

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 13.03.98.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 17.09.99 Bulletin 99/37.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : ASSISTANCE PUBLIQUE HOPITAUX DE PARIS Etablissement public — FR.

⑦2 Inventeur(s) : GRESSENS PIERRE et ROBBE-RECHT PATRICK.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤4 UTILISATION D'ANALOGUES DU VIP DANS LA PREVENTION ET LE TRAITEMENT DES LESIONS CEREBRALES DU NOUVEAU-NE HUMAIN.

⑤7 Nouvelle utilisation d'analogues du VIP, dans la prévention et/ ou le traitement des lésions cérébrales du fœtus, du nouveau-né ou du jeune nourrisson humains.

Ledit analogue du VIP est sélectionné dans le groupe constitué par les analogues cycliques du VIP et des dérivés du VIP non cycliques de 28 aminoacides comprenant en position N-terminale un groupe N-acétyle, puis Glu en position 8 (Glu⁸), Lys en position 12 (Lys¹²), norleucine en position 17 (Nle¹⁷), Ala en position 19 (Ala¹⁹), X1 en position 21, X2 en position 25, Leu en position 26 (Leu²⁶), Lys en positions 27 et 28 (Lys²⁷ et Lys²⁸), Gly en position 29 et 30 (Gly²⁹ et Gly³⁰) et Thr en position 31 (Thr³¹), X1 représentant Lys (Lys²¹) ou Nle (Nle²¹) et X2 représentant Asp (Asp²⁵) ou Asn (Asn²⁵).

FR 2 775 902 - A1



La présente Invention est relative à une nouvelle utilisation d'analogues du VIP, dans la prévention et/ou le traitement des lésions cérébrales du nouveau-né humain.

On entend par « nouveau-né » au sens de la présente invention, aussi bien le foetus, le nouveau-né prématuré ou à terme que le jeune nourrisson.

Initialement, le peptide intestinal vasoactif (VIP) a été isolé et purifié, à partir de l'intestin de porc.

Ce peptide comprend 28 aminoacides :

10 HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH₂(SEQ NO:1) et présente une homologie importante avec la sécrétine et le glucagon.

Des neurones contenant du VIP ont été localisés par immunotest dans différents tissus : système endocrine, système exocrine, tissus musculaires lisses.

15 Le VIP présente de nombreuses activités biologiques, notamment au niveau du tractus gastro-intestinal et du système circulatoire ; il présente en particulier une action de relaxation des muscles lisses. Il a été préconisé dans la relaxation des muscles lisses bronchiques et par voie de conséquence dans le traitement de l'asthme.

20 D'autres activités biologiques ont été décrites pour le VIP. En particulier, il a été montré (*Pierre Gressens et al., J. Clin. Investig., 1997, 100, 2, 390-97*) que le VIP présente un rôle protecteur contre les lésions excitotoxiques induites par l'iboténate dans le cerveau de souris en développement.

En effet, ces Auteurs ont montré que les lésions induites chez 25 les rongeurs par l'injection d'iboténate miment certains désordres architecturaux néopalliaux observés en pathologie humaine, à divers stades de la grossesse.

Les lésions du cerveau humain apparaissent chez le nouveau-né à terme ou prématuré, généralement par manque d'oxygène ; ceci peut

également survenir pendant la grossesse. Ce manque d'oxygène est une cause majeure de séquelles neurologiques.

Les différentes lésions qui ont pu être observées, sont essentiellement des lésions du cortex cérébral ou des lésions de la substance
5 blanche (prématuré).

Le modèle chez la souris obtenu par injection intracérébrale d'iboténate reproduit :

- des lésions du cortex cérébral, semblables à celles observées chez le fœtus humain entre 16 et 25 semaines de grossesse, lorsque l'iboténate
10 est injecté le jour de la naissance (J_N),

- des lésions du cortex cérébral semblables aux lésions du nouveau-né humain à terme, lorsque l'injection d'iboténate est effectuée à $J_N + 5$ et

- des lésions de la substance blanche, semblables aux lésions
15 du prématuré humain, lorsque l'iboténate est injecté à $J_N + 5$.

De manière plus précise :

. la dépopulation neuronale spécifique dans les couches V et
Via rappelle la microgyrie observée entre 22 et 28 semaines après la conception chez la femme ;

. les lésions corticales diffuses et les kystes de la substance
20 blanche constituent un modèle de lésions observées en période périnatale chez l'être humain : leucomalacie périventriculaire du prématuré et accident cortico-souscortical du nouveau-né à terme.

Le modèle décrit ci-dessus, qui constitue un bon modèle des
25 lésions cérébrales du nouveau-né à terme ou prématuré humain, permet de tester des substances qui pourraient présenter un effet de neuro-protection dans le cadre des lésions cérébrales d'origine pré ou périnatales du nouveau-né prématuré et à terme.

P. Gressens et al. ont montré, dans l'article précité, qu'à J_N le VIP protège les lésions corticales et qu'à J_N+5 , le VIP protège la substance blanche mais pas les lésions corticales. En effet, il semble que le VIP, injecté par voie intracérébrale, présente essentiellement une action préventive sur la
5 polymicrogyrie et la leucomalacie périventriculaire.

Toutefois le VIP a l'inconvénient de n'être actif que par voie intracérébrale et seulement à titre préventif ; cela présente donc un intérêt limité, pour une utilisation chez le prématuré ou le nouveau-né.

Les Inventeurs se sont en conséquence donné pour but de
10 . pourvoir à des composés qui puissent être administrés par voie générale (parentérale ou orale) et qui puissent avoir aussi bien une action préventive qu'une action curative.

La présente Invention a pour objet l'utilisation d'un analogue du VIP pour l'obtention d'un médicament destiné à prévenir et/ou à traiter
15 les lésions cérébrales du fœtus, du nouveau-né prématuré ou à terme ou du jeune nourrisson humains.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ledit analogue du VIP est sélectionné dans le groupe constitué par les analogues cycliques du VIP et des dérivés du VIP non cycliques de 28 amino-
20 acides comprenant en position N-terminale un groupe N-acétyle, puis Glu en position 8 (Glu⁸), Lys en position 12 (Lys¹²), norleucine en position 17 (Nle¹⁷), Ala en position 19 (Ala¹⁹), X1 en position 21, X2 en position 25, Leu en position 26 (Leu²⁶), Lys en positions 27 et 28 (Lys²⁷ et Lys²⁸), Gly en position 29 et 30 (Gly²⁹ et Gly³⁰) et Thr en position 31(Thr³¹), X1 représentant Lys (Lys²¹) ou Nle
25 (Nle²¹) et X2 représentant Asp (Asp²⁵) ou Asn (Asn²⁵).

Un certain nombre de ces analogues cycliques du VIP ont notamment été décrits dans la Demande de Brevet Européen 0 536 741 (HOFFMAN-LAROCHE). Un analogue cyclique du VIP est un peptide dans lequel la chaîne latérale d'un des acides aminés dudit peptide est attaché, de

manière covalente, à la chaîne latérale d'un autre acide aminé dudit peptide. Plus de 70 analogues cycliques du VIP sont décrits dans cette Demande de Brevet européen n° 0 536 741.

Il a été montré qu'ils ont une action intéressante sur la relaxation du muscle lisse trachéo-bronchial et qu'en outre, ils présentent une biodisponibilité significativement améliorée par rapport au VIP. En outre, ils ne présentent pas d'effets indésirables cardiovasculaires.

Les Inventeurs ont trouvé, de manière surprenante, que ces différents analogues du VIP ont aussi bien un effet protecteur que curatif sur les lésions cérébrales mimant les lésions observées chez le nouveau-né à terme ou chez le prématuré, de préférence chez le prématuré et qu'ils pouvaient être administrés par voie systémique (voie parentérale ou voie orale, par exemple), car ils passent effectivement la barrière hématoencéphalique.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'Invention, ledit analogue de VIP cyclique présente de préférence l'une des séquences suivantes :

Ac-HSDAVFTENYTKLRKQNL^eAAKKYLNDLKKGGT-NH₂ (SEQ ID NO:2)

Ac-HSDAVFTENYTKLRKRN^eAAKKYLNDLKKGGT-NH₂ (SEQ ID NO:3)

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, l'analogue du VIP non cyclique selon l'invention présente de préférence l'une des séquences suivantes :

Ac-HSDAVFTENYTKLRKQNL^eAAKKYLNDLKKGGT-NH₂ (SEQ ID NO:4)

Ac-HSDAVFTENYTKLRKQNL^eAAKN^eYLNNLKKGGT-NH₂ (SEQ ID NO:5)

Alors que le VIP injecté par voie intracérébrale protège le cerveau de la souris contre les lésions induites par l'iboténate au niveau du cortex cérébral à J_N et de la substance blanche à J_N + 5, les différents analogues VIP protègent par voie systémique (voie intrapéritonéale dans le cas de la souris), de manière significative, la substance blanche à J_N + 5 et le cortex à J_N.

De manière surprenante, ces effets à $J_N + 5$ s'observent si les analogues du VIP sont administrés dans les 8 à 12 heures après l'injection d'iboténate, ce qui signifie qu'ils peuvent être utilisés en traitement curatif.

De manière surprenante, les Inventeurs ont trouvé que de tels dérivés protègent le cerveau en développement, surtout la substance blanche, contre des lésions cérébrales ressemblant aux lésions du nouveau-né prématuré, et dans une moindre mesure du nouveau-né à terme ou à certaines lésions ischémiques touchant le cerveau foetal.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit analogue de VIP est destiné à être administré à une dose unitaire comprise entre 2 à 5 mg/kg, de préférence de 4 mg/kg par voie parentérale ou par voie orale.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre les résultats comparatifs obtenus avec le VIP (SEQ ID NO:1) et deux VIP cycliques respectivement de SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3, sur la taille des lésions corticales en μm , lorsque l'iboténate est administré à J_N ;

- les figures 2 et 3 illustrent l'effet du VIP cyclique de SEQ ID NO:2 sur les lésions corticales et sur les lésions de substance blanche, cinq jours après la naissance (J_N+5) ; les injections sont effectuées soit par voie intracérébrale, soit par voie intrapéritonéale, simultanément ou après l'injection d'iboténate ;

- les figures 4 et 5 correspondent à une étude comparée des effets des analogues de VIP cyclique de SEQ ID NO:2 et de SEQ ID NO:3 administrés par voie intrapéritonéale par rapport au VIP injecté par voie

intracérébrale à J_N+5 : effets sur les lésions corticales (figure 4) et effets sur les lésions de substance blanche (figure 5).

Dans l'ensemble de ces figures : * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ (ANOVA + test de comparaison multiple de Dunnett par rapport aux
5 contrôles (iboténate seul)).

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE :

10 Les souris sont préparées comme décrit dans *J Clin. Investig.* précité.

Le VIP est injecté par voie intracérébrale à raison de 1 μg (dose par animal) et les VIP cycliques ont été injectés par voie intrapéritonéale à raison de 10 μg (dose par animal).

15 On observe :

- à J_N , c'est-à-dire le jour de la naissance, une diminution significative de la taille des lésions corticales, exprimées en μm , lorsque l'iboténate est administré en même temps que le VIP ou l'un des analogues cycliques du VIP ;

20 - à J_N+5 , une diminution de la taille des lésions de substance blanche significative aussi bien après injection par voie intracérébrale que par voie intrapéritonéale de l'analogue cyclique du VIP de SEQ ID NO:2 (figure 2), alors que la diminution de la taille des lésions corticales, exprimée en μm (figure 3) n'est significative que lorsque l'analogue cyclique du VIP de SEQ ID
25 NO:2 est administré par voie parentérale.

La figure 2 montre également que le VIP administré par voie intrapéritonéale ne présente aucune activité sur les lésions de substance blanche, alors qu'aux mêmes doses l'analogue cyclique du VIP de SEQ ID NO:2 présente une activité significative.

Ces résultats montrent un effet particulièrement significatif du VIP cyclique de SEQ ID NO:2 dans la neuroprotection de la substance blanche.

5 Ces résultats sont particulièrement intéressants du fait qu'un tel modèle reproduit les lésions du prématuré humain.

Les figures 4 et 5 montrent que l'analogue cyclique du VIP de SEQ ID NO:2, injecté par voie intracérébrale ou par voie intrapéritonéale, protège significativement la substance blanche et assure une certaine protection du cortex cérébral, surtout en intrapéritonéale, à J_N+5 .

10 Ces effets à J_N+5 s'observent si l'analogue cyclique du VIP de SEQ ID NO:2 est administré dans les 8 à 12 premières heures après l'injection d'iboténate ; ceci signifie qu'on dispose chez l'homme d'un délai de 12 heures pour agir en cas de lésion cérébrale. Le traitement dans ce laps de temps est important.

15 Ces résultats montrent également que l'analogue cyclique de VIP de SEQ ID NO:3, injecté par voie intrapéritonéale, reproduit les effets neuroprotecteurs de l'analogue cyclique de VIP de SEQ ID NO:2, tant au niveau du cortex à J_N que de la substance blanche à J_N+5 .

20 L'ensemble de ces résultats montrant que l'analogue cyclique de VIP de SEQ ID NO:2 et son dérivé, l'analogue cyclique de VIP de SEQ ID NO:3 possèdent des propriétés anti-excitotoxiques permettant, dans un modèle animal *in vivo*, de protéger le cerveau en développement (surtout la substance blanche) contre des lésions cérébrales ressemblant aux lésions du nouveau-né prématuré ou à certaines lésions ischémiques touchant le cerveau
25 foetal.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du

technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDEICATIONS

1°) Utilisation d'un analogue du VIP pour l'obtention d'un médicament destiné à prévenir et/ou à traiter les lésions cérébrales du fœtus, du nouveau-né prématuré ou à terme ou du jeune nourrisson humains.

5 2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit analogue du VIP est sélectionné dans le groupe constitué par les analogues cycliques du VIP et des dérivés du VIP non cycliques de 28 acides aminés comprenant en position N-terminale un groupe N-acétyle, puis Glu en position 8 (Glu⁸), Lys en position 12 (Lys¹²), norleucine en position 17 (Nle¹⁷),
10 Ala en position 19 (Ala¹⁹), X1 en position 21, X2 en position 25, Leu en position 26 (Leu²⁶), Lys en positions 27 et 28 (Lys²⁷ et Lys²⁸), Gly en position 29 et 30 (Gly²⁹ et Gly³⁰) et Thr en position 31 (Thr³¹), X1 représentant Lys (Lys²¹) ou Nle (Nle²¹) et X2 représentant Asp (Asp²⁵) ou Asn (Asn²⁵).

15 3°) Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que ledit analogue de VIP est destiné à être administré par voie systémique.

4°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit analogue de VIP cyclique présente de préférence l'une des séquences suivantes :

20 **Ac**-HSDAVFTENYTKLRKQ**Nle**AAKKYLN DLKKG**GT**-NH₂ (SEQ ID NO:2)

Ac-HSDAVFTENYTKLRK**RNle**AAKKYLNDLKKG**GT**-NH₂ (SEQ ID NO:3)

5°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'analogue du VIP non cyclique présente de préférence l'une des séquences suivantes :

25 **Ac**-HSDAVFTENYTKLRKQ**Nle**AAKKYLNDLKKG**GT**-NH₂ (SEQ ID NO:4)

Ac-HSDAVFTENYTKLRKQ**Nle**AAKN**le**YLN**NL**KKKG**GT**-NH₂ (SEQ ID NO:5)

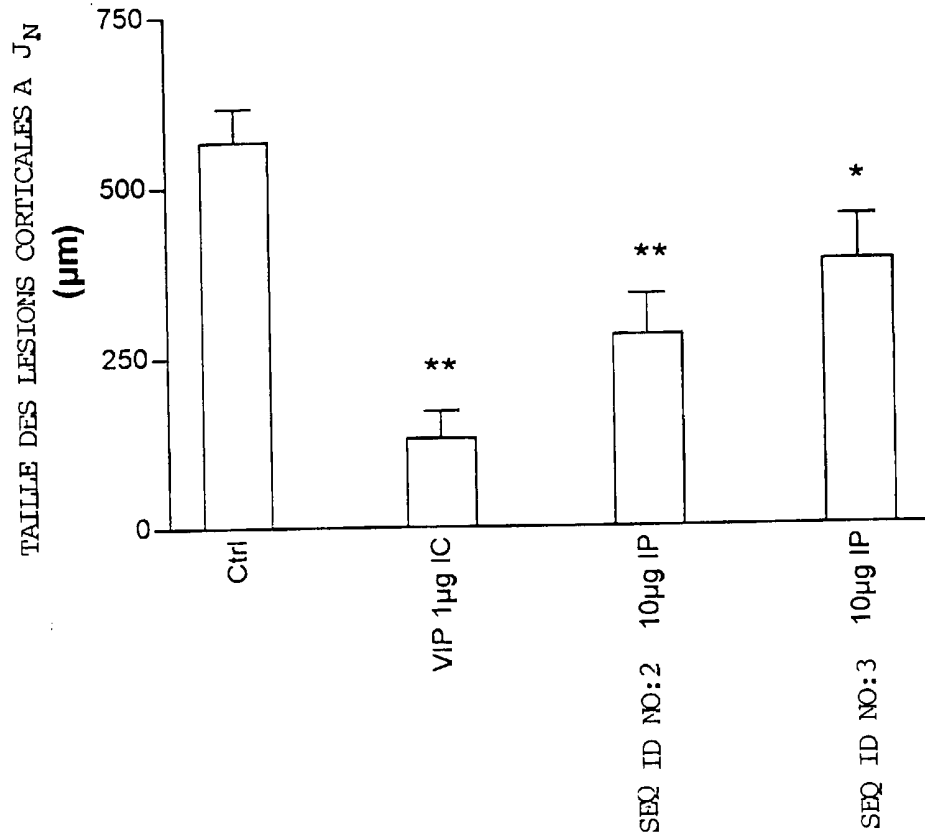
6°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que dans le traitement des lésions cérébrales de la substance blanche du nouveau-né humain prématuré, ledit médicament est

destiné à être administré dans les 8 à 12 heures après l'apparition desdites lésions.

7°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à être
5 administré à une dose unitaire comprise entre 2 à 5 mg/kg, de préférence de 4 mg/kg, par voie parentérale ou par voie orale.

1/3

T0h-IC/IP

FIGURE 1

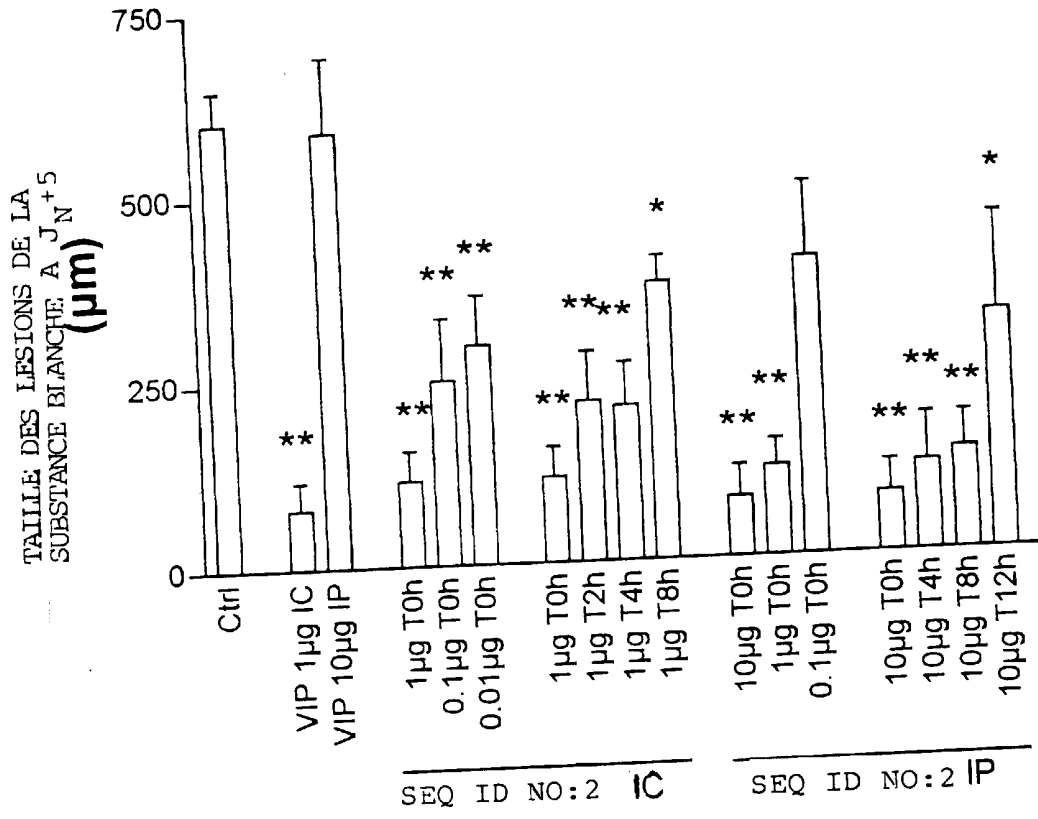


FIGURE 2

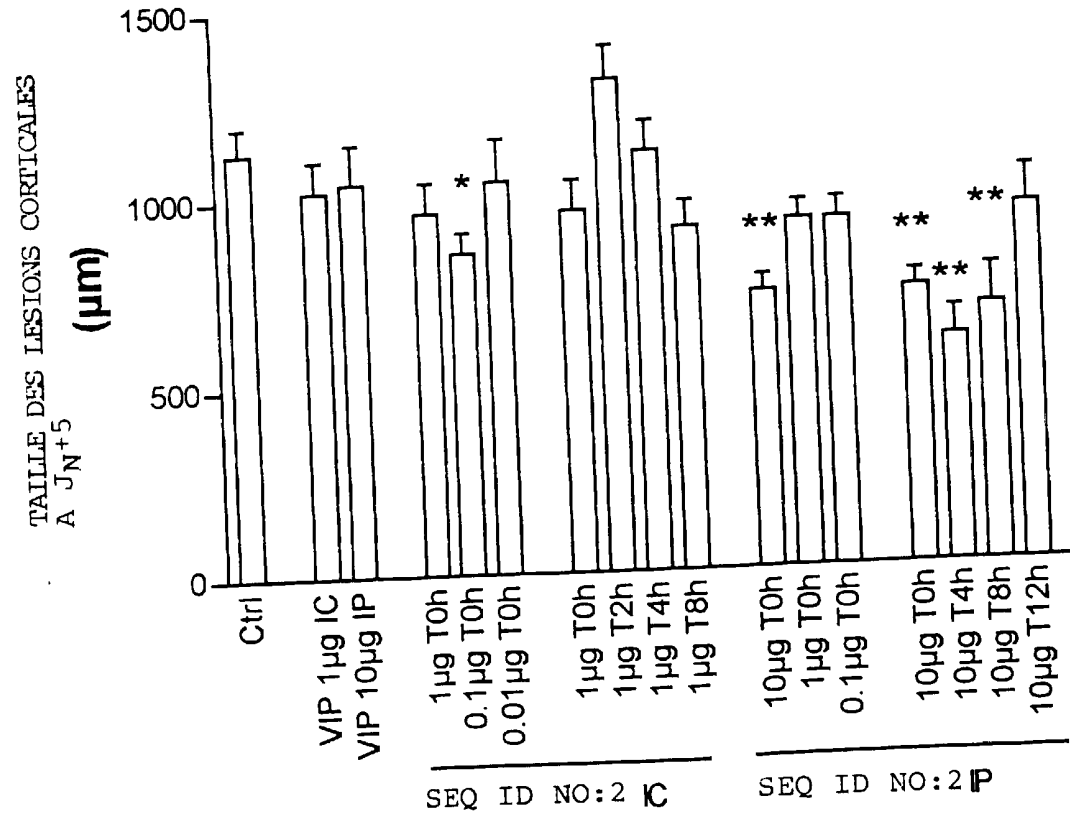


FIGURE 3

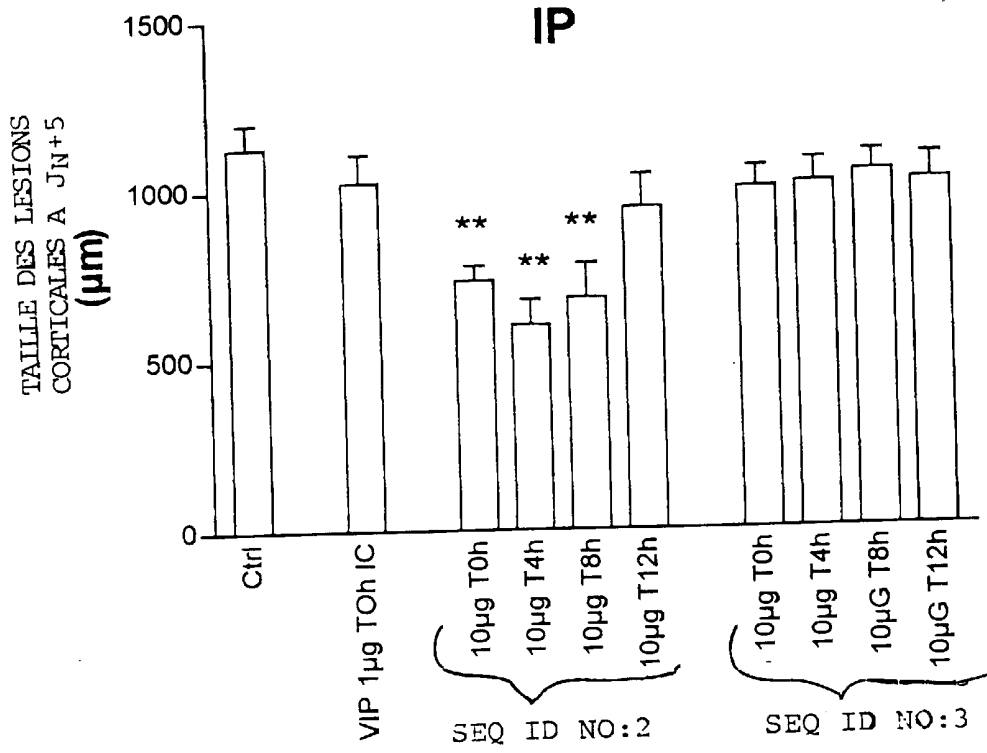


FIGURE 4

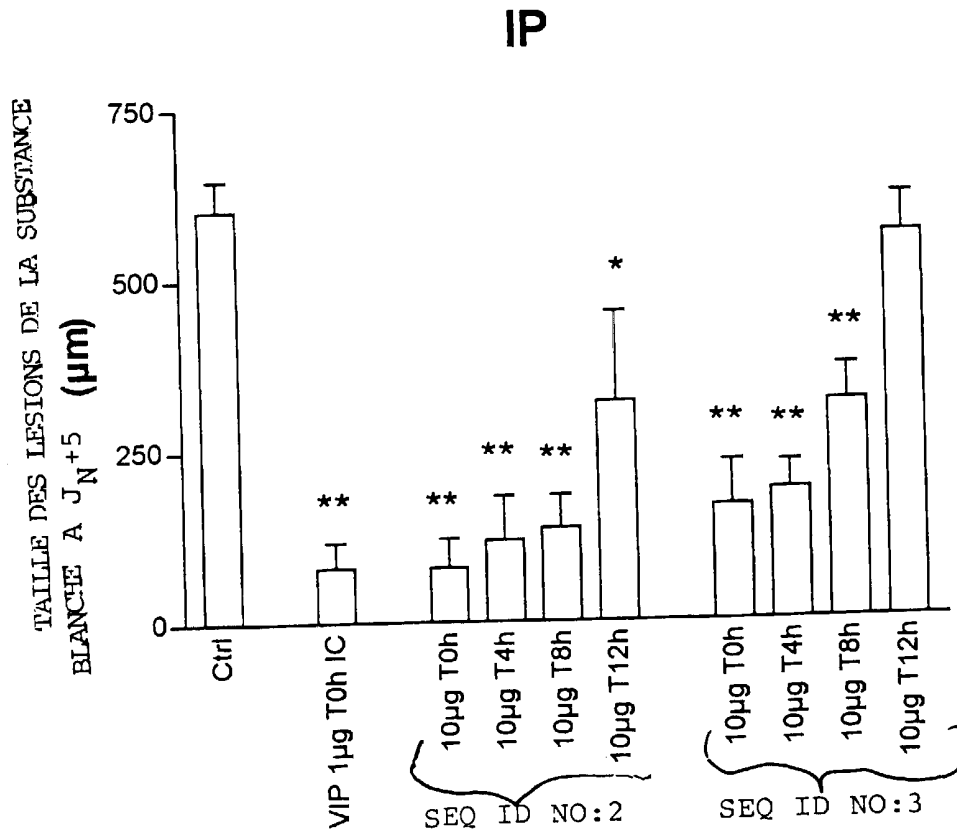


FIGURE 5

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 558325
FR 9803125

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	GRESENS P ET AL: "Vasoactive intestinal peptide prevents excitotoxic cell death in the murine developing brain." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, (1997 JUL 15) 100 (2) 390-7, XP002086874 * le document en entier *	1,3,6,7
X	WU J.Y. ET AL.: "Neurobehavioral development of neonatal mice following blockade of VIP during the early embryonic period" PEPTIDES, vol. 18, no. 8, 1997, pages 1131-1137, XP002086875 * le document en entier *	1,3,6,7
A	HILL, JOANNA M. ET AL: "Blockade of VIP during neonatal development induces neuronal damage and increases VIP and VIP receptors in brain" ANN. N. Y. ACAD. SCI. (1994), 739(MODELS OF NEUROPEPTIDE ACTION), 211-225, XP002086876 * le document en entier *	1-7
A	EP 0 620 008 A (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY) 19 octobre 1994 * le document en entier *	1-7
A	WO 97 29126 A (HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 14 août 1997 * le document en entier *	1-7
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		A61K C07K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
7 décembre 1998		Moreau, J
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<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 L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1