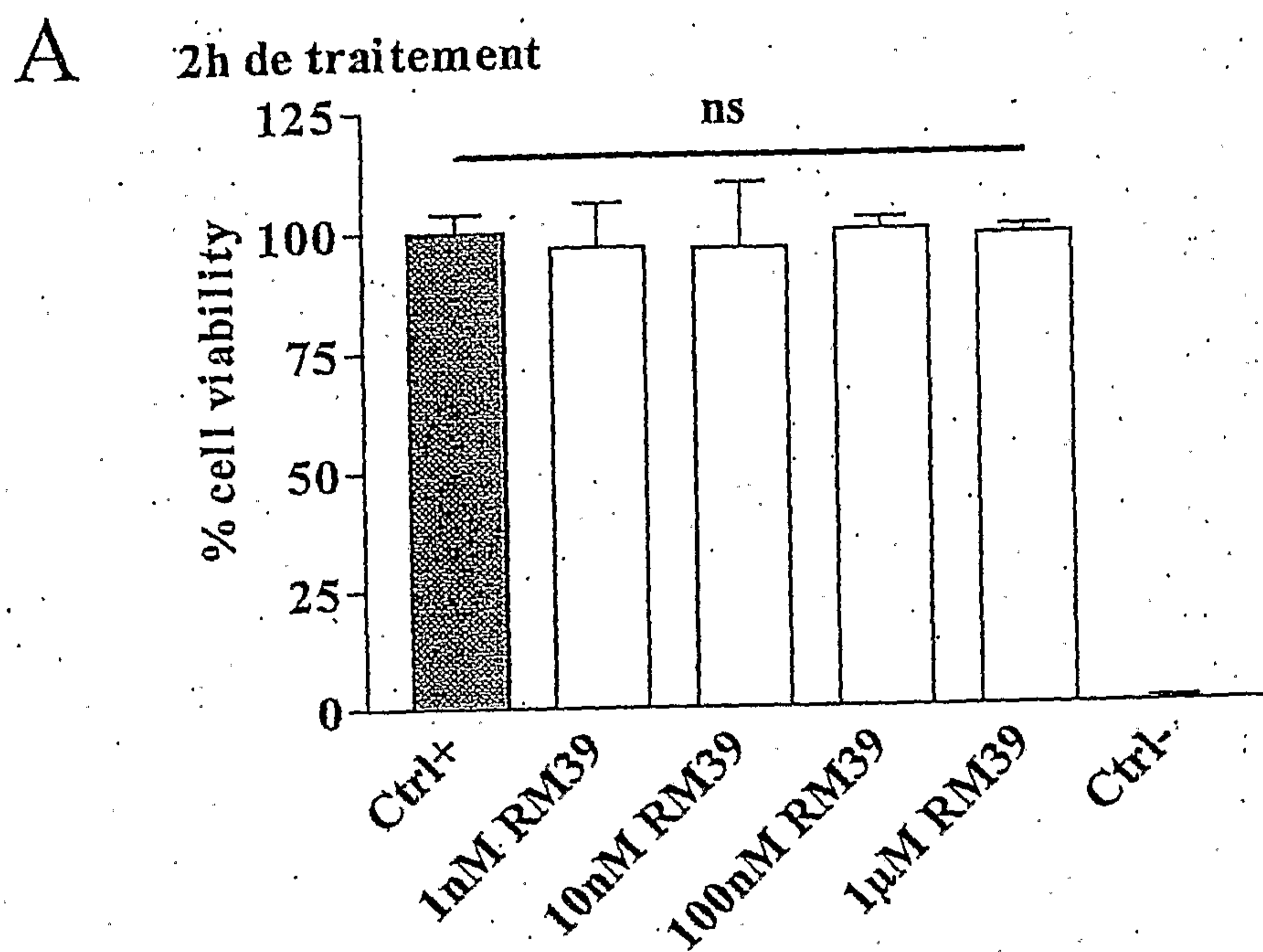


Figure 6

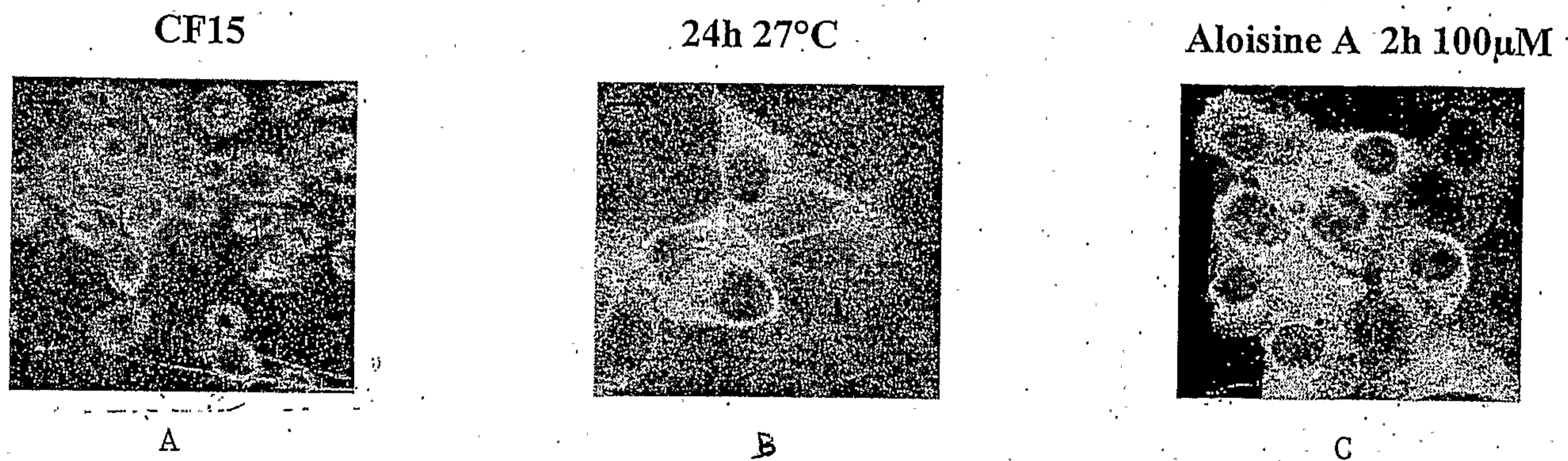
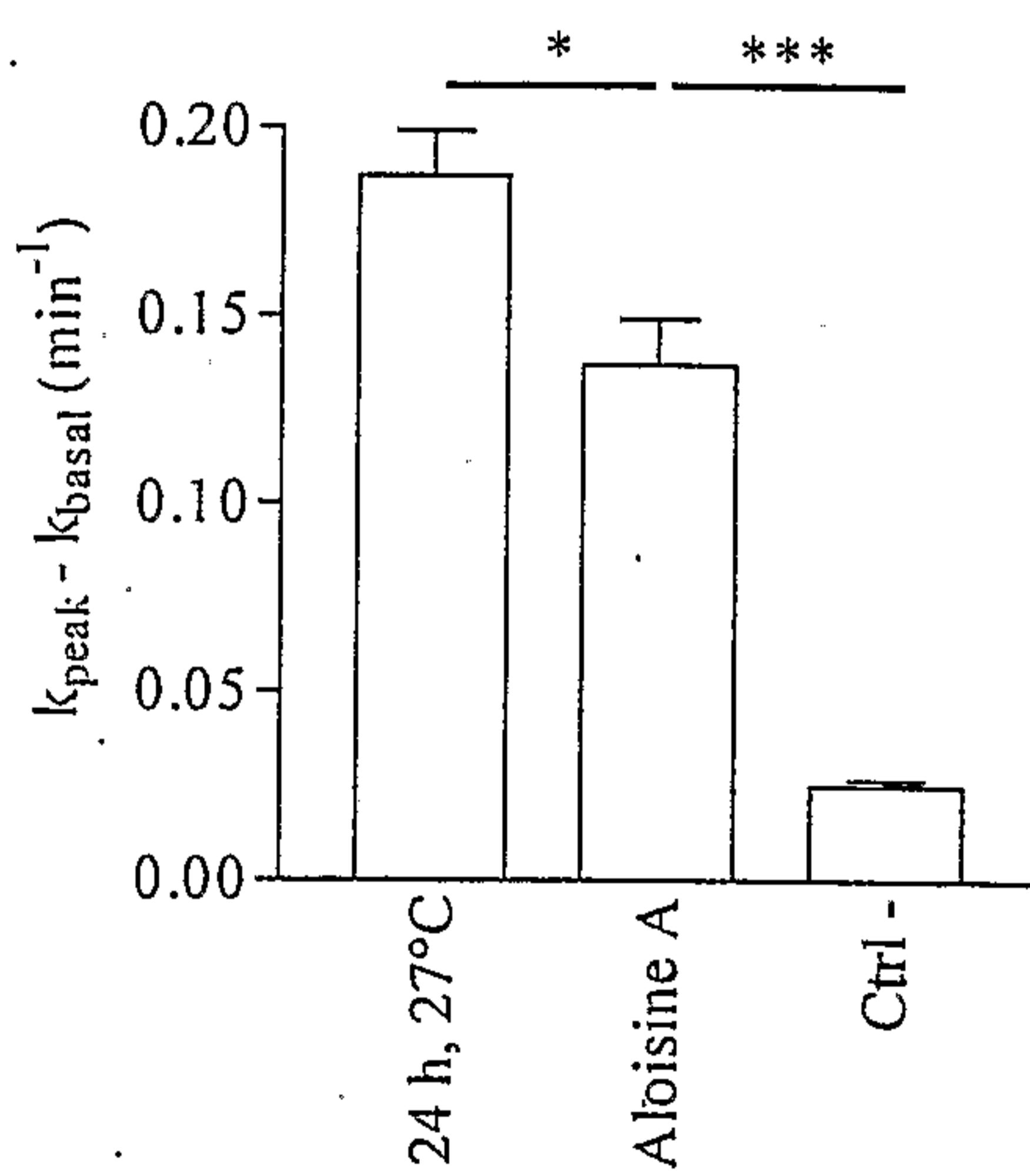
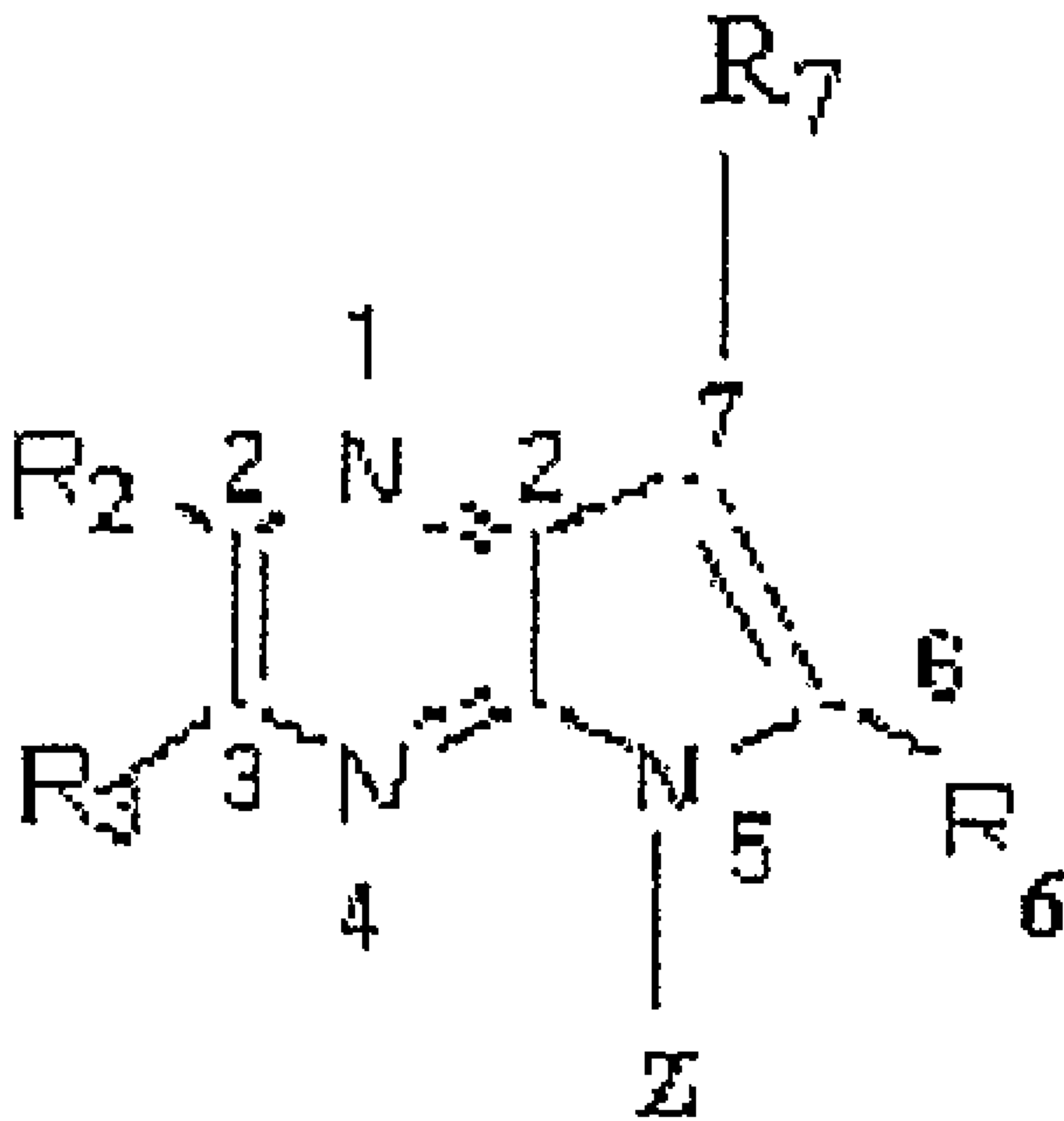


Figure 7





(I)