

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 482 093

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

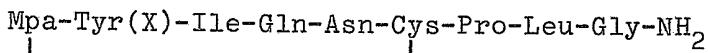
(21) **N° 81 05751**

-
- (54) Nouveaux dérivés d'ocytocine et compositions pharmaceutiques contenant ces dérivés.
- (51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 07 C 103/52; A 61 K 37/02.
- (22) Date de dépôt..... 23 mars 1981.
- (33) (32) (31) Priorité revendiquée : Suède, 24 mars 1980, n° 80 02222-1.
- (41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 46 du 13-11-1981.
- (71) Déposant : Société dite : FERRING AB, résidant en Suède.
- (72) Invention de : Per Olof Ragnar Melin.
- (73) Titulaire : *Idem* (71)
- (74) Mandataire : Cabinet Barnay,
80, rue Saint-Lazare, 75009 Paris.
-

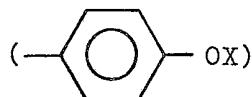
La présente invention concerne de nouveaux dérivés d'ocytocine.

Plus particulièrement, l'invention concerne des désamino-1-(O-alkyl-2 tyrosine)-ocytocines qui ont un effet 5 d'inhibition des contractions utérines. Les nouveaux dérivés d'ocytocine de l'invention inhibent *in vitro* et *in vivo* (chez l'homme et le rat) les contractions utérines induites par la vasopressine et l'ocytocine et ils inhibent également le diagramme caractéristique des contractions spontanées de 10 l'utérus.

Les dérivés d'ocytocine de l'invention diffèrent de l'hormone naturelle qu'est l'ocytocine par le fait que l'atome d'hydrogène du radical hydroxy de la tyrosine est remplacé par un radical alkyle et que la cystéine en position 1 est 15 désaminée. Ainsi, ces dérivés d'ocytocine répondent à la formule :



où Mpa représente le radical mercapto-3 propionyle (-S-CH₂-CH₂-CO-) et X représente un radical alkyle remplaçant 20 l'atome d'hydrogène du radical hydroxy



de la tyrosine, X représentant un radical alkyle inférieur comportant 2 à 4 atomes de carbone, de préférence le radical éthyle. Le radical alkyle peut donc être un radical éthyle, 25 propyle ou butyle. Des radicaux alkyles comportant 5 ou 6 atomes de carbone sont également concevables, mais vraisemblablement leur activité inhibitrice est réduite.

On a décrit les dérivés d'ocytocine suivants ayant une structure très apparentée et on leur a attribué un effet 30 d'antagonisme sur les contractions utérines induites par l'ocytocine : O-méthyl-2 tyrosine-ocytocine et O-éthyl-2 tyrosine -ocytocine (Rudinger, J. et Krejci, I. Antagonists of the Neurohypophyseal Hormones. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 23, (1968), pages 748 à 801. Ed B. Berde, 35 Berlin, Heidelberg et New York : Springer Verlag), N^α-acétyl

O-méthyl-2 tyrosine-octocine (brevet suédois n° 7713/70, publication n° 353 531) et désamino-1 pénicillamine, O-méthyl-2 tyrosine octocine (J. Lowbridge et coll., Journal of Medicinal Chemistry 22, (1979), pages 565 à 569).

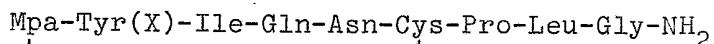
5 On notera que ces études antérieures n'ont été effectuées que sur des rats. Pour autant qu'on le sache, personne n'a étudié les effets inhibiteurs des dérivés de l'octocine sur un tissu d'origine humaine. La demanderesse a étudié et découvert des effets inhibiteurs de peptides sur 10 la musculature utérine d'une femme enceinte et d'une femme non enceinte. Il est remarquable que lors d'expériences réalisées avec un tissu provenant d'une femme non enceinte, on ait observé que les dérivés d'octocine selon l'invention peuvent également inhiber les contractions induites par la 15 vasopressine. Il est particulièrement intéressant que les dérivés d'octocine selon l'invention inhibent le diagramme caractéristique des contractions spontanées de l'utérus, ce qui n'avait jamais été précédemment signalé.

A ce jour, on ne connaissait aucun médicament 20 dépourvu d'effets secondaires capable de s'opposer aux contractions musculaires excessives de l'utérus. Les agents thérapeutiques connus à ce jour pour avoir cet effet sont des agonistes des récepteurs β , des inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines, des antagonistes du calcium et l'éthanol. 25 Tous ces agents ont des effets non spécifiques et produisent donc des effets secondaires.

Les composés de l'invention ont donc un intérêt clinique considérable dans les cas de travail prématuré ou de spasmes excessifs de l'utérus associés à l'accouchement et à 30 la menstruation (accouchement prématuré, dysménorrhée).

L'invention a pour objets :

- des dérivés d'octocine répondant à la formule :



où Mpa est un radical mercapto-3 propionyle et X est un 35 radical alkyle comportant 2 à 4 atomes de carbone qui remplace l'atome d'hydrogène du radical hydroxy de la tyrosine; dans les dérivés d'octocine de la formule ci-dessus, X peut représenter un radical éthyle;

- une composition pharmaceutique contenant comme ingrédient actif au moins un de ces dérivés d'ocytocine en combinaison avec des additifs et/ou diluants convenant en pharmacie;

5 - une composition pharmaceutique comme précédemment définie comprenant comme diluant convenant en pharmacie une solution salée physiologique et du mannitol comme additif;

- l'emploi des dérivés d'ocytocine précédemment définis pour la production de médicaments;

10 - un procédé pour s'opposer aux contractions musculaires excessives de l'utérus consistant à administrer une composition pharmaceutique contenant une quantité efficace d'au moins un dérivé d'ocytocine comme précédemment défini; et

15 - un procédé comme précédemment défini dans lequel la quantité efficace de dérivé d'ocytocine administrée est de 5 à 25 μ g.

De préférence, les dérivés d'ocytocine selon l'invention dissous dans une solution salée physiologique sont 20 administrés par injection, perfusion ou inhalation.

On peut préparer les composés selon l'invention par analogie avec des procédés bien connus dans l'art antérieur. Dans l'exemple suivant, on prépare un composé caractéristique de l'invention, la désamino-1-(O-éthyl-2 tyrosine)-ocytocine, 25 conformément au procédé décrit par Law H.B. et Du Vigneaud V. dans Journal of the American Chemical Society 82, (1960), pages 4579 à 4581, par Zhuze A.L., Jost K., Kasafirek E. et Rudinger J. dans Collection of Czechoslovak Communications 29, (1963), pages 2648 à 2662, et modifié par Larsson L.-E., 30 Lindeberg G., Melin P. et Pliska V. dans Journal of Medicinal Chemistry 21, (1978), pages 352 à 356.

Dans l'exemple sont utilisées les abréviations suivantes :

Cbz = radical carbobenzylxy

35 Bzl = radical benzyle

Mpa = radical mercapto-2 propionyle

ONp = radical ester p-nitrophénylique

DMF = diméthylformamide

EXEMPLE

On débloque 1,0 g de Cbz-Ile-Gln-Asn-Cys-Bzl-Pro-Leu-Gly-NH₂ (de Ferring AB, Malmö, Suède) avec 30 ml d'acide bromhydrique et 20 ml d'acide acétique et on couple pendant 5 48 heures avec 477 mg de Cbz-Tyr(éthyl)-ONp dans 7 ml de DMF en présence de N-éthyldiisopropylamine. On précipite le produit par l'eau. On lave le précipité à l'eau, à l'éthanol, à l'acétone et à l'acétate d'éthyle et on recristallise dans un mélange d'acide acétique et d'éthanol. On obtient ainsi 10 0,93 g (79%) de Cbz-Tyr(éthyl)-Ile-Gln-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH₂, qui se révèle homogène par chromatographie en couche mince avec les systèmes n-butanol/acide acétique/eau 4:1:1 et n-butanol/acide acétique/pyridine/eau 15:3:10:6.

On débloque 0,44 g de ce composé comme décrit 15 ci-dessus et on couple avec 0,12 g de Mpa(Bzl)-ONp. On obtient 0,337 g (75%) de Mpa(Bzl)-Tyr(éthyl)-Ile-Gln-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH₂ qui apparaît homogène par chromatographie en couche mince avec les mêmes systèmes que ci-dessus.

On débloque 0,3 g du dernier composé cité avec du 20 sodium dans 400 ml d'ammoniac condensé séché sur sodium et on dissout dans 350 ml d'eau (acidifiée avec de l'acide acétique). On obtient une solution trouble qu'on filtre et qu'on extrait par l'éther (2 x 100 ml). On ajuste le pH à 7,4 et on ajoute 15 ml de K₃Fe(CN)₆ 0,01 M. On agite le 25 mélange pendant 20 minutes et on acidifie puis on décolore sur la résine échangeuse d'ions de type chlorure "Dowex-50" (de la Dow Chemical Co., Midland, Michigan, USA) et on lyophilise.

On dessale la matière lyophilisée sur du "Sephadex 30 G-15" (colonne de 1,4 x 140 cm) dans un mélange en volumes égaux d'acide acétique et d'eau. On dilue la fraction principale avec de l'eau et on lyophilise. Les Sephadex sont des gels de dextrane fournis par Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suède.

35 On soumet le composant principal à une filtration sur gel de "Sephadex G-25" (superfine) (1,6 x 90 cm) dans de l'acétate d'ammonium 0,05 M à pH 5,0. On élue la fraction principale et on la lyophilise.

On dissout le résidu dans un mélange 4:1:1 de n-butanol, d'acide acétique et d'eau et on chromatographie sur du "Sephadex LH-20" en utilisant le même système. On concentre la matière par évaporation, on dissout dans l'eau et on lyophilise.

Finalement, on soumet cette matière lyophilisée à une nouvelle filtration sur gel comme précédemment décrit.

On obtient ainsi 8 mg de désamino-1-(0-éthyl-2 tyrosine)-ocytocine. On contrôle la pureté du produit par chromatographie en couche mince sur des plaques de cellulose avec les systèmes n-butanol/acide acétique/eau 4:1:5 (phase supérieure) et n-butanol/acide acétique/pyridine/eau 15:3:10:12.

Le produit est également homogène par analyse par chromatographie liquide haute pression sur une colonne de μ -Bondapak C-18 dans un mélange de 45% d'éthanol et de 55% d'acide trifluoroacétique 5 mM dans l'eau. Cette colonne est fournie par Waters Associates, Inc., Millford, Massachusetts, USA. Analyse des amino-acides : Asp : 1,02, Glu : 1,03, Gly : 0,98, Ile : 0,97, Leu : 0,99, Tyr : 0,75; l'hydrolyse de Tyr(éthyl) en Tyr est incomplète.

On a examiné l'activité utérotonique, sur l'utérus de rate isolé avec l'ocytocine comme standard, de composés connus, l'0-méthyle-2 tyrosine-ocytocine et l'0-éthyl-2 tyrosine-ocytocine et un composé caractéristique de l'invention, la désamino-1-(0-éthyl-2 tyrosine)-ocytocine. On a également évalué les propriétés antagonistes des composés au moyen de cette préparation mais également *in vivo* avec de l'ocytocine comme agoniste. De plus, on a examiné l'inhibition de l'effet de l'ocytocine sur myomètre humain isolé.

Expériences in vitro

On choisit, au moyen de frottis vaginaux, des rates Sprague-Dawley (pesant environ 250 g) en oestrus naturel. On prélève un segment long d'environ 20 mm dans la partie moyenne d'une corne utérine et on le monte dans une cuve à organe contenant 10 ml de solution de Locke modifiée ayant la composition suivante (mM: NaCl 153, KCl 5,63, CaCl_2 0,541, NaHCO_3 5,95 et glucose 2,78). On fait barboter

dans la solution de l'oxygène contenant 5% de CO₂ à 30°C. On laisse les contractions utérines se stabiliser pendant 30 minutes. On effectue un enregistrement isométrique des contractions avec une tension au repos de 1,5 g avec des transducteurs de force Grass (Ft 03). On calcule l'activité antagoniste des analogues sous forme de pA₂ (Rudinger J. et Krejci I., Experientia 18, (1962), pages 585 à 588). Le pA₂ est une mesure de la propriété inhibitrice du peptide qui a été définie par Schild (Schild H.O., British Journal of Pharmacology, 2 (1947), pages 189 à 206) comme la valeur changée de signe du logarithme de la concentration molaire d'un antagoniste qui réduit l'effet d'une dose d'un agoniste à l'effet de la moitié de cette dose.

Chez dix sept patientes subissant une opération césarienne (37ème à 40ème semaine), on excise un segment transversal de tissu utérin dans la partie isthmique de l'utérus. On excise également des fragments de tissu de la face ventrale de l'utérus de vingt et une femmes non enceintes d'âge fertile subissant une hystérectomie. On place immédiatement les fragments tissulaires dans de la solution de Krebs-Ringer (mM : NaCl 118, KCl 4,6, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,15, NaHCO₃ 24,9, KH₂PO₄ 1,15 et glucose 5,5) à 0°C et on les utilise dans les deux heures qui suivent l'opération. On monte des fragments mesurant 25 x 3 x 3 mm dans une cuve à organe contenant 10 ml de solution de Krebs-Ringer à 37°C et on fait barboter de l'oxygène à 5% de CO₂. Après une période d'adaptation de 30 minutes, on effectue un enregistrement isométrique des contractions avec une tension au repos de 1,25 g. Dans les expériences effectuées avec des tissus prélevés sur des femmes enceintes, on utilise l'ocytocine (0,013-1,3 µg/ml) comme agoniste. Dans le cas des expériences portant sur des tissus prélevés sur des femmes non enceintes, on utilise la lysine-vasopressine (0,07-1,3 µg/ml) comme agoniste. On choisit une dose appro- priée d'agoniste ayant un effet correspondant à environ 40% de l'effet maximal. On utilise l'antagoniste à une concentra- tion de 0,33 à 1,32 µg/ml. On contrôle toujours la réponse du tissu du myomètre à l'agoniste au début et à la fin de l'expérience. Lorsque les effets du peptide se sont estompés,

on lave le tissu avec trois fois 10 ml de solution tampon. On mesure l'effet inhibiteur de l'antagoniste par planimétrie, pendant une durée de 15 minutes après l'addition du peptide, de la surface totale de la courbe enregistrée. On exprime l'inhibition en pourcentage rapporté à l'effet obtenu avec l'agoniste seul.

Expériences in vivo

On anesthésie avec de l'Inactin (0,5 mg/100 g de poids corporel par voie intrapéritonéale) des rates Sprague-Dawley pesant 250 g en oestrus naturel. On enregistre l'activité du myomètre avec un cathéter fixé dans la cavité utérine et remplie de solution de Locke modifiée. Le cathéter est raccordé à un transducteur Statham P23d et on enregistre les contractions sur un polygraphe Grass (modèle 7D). On perfuse de l'ocytocine par voie intraveineuse (0,05 µg/min/100 g de poids corporel). Lorsqu'on a obtenu un diagramme régulier des contractions, on administre l'antagoniste (0,8-8,0 µg/100 g de poids corporel) par voie intraveineuse sous un volume de 0,2 ml. On intègre la courbe enregistrée pour des intervalles de 10 minutes immédiatement avant et après l'injection de l'antagoniste.

Résultats

Les expériences in vitro effectuées sur le rat ont établi que l'O-méthyl-2 tyrosine-ocytocine et l'O-éthyl-2 tyrosine-ocytocine ont une activité utérotonique de l'ordre de 1-2 UI/mg. D'autre part, les analogues désamino-1 correspondants n'ont pas d'activité agoniste mesurable.

Tous les dérivés examinés provoquent une inhibition compétitive de l'effet de l'ocytocine, comme le montrent les valeurs de leur pA_2 figurant dans le tableau ci-après. (On peut indiquer à cet égard que les valeurs des pA_2 obtenues dans des laboratoires différents ne sont pas comparables car les conditions d'essai ne sont jamais équivalentes).

TABLEAU

Essai (in vitro) de l'activité antagoniste de dérivés d'ocytocine sur des préparations d'utérus de rates stimulées par l'ocytocine.

Dérivés	pA ₂ (moyenne ± erreur moyenne)	Nombre d'expériences
5 O-méthyl-2 tyrosine-ocytocine	6,68 ± 0,12	(12)
10 0-éthyl-2 tyrosine-ocytocine	7,13 ± 0,09	(8)
15 Désamino-1-(O-éthyl-2 tyrosine)-ocytocine	7,19 ± 0,10	(5)

Le tableau ci-dessus montre que les composés étudiés ont des pA₂ semblables et assez élevés. Il est évident que la désamination de la position 1 de la chaîne peptidique ne modifie pas de façon importante l'activité inhibitrice dans les essais portant sur des préparations d'utérus isolés de rates, mais que d'autre part, comme précédemment indiqué, elle provoque la disparition de l'effet agoniste.

Il ressort des expériences in vitro portant sur le tissu utérin de femmes enceintes que le dérivé d'ocytocine selon l'invention inhibe fortement les contractions induites par l'ocytocine. On obtient cet effet pour un rapport des doses de l'antagoniste à l'agoniste de 3 à 5, c'est-à-dire qu'il se produit une inhibition des contractions stimulées par l'ocytocine lorsque la concentration de l'inhibiteur est 3 à 5 fois supérieure à celle de l'ocytocine. L'inhibition se manifeste principalement par une diminution du tonus musculaire et de la fréquence des contractions de l'utérus. On observe un blocage complet des effets de l'ocytocine et de la vasopressine sur l'utérus de femme enceinte ou non enceinte pour une dose du dérivé d'ocytocine approximativement 5 fois supérieure à la dose de l'agoniste. Avec l'O-éthyl-2 tyrosine-ocytocine, on obtient une inhibition nette qui est cependant inférieure à celle observée lorsqu'on utilise le

composé selon l'invention. Les effets sont réversibles. On a établi que, pour le composé connu qu'est la N^α-acétyl O-méthyl-2 tyrosine-oxytocine, il se produit une inhibition complète de l'oxytocine pour un rapport quantitatif de 5 15:1 à 20:1, c'est-à-dire à une concentration plusieurs fois supérieure à celle observée avec le composé selon l'invention.

Dans les expériences *in vivo* sur le rat effectuées avec le dérivé d'oxytocine selon l'invention, l'O-méthyl-2 10 tyrosine-oxytocine et l'O-éthyl-2 tyrosine-oxytocine, on observe une inhibition réversible, en relation avec la dose, de l'accroissement de la force des contractions utérines provoquées par la perfusion d'oxytocine (0,05 µg/min/100 g de poids corporel). On pourrait établir que l'analogue utilisé 15 est un inhibiteur considérablement plus actif que les deux analogues connus. Il est remarquable que le dérivé d'oxytocine selon l'invention à la dose de 2 µg peut bloquer complètement le diagramme caractéristique des contractions utérines (contrairement à l'O-éthyl-2 tyrosine-oxytocine et à 20 l'O-méthyl-2 tyrosine-oxytocine, qui ne présentent pas cette activité), c'est-à-dire non seulement les contractions provoquées par l'oxytocine, mais également l'activité musculaire spontanée de l'organe. Cette dernière activité selon toute vraisemblance est indépendante d'un effet quelconque 25 sur la circulation, car l'analogue à une dose intraveineuse atteignant 30 µg n'a aucun effet sur la pression sanguine. Ce résultat est extrêmement surprenant si l'on considère qu'auparavant il était impossible d'inhiber les contractions spontanées de l'utérus. Le brevet suédois n° 7713/70 30 précité indique expressément que la N^α-acétyl O-méthyl-2 tyrosine-oxytacine n'a pas d'effet sur l'activité spontanée de l'utérus.

Expériences cliniques sur quatre femmes volontaires

On a étudié, selon la méthode décrite par Åkerlund 35 M., Bengtson L.P. et Ulmsten U. dans "Recording of myometric action in the non-pregnant human uterus by a micro transducer", Acta Obstet. Gynecol. Scand., Vol. 57, pages 429 à 433, 1978, l'effet de la désamino-1-(O-éthyl-2 tyrosine)-oxytocine sur le diagramme caractéristique des contractions de l'utérus

de quatre femmes.

Dans quatre expériences différentes, portant sur trois femmes normales en début de période menstruelle, on a enregistré en continu la pression utérine avec un micro-transducteur (PC 350, Millar Instruments, Houston, USA) fixé dans la cavité utérine. On a perfusé les femmes en continu avec de la lysine-vasopressine ($0,08 \mu\text{g}/\text{min}$) pour stimuler les contractions musculaires de l'utérus. On a ensuite administré par voie intraveineuse à chaque femme une dose unique de 5 à $25 \mu\text{g}$ de désamino-1-(O-éthyl-2 tyrosine)-ocytocine. De façon générale, l'inhibition de l'amplitude et de la fréquence des contractions utérines les a ramenées aux mêmes valeurs qu'avant la perfusion de lysine-vasopressine. Cet effet a présenté des variations selon les différents sujets et a duré 45 à 180 minutes.

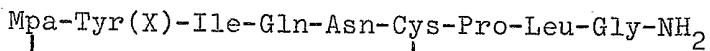
On a étudié l'effet d'une injection unique de désamino-1-(O-éthyl-2 tyrosine)-ocytocine chez une femme présentant des douleurs menstruelles spontanées importantes. Des études antérieures ont montré que chez les femmes souffrant de telles douleurs, la concentration plasmatique en vasopressine est élevée (Åkerlund M., Forsling M., Strömberg P., "Primary dysmenorrhoea and vasopressin", Br. J. Obstet. Gynecol. 86:485, 1979 et Strömberg P., Forsling M., Åkerlund M., "Vasopressin levels in women with primary dysmenorrhoea before and after treatment with a prostaglandin synthesis inhibitor", Obstet. Gynecol., sous presse). Après administration intraveineuse de $10 \mu\text{g}$ de désamino-1-(O-éthyl-2 tyrosine)-ocytocine, la femme a présenté un net soulagement de la douleur tandis qu'elle reprenait des couleurs normales et semblait moins épuisée.

Préparation d'une composition pharmaceutique

On lyophilise 1 mg de dérivé d'ocytocine et 10 mg de mannitol et on place l'ensemble dans une ampoule que l'on scelle. Pour l'administration intraveineuse, on dilue le contenu de l'ampoule avec une solution salée isotonique pour obtenir une concentration de $10 \mu\text{g}$ de dérivé d'ocytocine pour 1 ml de solution.

REVENDICATIONS

1.- Dérivé d'ocytocine caractérisé par le fait qu'il répond à la formule :



5 où Mpa représente un radical mercapto-3 propionyle et X représente un radical alkyle comportant 2 à 4 atomes de carbone et remplaçant l'atome d'hydrogène du radical hydroxy de la tyrosine.

10 2.- Dérivé d'ocytocine selon la revendication 1, caractérisé par le fait que X représente le radical éthyle.

15 3.- Composition pharmaceutique caractérisée par le fait qu'elle renferme au moins un dérivé selon la revendication 1 ou 2, comme ingrédient actif, en combinaison avec des additifs et/ou des diluants convenant en pharmacie.

4.- Composition pharmaceutique selon la revendication 3, caractérisée par le fait qu'elle contient, comme diluant convenant en pharmacie, une solution salée physiologique et du mannitol comme additif.

20 5.- Composition pharmaceutique selon la revendication 3 ou 4, caractérisée par le fait qu'elle est préparée en doses administrables contenant une quantité de l'ingrédient actif comprise entre 5 et 25 μg .