

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 05.02.90.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de la mise à disposition du public de la demande : 09.08.91 Bulletin 91/32.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *INSTITUT PASTEUR — FR.*

⑦② Inventeur(s) : *Fillion Gilles Marie Bernard et Rouselle Jean-Claude.*

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : *Cabinet Lavoix.*

⑤④ **Facteur endogène cérébral, procédé d'obtention et applications thérapeutiques et diagnostiques.**

⑤⑦ L'invention a pour objet un facteur endogène cérébral ou un fragment de celui-ci, agissant sur le fonctionnement sérotoninergique, qui est de nature essentiellement peptidique, a une masse moléculaire d'environ 3500 daltons, un pK d'environ 5, est thermostable, soluble dans l'acétone jusqu'à 75%, dans les alcools primaires jusqu'à 90%, dans l'eau, en milieu acide jusqu'à 1M, inactivé dans l'acétonitrile à 70% présente une réaction négative avec l'aldéhyde anisique et peut être obtenu par:

- a) extraction à partir du cortex cérébral,
- b) éventuellement filtration sur gel ayant un domaine de fractionnement compris entre 10000 et 100 daltons, et
- c) purification par chromatographie.

FR 2 657 784 - A1



La présente invention concerne un facteur endogène de nature peptidique ou un fragment de celui-ci isolé du cerveau de mammifère et capable d'interagir avec le fonctionnement du système sérotoninergique cérébral, son procédé d'obtention et ses applications à des fins thérapeutiques et de diagnostic.

Le système sérotoninergique a été mis en évidence depuis longtemps dans le cerveau; ses propriétés s'exercent au niveau périphérique et au niveau central. Au niveau central, il est impliqué dans un grand nombre de fonctions physiologiques notamment le sommeil, la thermorégulation, les comportements divers de faim, de soif, de peur, d'agression, les rythmes nictéméraux etc... Il est impliqué également dans des désordres pathologiques tels que migraine, retard mental chez l'enfant, démence sénile, dépression et impulsivité.

Les récepteurs impliqués dans le fonctionnement du système sérotoninergique correspondent à 3 Orgrandes classes : 5-HT₁, 5-HT₂ et 5-HT₃.

Parmi les récepteurs de haute affinité de type 5-HT₁, il apparaît que les récepteurs 5-HT_{1b} chez les muridés et les récepteurs 5-HT_{1d} chez l'homme, le singe, le veau, le cobaye, pourraient jouer un rôle en tant que récepteurs présynaptiques hétérologues; en d'autres termes, ces récepteurs sont localisés sur des terminaisons neuronales non sérotoninergiques et peuvent modifier le fonctionnement des terminaisons neuronales.

Depuis plusieurs années, un ensemble de résultats expérimentaux et d'observations cliniques suggère fortement la mise en jeu du système sérotoninergique dans des phénomènes directement impliqués dans la dépression ou dans des syndromes accompagnant

celle-ci (Coppen, 1974, 1988, Asberg, 1976). Parmi les divers sites sérotoninergiques impliqués, un rôle important a été suggéré pour les 5-HT₂ et les 5-HT₁ en particulier. Au cours de leur étude, les inventeurs ont montré que les récepteurs présynaptiques hétérologues de type 5-HT₁ présents sur les terminaisons cholinergiques de l'hippocampe ou du cortex sont modifiés par les antidépresseurs. Les arguments permettant de proposer l'existence d'interaction entre les antidépresseurs et les sites sérotoninergiques sont de trois types :

1.- Il a été démontré que les antidépresseurs modifient la liaison de la sérotonine sur ses sites de haute affinité 5-HT₁.

2.- Il a été montré que ces mêmes antidépresseurs modifient l'activité adénylcyclasique liée à ces sites 5-HT₁.

3.- Il a été montré en outre que les antidépresseurs antagonisent l'effet inhibiteur de la sérotonine sur la libération neuronale d'acétylcholine. Cet effet apparaît spécifique, sélectif des antidépresseurs puisqu'il n'est pas observé avec des neuroleptiques ou des benzodiazépines.

Les inventeurs ont été amenés à postuler l'existence d'un facteur endogène qui pourrait jouer le rôle des antidépresseurs en modulant l'activité sérotoninergique présynaptique et ont dans le cadre de leurs travaux isolé et purifié un facteur endogène capable de moduler l'activité sérotoninergique présynaptique de manière analogue à celle des antidépresseurs.

La présente invention a ainsi pour objet un facteur endogène cérébral ou un fragment de celui-ci agissant sur le fonctionnement sérotoninergique, qui

est de nature essentiellement peptidique, a une masse moléculaire d'environ 3500 daltons, un pK d'environ 5, est thermostable, soluble dans l'acétone jusqu'à 75%, dans les alcools primaires jusqu'à 90%, dans l'eau, en milieu acide jusqu'à 1M, inactivé dans l'acétonitrile à 70%, présente une réaction négative avec l'aldéhyde anisique et peut être obtenu par :

- a) extraction à partir du cortex cérébral,
- b) éventuellement filtration sur un gel ayant un domaine de fractionnement compris entre 10000 et 100 daltons, et
- c) purification par chromatographie.

Le facteur endogène cérébral selon l'invention est en outre caractérisé en ce qu'il présente en chromatographie sur couche mince, l'éluant étant un mélange butanol/acide acétique/H₂O : 4/1/1 un Rf égal à 0,24.

Un autre aspect de l'invention est de fournir un procédé pour l'obtention du facteur endogène cérébral selon l'invention caractérisé en ce que :

- l'on réalise une extraction à partir du cortex cérébral,
- l'on filtre éventuellement sur un gel ayant un domaine de fractionnement compris entre 10000 et 100 daltons,
- l'on purifie par chromatographie.

On décrira ci-après plus en détail l'obtention du facteur endogène cérébral selon l'invention, ses caractéristiques et ses propriétés.

30

I - Obention du facteur endogène cérébral

La purification a été entreprise à partir de cerveau de cheval et plus particulièrement à partir du cortex cérébral.

Elle peut être réalisée selon deux méthodes. La première méthode comprend les 3 étapes : extraction, filtration et chromatographies.

a) Extraction

5 Les cerveaux de chevaux ont été collectés aux abattoirs, transportés sur de la glace et disséqués au laboratoire. Le cortex cérébral était prélevé, coupé en morceaux, la masse totale étant d'environ 2 kg de tissu. Après addition d'un demi volume d'eau
10 distillée (volume/poids) le mélange était porté à ébullition pendant 5 minutes puis refroidi à 4°C. L'ensemble était homogénéisé (Virtis) et le volume complété à 2 l par de l'eau distillée et de l'acide
15 acétique glacial (concentration finale : 1 M). L'homogénat était centrifugé pendant 20 minutes à 17500 g et les surnageants collectés. Ceux-ci étaient ensuite lyophilisés pendant 18 heures environ.

Les lyophilisats obtenus étaient resuspendus dans 750 ml d'acétone à 75%. Après 10 minutes le matériel soluble était séparé par filtration sur un
20 filtre fritté conique de porosité égale à 3. L'eau et l'acétone du milieu étaient ensuite évaporées au Rotavapor; le résidu ainsi obtenu était remis en suspension dans 100 ml d'eau bidistillée, et lyophilisé.

25 b) Filtration sur gel

L'extrait acétonique précédemment obtenu était resuspendu dans 30 à 40 ml de tampon et centrifugé à 100 000 g pendant 30 minutes. Le surnageant obtenu était filtré à travers un filtre de 0,22 micromètres et conservé à -80°C en portions de 2 ml
30 jusqu'à utilisation. Le jour de l'utilisation, après décongélation, les portions étaient injectées directement dans un appareil d'HPLC de type Perkin-Elmer

série 400, équipé d'une colonne de perméation sur gel TSK-KW 40S (domaine de fractionnement correspondant à des poids moléculaires de 10 000 à 100 daltons) d'une longueur de 30 cm et d'un diamètre de 1,6 cm.

5 Les conditions de séparation chromatographique étaient les suivantes : la phase mobile était constituée par un tampon acétate d'ammonium 50 mM pH7. Le débit était de 1 ml par minute. La longueur d'onde à laquelle étaient analysées les fractions obtenues
10 était de 280 nm. Les fractions collectées correspon-
daient à une durée de 2 minutes.

Les fractions n° 16 à 20 de chaque séparation chromatographique en filtration sur gel ont été collectées et regroupées (temps d'élution correspondant environ à 32 à 40 minutes). Ces fractions ont été
15 lyophilisées (3 lyophilisations successives) et conservées à -80°C. La fraction active correspond à une masse moléculaire estimée proche de 4000 daltons.

c) Chromatographies

20 Chromatographie en phase normale.

Les divers lyophilisats obtenus par filtration sur gel étaient resuspendus dans un mélange ternaire d'injection constitué par 70% d'acétonitrile, 20% de méthanol et 10% d'eau bidistillée.

25 Des portions de 500 microlitres étaient injectées dans une colonne de Lichrosorb-Diol 7 micromètres Merck (de 250 mm x 10 mm) couplée à un appareil de type Perkin-Elmer. Les conditions de chromatographie étaient les suivantes : la phase mobile consistait en le mélange ternaire ci-dessus. Le gradient
30 d'élution était le suivant : gradient linéaire en 20 minutes permettant d'atteindre un mélange ternaire de 50% d'acétonitrile, 40% de méthanol et 10% d'eau bidistillée. Le débit était de 4 ml/min. L'observation

optique des diverses fractions était réalisée à 230 nanomètres, la collecte des fractions correspondant aux différents pics de séparation était effectuée manuellement.

5 Divers pics d'absorption optique étaient obtenus. Le pic correspondant à un temps de rétention de $5,54 \pm 0,2$ minutes était collecté, la fraction correspondante reconcentrée par évaporation à l'aide d'un Speedvac couplé à un lyophilisateur.

10 Chromatographie en couche mince.

La fraction ainsi obtenue était remise en suspension dans 100 microlitres d'eau bidistillée, puis déposée en ligne sur une plaque de gel de silice 60 F 250 (Merck) de 0,2 mm d'épaisseur sur feuille
15 d'aluminium, à 1 cm du bord inférieur.

Le solvant utilisé était un mélange butanol/acide acétique/ H_2O : 4/1/1. La révélation était réalisée par le réactif de Reindel-Hope en lumière UV à 254 nm.

20 Le matériel séparé correspondait à un Rf de 0,24; il était collecté en grattant la plaque puis en réalisant une sonication dans deux volumes d'eau bidistillée; enfin, il était centrifugé pendant 3 minutes, filtré à travers un filtre de 0,22 micromètres et
25 enfin, lyophilisé.

Chromatographie HPLC en phase normale.

Le lyophilisat obtenu par chromatographie en couche mince était resuspendu dans un mélange ternaire d'injection composé de 70% d'acétonitrile, 20% de méthanol et 10% d'eau; puis centrifugé à 12000 g pendant
30 3 minutes et filtré sur des filtres de 0,22 micromètres. Il était alors injecté dans une colonne de chromatographie en phase normale identique à celle décrite précédemment. Les conditions d'élution étaient égale-

ment identiques à celles de l'étape de chromatographie en phase normale ci-dessus décrite.

On observait un pic dont le temps de rétention était égal à $5,5 \pm 0,2$ minutes. Celui-ci était collecté, distribué en portions et reconcentré à l'aide d'un Speedvac relié à un lyophilisateur.

Les portions contenant le produit recherché étaient conservées à -80°C .

La purification peut en outre être réalisée par une seconde méthode comportant une étape d'extraction, et une autre de chromatographie en phase inverse.

a) Extraction.

L'extraction était réalisée comme indiqué ci-dessus, excepté qu'après l'extraction par l'acétone à 75%, on effectue une extraction supplémentaire par 250 ml d'isopropanol à 90%. Le solvant étant ensuite évaporé et le résidu obtenu remis en suspension dans 100 ml d'eau bidistillée et lyophilisé.

b) Chromatographie en phase inverse.

Chromatographie en phase inverse sur colonne C4.

Le lyophilisat obtenu à l'étape précédente était mis en suspension dans 30 ml d'acétate d'ammonium 50 mM pH5 et injecté sur une colonne Nucléosil 300 - 5C₄ (250 mm x 10 mm).

Le débit était réglé à 3 ml min.^{-1} .

Une première phase (phase 0) composée de 100% d'acétate d'ammonium 50 mM pH5, était passée sur la colonne pendant 1 minute, puis une seconde phase (phase 1) d'acétate d'ammonium 50 mM pH5 et d'acétonitrile pendant 10 minutes de manière à réaliser un gradient linéaire permettant d'obtenir une concentration d'acétonitrile de 0% à 10% en 10 minutes; enfin

une troisième phase (phase) 2 constituée de 50% d'acétate d'ammonium 50 mM pH5 et 50% d'acétonitrile était passée pendant 5 minutes sur la colonne. Le chromatogramme obtenu est représenté sur la Fig. 1. La fraction de temps de rétention compris entre 4 min. 30 et 6 min. 30 contenant l'activité était collectée.

Chromatographie en phase inverse sur colonne C18.

La fraction obtenue précédemment était remise en suspension dans 30 ml d'acétate d'ammonium 50 mM, pH5 et injectée sur une colonne Lichrosorb Merck RP18 (250 x 10 mm).

Le débit était réglé à 4 ml. min.⁻¹.

Les phases étaient les suivantes :

- phase 0 : 1 min., 100% d'acétate d'ammonium 50 mM pH5,
- phase 1 : 10 min., gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 3%, acétate d'ammonium 50 mM pH5,
- phase 2 : 10 min., gradient linéaire, d'acétonitrile de 3 à 50%, acétate d'ammonium 50 mM pH5.

Le chromatogramme obtenu est représenté sur la fig. 2. La fraction active est celle correspondant au pic de rétention égal à $3,44 \pm 0,1$.

II - Caractéristiques du facteur endogène cérébral

a) Caractéristiques physicochimiques.

Les caractéristiques physicochimiques du facteur endogène cérébral sont essentiellement celles d'un peptide, dont le poids moléculaire est d'environ 3500 daltons.

La fig. 3 illustre la composition en acides

aminés. Comme cela apparaît sur cette figure les principaux acides aminés retrouvés de façon constante dans les analyses sont : l'aspartate, la thréonine, la sérine, la glycine, la leucine, l'alanine, la valine, la phénylalanine et un acide aminé correspondant soit au glutamate, soit à la glutamine.

b) Activité biologique et cellulaire du facteur endogène cérébral.

A - Interaction de ce facteur avec la liaison sérotoninergique de haute affinité 5-HT₁.

On a utilisé le même test que celui qui a permis de suivre l'existence de ce facteur endogène pendant tout le processus de purification.

Cet essai consiste à observer la liaison de la [³H]5HT (5HT = 5-hydroxytryptamine ou sérotonine) sur ses sites spécifiques de liaison 5-HT₁ et à observer les capacités d'interaction du facteur endogène avec celle-ci.

L'essai était réalisé à partir de préparations membranaires obtenues à partir de cerveau de cheval. Les cerveaux étaient disséqués et le tissu cortical placé dans des tubes à centrifugation où ils étaient homogénéisés à l'aide d'un appareil Ultra-turrax (22000 rpm) pendant 30 secondes dans 5 volumes de tampon Tris-HCl pH = 7,4 (50 mM) contenant 10⁻⁵ M de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) et 5 unités/l d'Aprotinine. L'homogénat était ensuite incubé pendant 10 minutes à 37°C pour dissocier la sérotonine endogène de ses sites de reconnaissance. La préparation tissulaire était ensuite diluée 20 fois avec le même tampon à 22°C et centrifugée pendant 10 minutes à 20 000 g (Kontron Centrikon H401 B) à 4°C. Le culot obtenu était remis en suspension dans 50 ml par gramme de tissu frais de tampon Tris-HCl pH 7,4,

50 mM contenant de la pargyline 5.10^{-6} M et de l'acide ascorbique à 0,1%.

Des portions de 0,5 ml de l'homogénat de tissu cortical à 1 mg/ml étaient incubées pendant 30 minutes à 22°C dans un volume final de 1 ml de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,4, contenant de la pargyline 5.10^{-6} M et de l'acide ascorbique 0,1%) en présence de [3 H]5-HT à une concentration de 5 nM (correspondant au Kd des récepteurs 5-HT₁). Les incubats étaient ensuite filtrés sous vide sur filtre Whatman de type GF/B en fibre de verre puis lavés deux fois avec un volume total de 10 ml de tampon Tris-HCl à 4°C, pH 7,4. L'appareil utilisé était un Harvester Brandell (New York), de capacité de 24 tubes filtrés simultanément sous une dépression de 15 mm de mercure (2.10^3 Pa). Les filtres étaient ensuite séchés sous lampe infrarouge pendant 1 heure et placés dans des fioles à scintillation contenant 5 ml d'OCS (Marque déposée par Amersham) (New England Nuclear, Boston, US); la radioactivité contenue dans ces filtres était mesurée par comptage pendant 4 minutes dans un spectrophotomètre à scintillation liquide (Kontron SL 2000). La liaison spécifique de [3 H]5HT était mesurée par la différence entre la radioactivité retenue en absence et en présence de 5-HT non radioactive à la concentration de 10 mM.

Pour la mesure de l'effet du facteur endogène sur la liaison 5-HT, les quantités croissantes de la fraction correspondant au facteur endogène étaient ajoutées au milieu d'incubation de la [3 H]5-HT en présence des préparations membranaires; l'effet de l'addition du facteur endogène sur la liaison spécifiques de [3 H]5-HT était déterminé selon le même procédé que celui décrit au paragraphe précédent.

Les résultats obtenus apparaissent dans la fig. 4 qui montre que les fractions correspondant au facteur cérébral endogène ont la propriété d'altérer la liaison de [3 H]5-HT sur ses sites spécifiques 5-HT₁.

B - Interaction du facteur endogène avec l'effet fonctionnel cellulaire de la 5-HT sur la libération d'acétylcholine

La libération de [3 H]acétylcholine a été étudiée en utilisant une technique dérivée de la technique des synaptosomes superfusés; les synaptosomes préparés à partir d'un tissu cérébral (hippocampe ou cortex) de cobaye étaient incubés à 37°C en présence de [3 H]choline 20 mM pendant 10 minutes dans un milieu tamponné Hepes. Ce matériel était ensuite lavé dans 25 volumes de tampon Hepes à 37°C, centrifugé pendant 4 minutes à 12000 g; le culot ainsi obtenu était resuspendu dans 30 volumes de tampon Hepes à 37°C, des portions de 500 microlitres de la préparation synaptosomale étaient distribuées dans des séries de tubes contenant ou non calcium et/ou potassium. La libération d'acétylcholine était mesurée après centrifugation des incubats et détermination de la radioactivité dans les surnageants obtenus. L'effet de la sérotonine sur la libération évoquée d'acétylcholine était déterminé en présence de l'amine ou d'un analogue sérotoninergique agoniste, le trifluorophénylméthylpipérazine (TFMPP) dont l'effet correspondait à une inhibition de $48 \pm 5\%$ de la libération évoquée d'acétylcholine.

Dans les conditions décrites ci-dessus, il a été montré que les antidépresseurs étaient capables d'antagoniser l'effet inhibiteur de la sérotonine sur la libération évoquée d'acétylcholine; de façon simi-

laire, le facteur endogène à des concentrations qui sont capables d'altérer la liaison de la sérotonine est également capable d'antagoniser l'effet inhibiteur de la sérotonine sur la libération évoquée d'acétyl-
5 choline, comme cela apparaît sur la fig. 5.

Les propriétés biologiques du facteur endogène cérébral montrent que celui-ci est capable d'interagir avec le fonctionnement du système sérotoninergique modulateur du fonctionnement d'autres neurones sérotoninergiques ou non sérotoninergiques. En outre, ce facteur mime l'effet des antidépresseurs à ce niveau. Ces observations conduisent à deux conclusions essentielles

1) tout d'abord ce facteur endogène est capable d'altérer le fonctionnement sérotoninergique cérébral; en conséquence il peut modifier certains effets physiologiques de la sérotonine au niveau cérébral et par là intervenir dans les comportements, la régulation thermique, le sommeil, l'apprentissage, la mémoire etc..
15 et également interagir sur le fonctionnement sérotoninergique à des niveaux périphériques notamment en ce qui concerne des propriétés immunes.

2) une deuxième conclusion est que les interactions de ce facteur avec le système sérotoninergique sont impliquées dans la pathologie de la dépression ou tout au moins dans celle des mécanismes d'action des antidépresseurs suggérant que ce facteur naturel pourrait réguler les effets modulateurs de la sérotonine sur le fonctionnement d'autres neurones cérébraux et que ce
25 mécanisme serait important dans la pathologie de la dépression.

Par conséquent, l'invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif le facteur endogène cérébral

selon l'invention ou un fragment actif de celui-ci.

Cette composition pharmaceutique est destinée à traiter les pathologies liées au système sérotoninergique au niveau cérébral et périphérique.

5 Au niveau périphérique, l'action de la composition selon l'invention est une modulation du système immunologique par modification des effets du stress.

10 Au niveau cérébral, elle agit en corrigeant les effets de la sérotonine, notamment au niveau du comportement, de la régulation thermique, du sommeil, etc...

15 Elle intervient en particulier par son action antidépressive, son action sur l'impulsivité ou l'inhibition et son action sur l'anxiété. Elle peut en outre être utilisée pour son activité dans la maladie d'Alzheimer.

20 Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être administrées par voie orale ou parentérale. Comme exemples on peut citer les comprimés, les gélules, les suppositoires, les solutions ou suspensions injectables ainsi que les formes retard.

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

30 La quantité de principe actif administré dépend évidemment du patient qui est traité, de la voie d'administration et de la sévérité de la maladie.

En outre, dans la mesure où le facteur endogène cérébral joue un rôle clé dans la pathologie de la dépression, un dosage dans les fluides périphériques peut représenter un outil intéressant de diagnostic de cette pathologie.

L'invention a par conséquent également pour objet des anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre le facteur endogène cérébral.

5 La présente invention a également pour objet des hybridomes produisant des anticorps monoclonaux dirigés contre le facteur endogène cérébral selon l'invention.

10 Les sérums polyclonaux et monoclonaux peuvent être préparés selon une technique classique. A cet effet des fragments peptidiques de celui-ci peuvent être couplés à des agents immunogènes, tels que la KLH (Keyhole Lympet Hemocyanin), l'ovalbumine, la sérum-albumine bovine etc, par un agent de couplage tel que le glutaraldéhyde. Le facteur endogène cérébral peut aussi être injecté directement.

15 Les immunisations peuvent être effectuées de manière classique par exemple chez le lapin et chez la souris, en injectant à l'animal par exemple 100 microgrammes du produit de couplage en présence d'adjuvant de Freund 3 à 4 fois à 3 semaines d'intervalle. Il est ainsi possible d'obtenir chez le lapin des sérums polyclonaux.

Les hybridomes et les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus par les procédés classiques.

25 La présente invention a également pour objet un procédé de dosage ou de détection du facteur endogène cérébral selon l'invention dans les tissus et liquides biologiques.

30 A cet effet, on peut utiliser notamment une méthode de type RIA utilisant un peptide marqué par un radioisotope, et la compétition entre ce peptide et le facteur endogène à doser (Niswender G.D. et al; Proc. Soc. Exp. Biol. 128, 807, 1968). On peut également utiliser une méthode de type ELISA utilisant par exem-

ple un peptide sur un support et la compétition entre ce peptide et le facteur endogène cérébral à doser vis-à-vis des anticorps préparés contre celui-ci. Les anticorps retenus par le peptide fixé au support sont
5 détectés par des anticorps dirigés contre le premier et liés à une enzyme.

REVENDEICATIONS

1. Facteur endogène cérébral ou fragment de celui-ci, agissant sur le fonctionnement sérotoninergique, qui est de nature essentiellement peptidique, a une masse moléculaire d'environ 3500 daltons, un pK d'environ 5, est thermostable, soluble dans l'acétone jusqu'à 75%, dans les alcools primaires jusqu'à 90%, dans l'eau, en milieu acide jusqu'à 1M, inactivé dans l'acétonitrile à 70% présente une réaction négative avec l'aldéhyde anisique et peut être obtenu par :
- a) extraction à partir du cortex cérébral,
 - b) éventuellement filtration sur gel ayant un domaine de fractionnement compris entre 10000 et 100 daltons, et
 - c) purification par chromatographie.
2. Facteur endogène cérébral selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente en chromatographie sur couche mince, l'éluant étant un mélange butanol/acide acétique/H₂O : 4/1/1, un Rf égal à 0,24.
3. Procédé pour l'obtention d'un facteur endogène cérébral selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que
- a) l'on réalise une extraction à partir du cortex cérébral,
 - b) éventuellement, l'on filtre sur un gel ayant un domaine de fractionnement compris entre 10000 et 100 daltons,
 - c) l'on purifie par chromatographie.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'étape a) comprend une extraction à l'acide acétique suivie d'une extraction à l'acétone.

5 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'étape a) comprend une extraction à l'acide acétique glacial, une centrifugation à 17500 g pendant 20 minutes, une lyophilisation, une remise en suspension dans l'eau et une extraction à l'acétone.

10 6. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que dans l'étape b) la filtration est réalisée sur une colonne HPLC avec de l'acétate d'ammonium 50 mM comme éluant.

10 7. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'étape c) comprend une chromatographie HPLC en phase normale suivie d'une chromatographie en couche mince et une chromatographie en phase normale.

15 8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les chromatographies HPLC en phase normale sont réalisées avec une phase mobile consistant en un mélange composé de 70% d'acétonitrile, 20% de méthanol et 10% d'eau bidistillée et la chromatographie en couche mince est réalisée sur gel de silice avec comme éluant un mélange butanol/acide acétique/
20 H₂O : 4/1/1.

25 9. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'on réalise une extraction à l'acide acétique, une extraction à l'acétone et une extraction à l'isopropanol, et l'on réalise une chromatographe HPLC en phase inverse sur une colonne Nucléosil 300 - 5C₄ suivie d'une chromatographie HPLC en phase inverse sur une colonne Lichrosorb Merck RP18, la phase mobile étant constituée par un gradient d'acétonitrile dans
30 l'acétate d'ammonium.

10. Composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif le facteur endogène cérébral selon la revendication 1 ou un fragment actif de celui-ci.

11. Composition pharmaceutique selon la revendication 10, destinée à combattre les pathologies liées au système sérotoninergique au niveau cérébral et périphérique.

5 12. Composition pharmaceutique selon la revendication 11 pour le traitement de la dépression, de l'impulsivité, de l'inhibition, de l'anxiété ou de la maladie d'Alzheimer.

10 13. Anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre le facteur endogène cérébral selon la revendication 1 ou 2 ou un fragment de celui-ci.

14. Hybridomes, caractérisés en ce qu'ils produisent des anticorps monoclonaux selon la revendication 13.

15 15. Procédé de dosage ou de détection du facteur endogène cérébral selon la revendication 1 ou 2, dans les tissus et liquides biologiques, comprenant l'utilisation d'anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre le facteur endogène cérébral ou un
20 épitope de celui-ci.

1/5

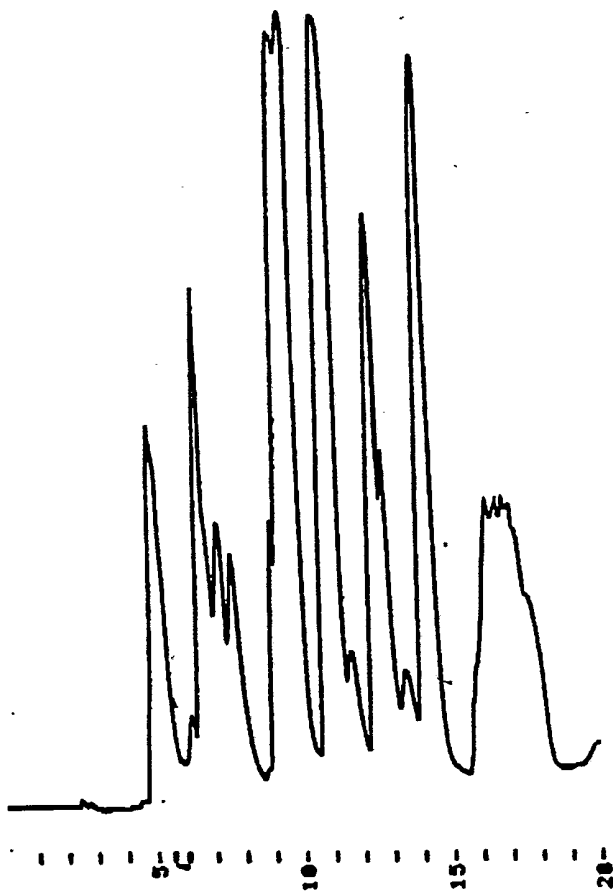


FIG.1

2/5

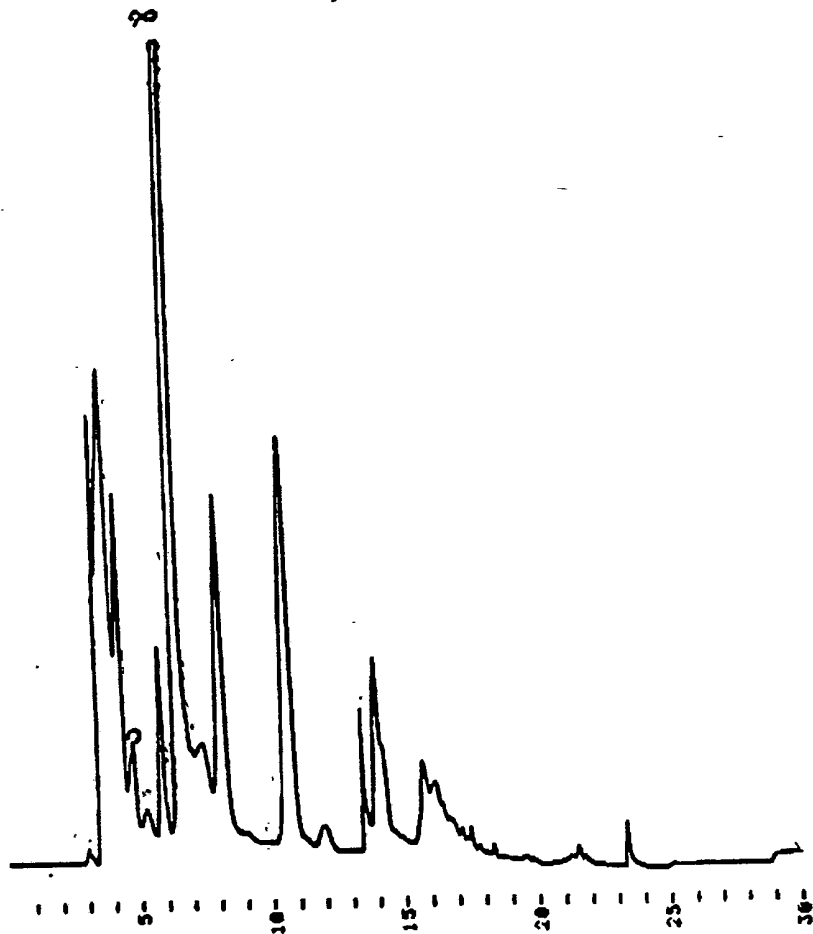
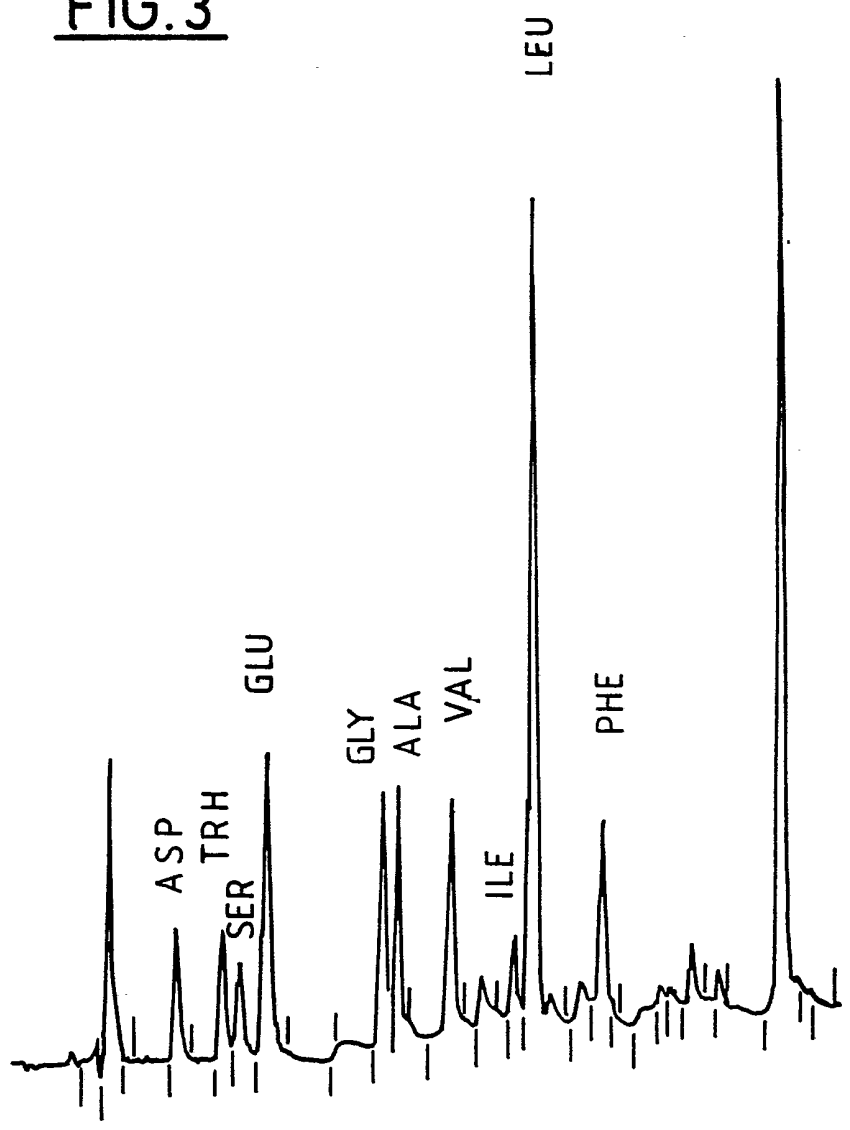


FIG.2

FIG. 3



CORTEX DE RAT-EFFET SUR LIAISON 5-HT (5nM)
DU FACTEUR ENDOGENE CEREBRAL

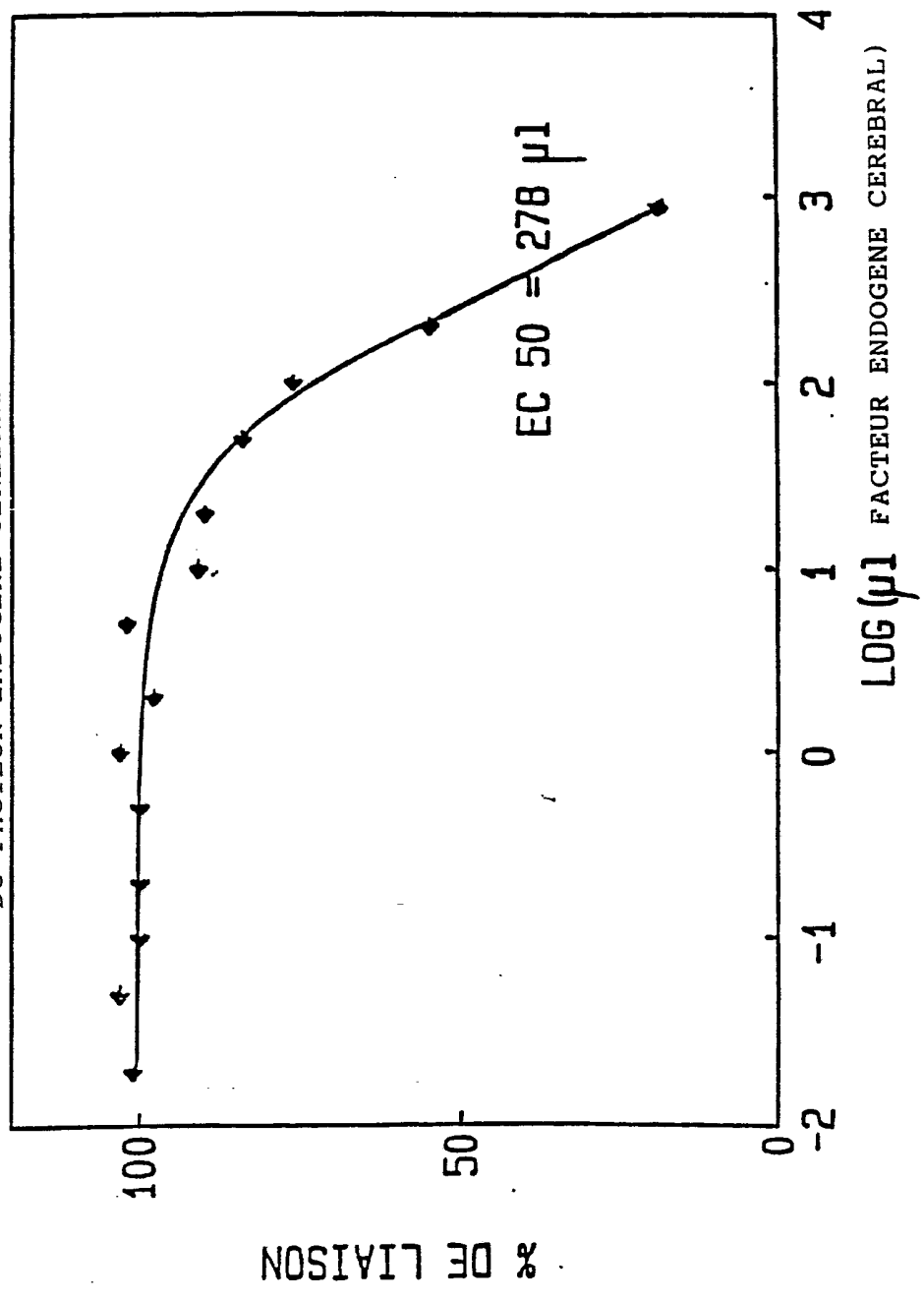
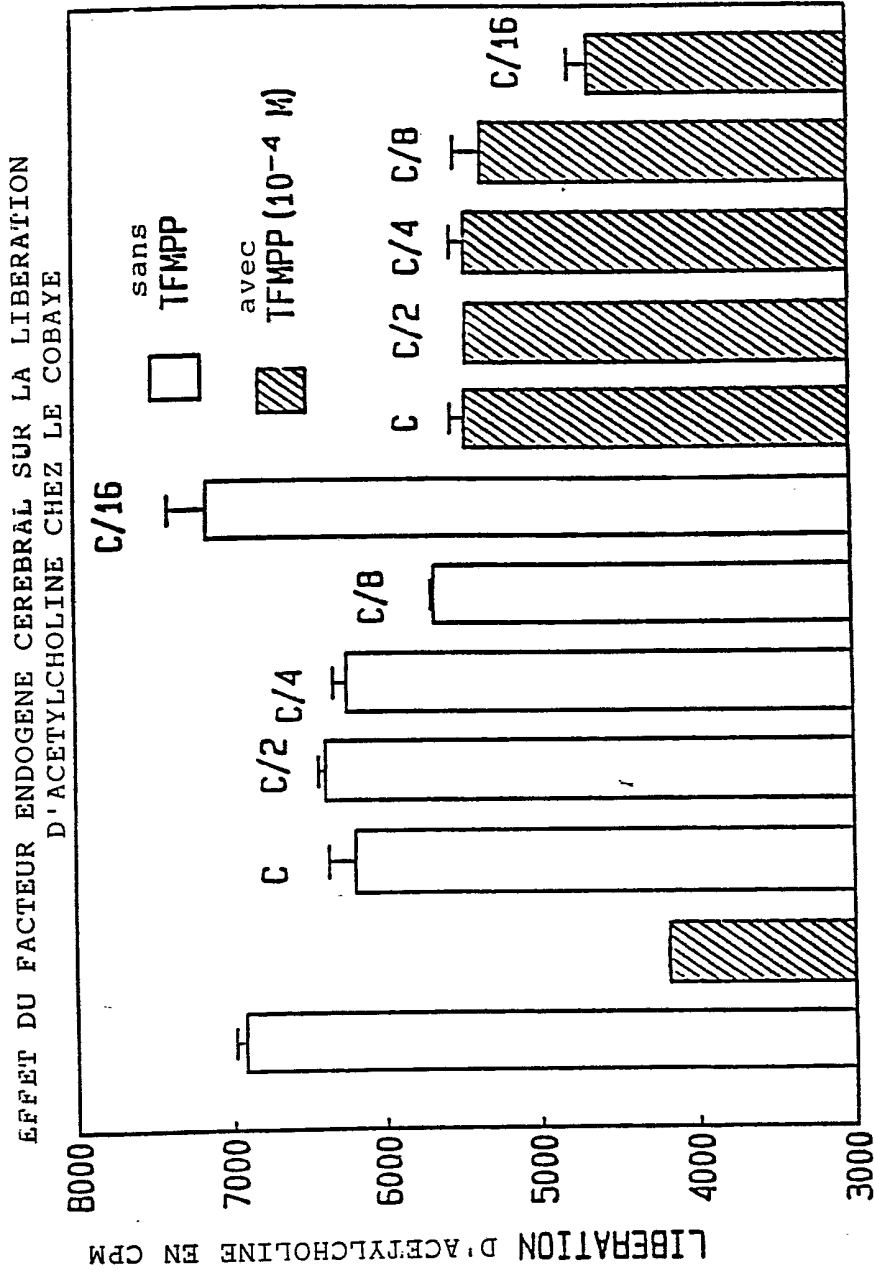


FIG.4



Témoin TFMP
effet propre du facteur endogène aux dilutions indiquées
effet du facteur endogène sur l'inhibition cholinergique induite par le TFMPP

FIG.5

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

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

FR 9001297
FA 438618

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol 70, page 427, 1980, Davis L eonard et al: "Identification of an endogenous pe ptide-ligand..." résumé numéro 4089 & BIOCHEM BI OPHYS RES COMMUN 92(1):141-148 *résumé* ----	1-15
A	EP-A-82612 (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) * le document en entier * -----	1-15
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		A61K C07K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
09 OCTOBRE 1990		FERNANDEZ Y BRA F.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>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 I : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		