

(12) BREVET D'INVENTION BELGE

(47) Date de publication : 26/10/2020

(21) Numéro de demande : BE2019/5501

(22) Date de dépôt : 01/08/2019

(62) Divisé de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : A61K 31/575, A61P 25/00, A61P 43/00

(30) Données de priorité :

(73) Titulaire(s) :

DENDROGENIX

4000, LIEGE
Belgique

(72) Inventeur(s) :

SILVENTE Stéphane
4000 LIEGE
Belgique

MARLIER Quentin
4000 LIEGE
Belgique

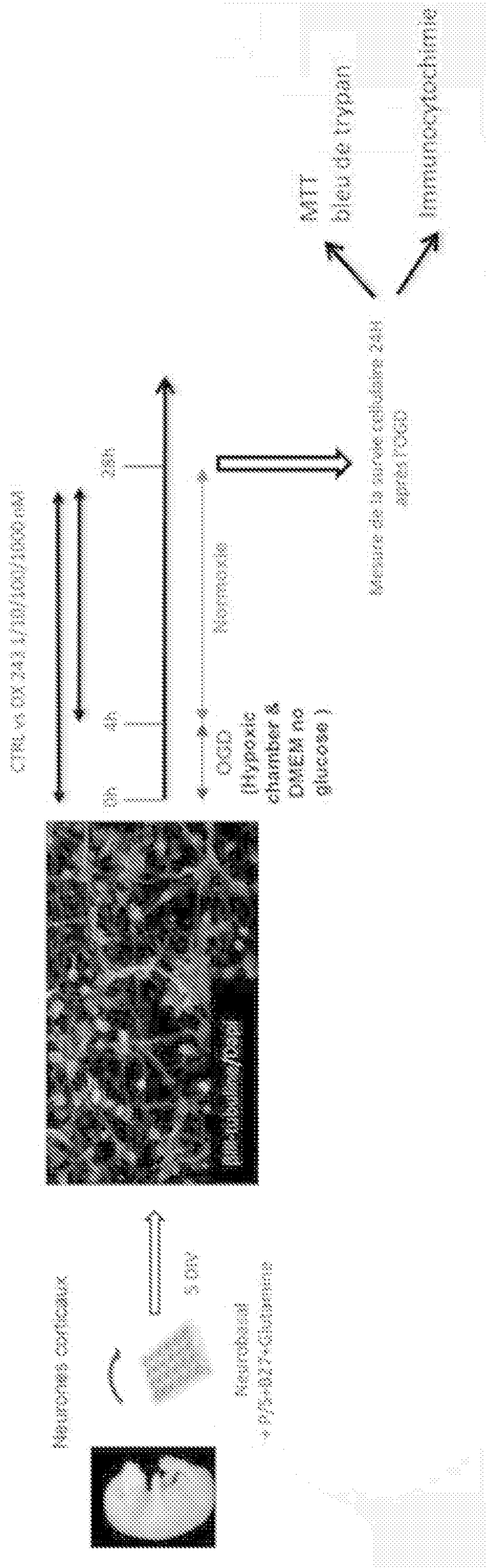
RIVES Arnaud
4000 LIEGE
Belgique

CARON Nicolas
4000 LIEGE
Belgique

(54) Composition de dérivés de stéroïdes pour son utilisation dans le traitement d'une pathologie neuronale liée à une hypoxie et/ou à une hypoglycémie et composition correspondante

(57)Composition pour traiter une pathologie neuronale d'un sujet, ladite pathologie neuronale étant liée à une hypoxie et/ou à une hypoglycémie affectant des cellules du système nerveux central.

[Fig. 1]



Composition de dérivés de stéroïdes pour son utilisation dans le traitement d'une pathologie neuronale liée à une hypoxie et/ou à une hypoglycémie et composition correspondante

5

Domaine technique

[0001] L'invention se rapporte au domaine des pathologies neuronales liées à la déprivation de glucose et/ou d'oxygène. Plus précisément, l'invention concerne un composé de formule (I) ou un sel pharmaceutiquement acceptable d'un tel composé, pour son utilisation dans le traitement et/ou la prévention d'une ischémie cérébrale ou un accident vasculaire cérébral ou un traumatisme crânien ou une lésion cérébrale due à une hypoglycémie liée à un diabète.

10

Arrière-plan technologique

[0002] Une ischémie est une diminution de l'apport sanguin à un organe, l'ischémie cérébrale est donc la diminution de l'apport sanguin à au moins une partie du cerveau. L'ischémie provoque donc l'interruption à la fois de l'apport d'oxygène, de l'apport en nutriments, comme le glucose, et de l'élimination des molécules toxiques résultant du métabolisme anaérobie.

15

[0003] L'ischémie cérébrale est impliquée notamment dans les accidents vasculaires cérébraux (AVC) communément appelés "attaques cérébrales", et les traumatismes crâniens.

20

[0004] Les AVC représentent la troisième cause de mortalité derrière les maladies cardiovasculaires et le cancer. Mais ce sont les premières causes d'invalidité lourde et les deuxièmes causes de démence dans le monde occidental. A l'origine des AVC, on trouve une perturbation de l'irrigation sanguine du cerveau. Près de 85 % des AVC sont de nature ischémique c'est à dire dus à l'obstruction d'un vaisseau sanguin par un caillot, réduisant l'irrigation sanguine dans une zone cérébrale. Le caillot peut se former localement dans une petite artère ou venir du cœur ou d'une lésion de la paroi d'une des grosses artères cervicales. Cette obstruction entraîne une ischémie cérébrale et empêche donc un apport suffisant en oxygène et en métabolites, comme le glucose, pour répondre à la demande métabolique et énergétique du système nerveux central. Les conséquences sont d'autant plus importantes que le cerveau n'est pas en mesure de passer d'un métabolisme aérobie

25

30

à un métabolisme anaérobie pour produire l'énergie dont il a besoin. Ainsi certaines cellules du cerveau peuvent mourir.

5 [0005] Les conséquences des AVC dépendent de nombreux facteurs : la vitesse de rétablissement de la circulation sanguine, la durée de la privation en oxygène et/ou en métabolites, comme le glucose, et/ou la localisation cérébrale de l'accident. Les manifestations cliniques se traduisent, selon le territoire atteint, par une paralysie plus ou moins étendue, une perte de la parole ou du langage, ou encore un coma, avec des risques séquellaires invalidants.

10 [0006] Un traumatisme crânien peut être bénin ou grave, avec tous les intermédiaires possibles. Sa gravité dépend de l'existence de lésions intra-cérébrales ou de l'existence d'un hématome extra-cérébral, saignement situé entre le crâne et le cerveau. Un traumatisme crânien peut s'accompagner de contusions, de lésions des neurones, d'un œdème, d'hémorragies intra-cérébrales et/ou d'une ischémie.

15 [0007] L'ischémie cérébrale est la menace majeure qui pèse sur le devenir fonctionnel et anatomique du cerveau traumatisé. Il s'agit là d'une ischémie globale, diffuse, ou multicentrique, qui touche le cortex cérébral comme l'auraient fait une anoxie ou un arrêt cardiaque. L'ischémie touche l'ensemble de la substance grise, partie des tissus du système nerveux central ayant la demande métabolique la plus forte en oxygène et en glucose. Toutes les fonctions cérébrales sont ainsi menacées. La perte cellulaire peut
20 alors être massive et marquée par une atrophie cérébrale visible.

[0008] L'ischémie peut prendre une autre forme plus locale. La microcirculation des tissus situés autour d'un foyer de contusion ou d'hémorragie est menacée par une vasoconstriction, l'effet d'une compression tissulaire, des micro-thromboses capillaires, ou encore des désordres du métabolisme cellulaire. La production d'énergie de la cellule est
25 compromise car son métabolisme oxydatif est en panne. Des produits toxiques comme les radicaux libres sont libérés. Le moindre événement respiratoire ou circulatoire peut alors précipiter les cellules en dessous du seuil de viabilité.

[0009] Les conséquences des traumatismes crâniens peuvent être des atteintes physiques de type paraplégie, hémiplégie, troubles de la vue... Elles peuvent être aussi des atteintes
30 neuropsychologiques affectant la mémoire, l'attention, la capacité à communiquer. Enfin elles modifient le comportement et la personnalité du blessé et son quotidien, ainsi que celui de ses proches.

[0010] Certains cas de diabète présentent une hypoglycémie couplée à une hypoxie dont les conséquences sont délétères pour les patients touchés.

[0011] L'hypoglycémie est la complication clinique la plus répandue dans la gestion quotidienne des diabétiques traités à l'insuline, et continue d'être le facteur limitant dans la gestion glycémique du diabète. L'hypoglycémie sévère touche 40% des diabétiques traités à l'insuline et peut entraîner des lésions cérébrales, en particulier au niveau des neurones vulnérables du cortex et de l'hippocampe. Par exemple, les déficits d'apprentissage et de mémoire sont une conséquence directe de cette lésion neuronale de l'hippocampe provoquée par une hypoglycémie sévère.

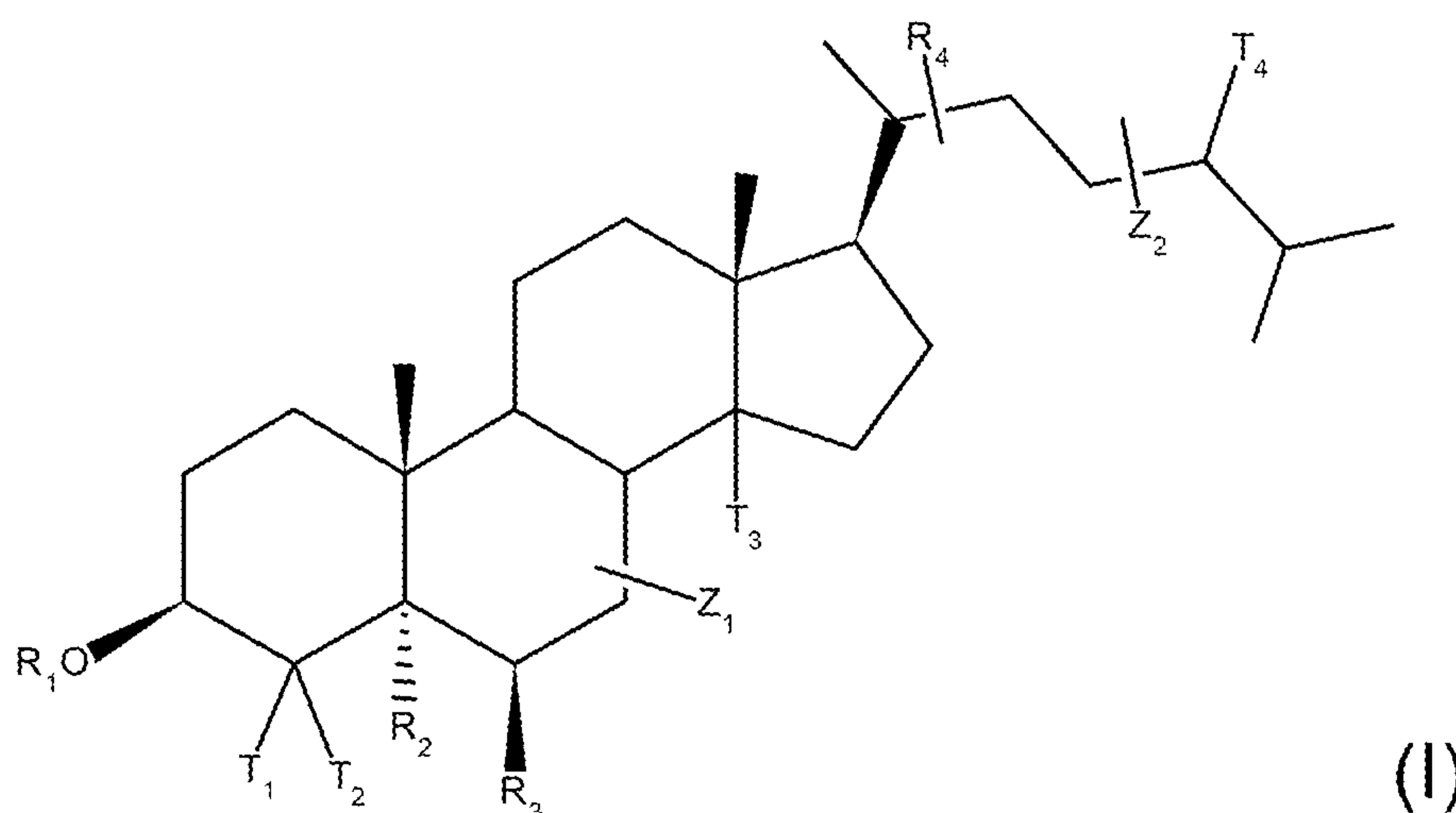
[0012] De plus, l'association d'un diabète et d'une d'hyperglycémie aggrave les dommages neuronaux consécutifs à d'autres formes d'atteinte du système nerveux central, comme les accidents vasculaires cérébraux.

[0013] Il est donc nécessaire de pouvoir traiter au moins en partie les conséquences des déprivations en oxygène et/ou en glucose, comme lors d'une ischémie cérébrale, suite à une hypoglycémie ou encore suite à une hypoxie, sur les patients pour améliorer leur récupération.

Résumé

[0014] Une idée à la base de l'invention est de fournir des traitements préventifs et/ou curatifs de maladies neurologiques touchant notamment les neurones du système nerveux central impliquant une hypoxie et/ou une hypoglycémie.

[0015] Pour cela, l'invention fournit une composition pour son utilisation dans le traitement d'une pathologie neuronale d'un sujet, ladite pathologie neuronale étant liée à une hypoxie et/ou à une hypoglycémie affectant des cellules du système nerveux central, ladite composition comprenant au moins un composé de formule (I) :



formule dans laquelle

R₁ = H, C_nH_{2n+1} ou R-CO avec R = H ou C_nH_{2n+1}, avec n ≤ 16 ;

R₂ = H ou OH ;

$R_3 = -NR_5R_6$,

R_5 étant H ou $-(CH_2)_3NH_2$, et

R_6 étant pris dans le groupe formé par $-(CH_2)_3NH(CH_2)_4NHR_7$; $-(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHR_7$;
 $-(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHR_7$; $-(CH_2)_3NHR_7$; $-(CH_2)_4NHR_7$ avec $R_7 = H$ ou $COCH_3$;

5 $-(CH_2)_2$ -imidazol-4-yl ; $-(CH_2)_2$ -indol-3-yl ; et

$R_4 = H$ ou OH en position 20, 22, 24, 25, 26 ou 27, positionné de façon à créer un centre
 asymétrique de configuration R ou S ;

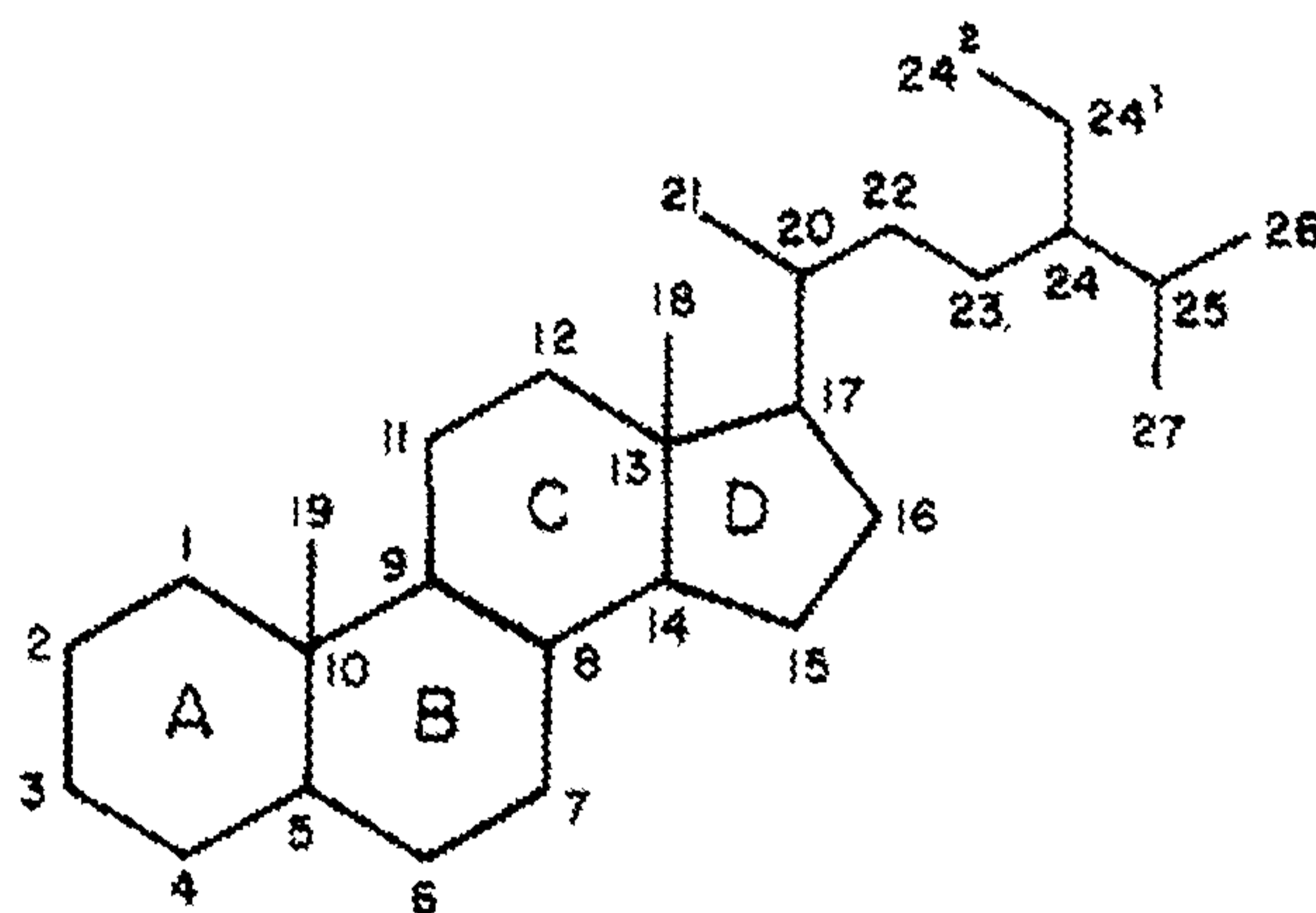
Z_1 et Z_2 représentent chacun le nombre de double liaisons entre les atomes de carbone
 C7 et C8 et C22 et C23 respectivement (soit 0 soit 1) ; T_1 , T_2 et $T_3 = H$ ou CH_3

10 indépendamment les uns des autres ; $T_4 = H$, CH_3 , C_2H_5 positionné de façon à obtenir un
 centre asymétrique de configuration R ou S en position 24 ;

et/ou au moins un sel pharmaceutiquement acceptable d'au moins un composé de formule
 (I).

15 [0016] Le substituant $COOC(CH_3)_3$ est aussi appelé Boc.

[0017] Le composé de formule (I) appartient au groupe des stéroïdes. La numérotation des
 atomes de carbone du composé de formule (I) suit donc la nomenclature définie par
 l'IUPAC dans Pure & Appl. Chem., Vol.61, No.10, pp.1783-1822,1989. La numérotation
 des atomes de carbone d'un composé appartenant au groupe des stéroïdes selon l'IUPAC
 20 est illustrée ci-dessous :



[0018] Les méthodes de préparation du composé de formule (I) ont déjà été décrites
 auparavant, et notamment dans DE MEDINA, P. et al. Synthesis of New
 Alkylaminooxysterols with Potent Cell Differentiating Activities: Identification of Leads for
 25 the Treatment of Cancer and Neurodegenerative Diseases. Journal of Medicinal
 Chemistry, 52(23), 2009, pp. 7765-7777.

[0019] En outre, la composition peut posséder une ou plusieurs caractéristiques suivantes, considérées isolément ou en combinaison.

[0020] Selon un mode de réalisation, le composé de formule (I) est défini par $Z_2 = 0$; $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = OH$; $R_5 = H$; et $T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = H$.

5 [0021] Selon un mode de réalisation, le composé de formule (I) est défini par $Z_1 = 0$ et $R_5 = H$.

[0022] Selon un mode de réalisation, le composé de formule (I) est défini par $R_6 = -(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHR_7$ avec $R_7 = COCH_3$.

[0023] Selon un mode de réalisation, le composé de formule (I) est défini par $R_6 = -(CH_2)_2$ -imidazol-4-yl.

10 [0024] Selon un mode de réalisation, le composé de formule (I) est défini par $R_6 = -(CH_2)_3NH(CH_2)_4NHR_7$, $-(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHR_7$, $-(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHR_7$; ou $-(CH_2)_4NHR_7$; et $R_7 = H$.

[0025] Selon un mode de réalisation, le composé de formule (I) est défini par $Z_1 = 1$ et $R_5 = H$.

15 [0026] Selon un mode de réalisation, le composé de formule (I) est défini par $R_6 = -(CH_2)_3NH(CH_2)_4NHR_7$; $-(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHR_7$; ou $-(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHR_7$; et $R_7 = H$.

[0027] Selon un mode de réalisation, le au moins un composé de formule (I), est défini par $Z_1 = Z_2 = 0$; $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = OH$; $R_5 = H$; $R_6 = (CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$; $T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = H$. Dans ce mode de réalisation le composé est appelé DX243. Les résultats obtenus avec ce composé sont particulièrement intéressants. En effet, on observe un effet curatif de ce composé contre le phénomène pathophysiologique d'hypoxie et/ou d'hypoglycémie même à de très faibles concentrations.

20

[0028] Selon un mode de réalisation, le au moins un composé de formule (I), est défini par $Z_1 = Z_2 = 0$; $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = OH$; $R_5 = H$; $R_6 = (CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$; $T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = H$. Dans ce mode de réalisation le composé est appelé DX245. Les résultats obtenus avec ce composé sont particulièrement intéressants. En effet, on observe un effet curatif de ce composé contre le phénomène pathophysiologique d'hypoxie et/ou d'hypoglycémie supérieur à celui du DX243.

25

[0029] Selon un mode de réalisation, le au moins un composé de formule (I), est défini par $Z_1 = 1$; $Z_2 = 0$; $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = OH$; $R_5 = H$; $R_6 = (CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$; $T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = H$. Dans ce mode de réalisation le composé est appelé DX242. Les résultats obtenus avec ce composé sont particulièrement intéressants. En effet, on observe un effet curatif

30

de ce composé contre le phénomène pathophysiologique d'hypoxie et/ou d'hypoglycémie supérieur à celui du DX243.

5 [0030] Selon un mode de réalisation, le au moins un composé de formule (I), est défini par $Z_1 = 1$; $Z_2 = 0$; $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = OH$; $R_5 = H$; $R_6 = (CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$; $T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = H$. Dans ce mode de réalisation le composé est appelé DX244. Les résultats obtenus avec ce composé sont particulièrement intéressants. En effet, on observe un effet curatif de ce composé contre le phénomène pathophysiologique d'hypoxie et/ou d'hypoglycémie supérieur à celui du DX243.

10 [0031] Selon un mode de réalisation, la pathologie neuronale du système nerveux central est prise dans le groupe constitué des traumatismes cérébraux et des accidents vasculaires cérébraux.

[0032] Selon un mode de réalisation, la pathologie neuronale du système nerveux central est une lésion cérébrale due à une ischémie.

[0033] Selon un mode de réalisation, l'hypoglycémie est due à un diabète.

15 [0034] Selon un mode de réalisation, l'invention fournit aussi une composition selon l'un des modes de réalisation précédents, sous forme de solution aqueuse pharmaceutiquement acceptable et présentant une concentration de composé de formule (I) comprise entre 10 nmol.L⁻¹ et 1 mmol.L⁻¹, préférentiellement entre 10 nmol.L⁻¹ et 1 µmol.L⁻¹, plus préférentiellement entre 10 nmol.L⁻¹ et 100 nmol.L⁻¹.

20 **Brève description des figures**

[0035] L'invention sera mieux comprise, et d'autres buts, détails, caractéristiques et avantages de celle-ci apparaîtront plus clairement au cours de la description suivante de plusieurs modes de réalisation particuliers de l'invention, donnés uniquement à titre illustratif et non limitatif, en référence aux dessins annexés.

25 [0036] [fig.1] La figure 1 représente schématiquement un protocole d'étude de l'efficacité de composés de formule (I), en particulier du DX243, sur un modèle in vitro d'ischémie.

[0037] [fig.2] La figure 2 illustre les résultats d'un premier test pour évaluer la survie neuronale suite à une ischémie suivie d'une reperfusion en présence de DX243.

30 [0038] [fig.3] La figure 3 illustre les résultats d'un deuxième test pour évaluer la survie neuronale après avoir subi une ischémie suivie d'une reperfusion en présence de DX243.

[0039] [fig.4] La figure 4 illustre les résultats d'un troisième test pour évaluer la survie neuronale après avoir subi une ischémie suivie d'une reperfusion en présence de DX243.

[0040] [fig.5] La figure 5 illustre les résultats du troisième test pour évaluer la survie neuronale après avoir subi une ischémie suivie d'une reperfusion en présence de composés formule (I) autre que le DX243 du tableau 1.

Description des modes de réalisation

5 [0041] On va décrire ci-dessous un protocole expérimental qui met en évidence l'effet protecteur des composés de formule (I) indiqués dans le tableau 1, dont le composé DX243, contre l'hypoxie et l'hypoglycémie.

[0042] Les concentrations ou molarités des composés sont exprimées en mole par litre dont le symbole est mol.L⁻¹ ou M.

10 [0043] En référence à la figure 1, la première étape du protocole d'étude de l'effet neuroprotecteur des composés de formule (I), en particulier ceux indiqués dans le tableau 1, consiste à obtenir une culture primaire de neurones corticaux à partir de cellules prélevées sur des cerveaux d'embryons de souris de type sauvage mises dans des conditions de culture adéquates. Plus précisément, les cellules prélevées sont crues dans
15 un milieu Neurobasal™ Medium (Ref. 21103049 ThermoFisher Scientific) auquel de la L-Glutamine et du B27 supplement 50X (Ref. 17504044 ThermoFisher Scientific) ont été ajoutés. Les neurones issus de la culture primaire sont ensuite isolés et purifiés. Il est à noter que ce sont les conditions de culture en elles-mêmes qui permettent d'obtenir une culture purifiée en neurones à partir de la dissociation des cortex embryonnaires. Une
20 déprivation en oxygène et en glucose (DOG) est alors réalisée sur ces neurones afin de mimer le plus fidèlement possible ce qu'il se passe in vivo lors d'un accident vasculaire cérébral c'est-à-dire une diminution de l'apport en oxygène et en glucose dû à une diminution de la perfusion sanguine pour les cellules. Pour réaliser cette déprivation en oxygène et en glucose mimant l'ischémie, les neurones sont placés pendant 4h dans un
25 incubateur dont l'atmosphère a une teneur en oxygène d'environ 1% et en remplaçant le milieu de culture par un milieu sans glucose. Comme le modèle d'ischémie est un modèle dit d'ischémie/reperfusion, les neurones sont ensuite placés dans un milieu contenant du glucose dans des conditions normoxiques pendant 24h (reperfusion) suite à l'étape d'ischémie. Le groupe A de neurones est un groupe de neurones ayant été traité avec une
30 solution de composé de formule (I) pendant la DOG et la reperfusion, c'est-à-dire qu'une molécule du tableau 1 est ajoutée dans le milieu sans glucose dès que la déprivation en glucose et en oxygène commence. La concentration du composé de formule (I) nommé DX243 est comprise entre 10 nmol.L⁻¹ et 1 µmol.L⁻¹ dans le milieu sans glucose. La concentration des autres molécules du tableau 1, est de 100 nmol.L⁻¹ dans le milieu sans
35 glucose. Le groupe B de neurones est un groupe de neurones ayant été traité avec une

solution de DX243 pendant la reperfusion seulement, pour se rapprocher de ce qui se passe cliniquement, à savoir le traitement possible uniquement après plusieurs heures avec un traitement conventionnel. La solution de DX243 est ajoutée au milieu sans glucose dès que la reperfusion commence. La concentration de DX243 est comprises
5 entre 10 nmol.L⁻¹ et 1 µmol.L⁻¹ dans le milieu sans glucose.

[0044] Le contrôle négatif consiste en un groupe de neurones subissant la DOG suivie de la reperfusion sans DX243 présent. Ce groupe de neurones est dénommé « Ctrl » dans les figures 2 à 4. Le contrôle normal consiste en un groupe de neurones issus de la culture primaire placé en conditions normoxiques pendant 28h. Le contrôle normal est dénommé
10 « normox » dans les figures 2 à 4. Le contrôle positif consiste en un groupe de neurones issus de la culture primaire ayant subi la DOG pendant 4h en présence de roscovitine, un inhibiteur du cycle cellulaire entraînant la mort cellulaire, suivie de la reperfusion pendant 24h. Le contrôle positif est dénommé « ROSCO » dans les figures 2 à 4.

[0045] A la fin de la reperfusion, la survie des neurones est évaluée à l'aide de trois tests
15 différents. Les résultats sont alors comparés aux résultats des trois tests de survie des groupes de contrôle.

[0046] Sur les figures 2 à 4, les étoiles indiquent la puissance statistique des résultats. Une étoile indique qu'il est certain à 95% que les résultats ne sont pas dus au hasard. La présence de 2 étoiles signifie qu'il est certains à 99% que les résultats ne sont pas dus au
20 hasard, et la présence 3 étoiles indiquent qu'il est certain à 99,9% que les résultats ne sont pas dus au hasard.

[0047] La figure 2 présente les résultats du premier test de survie neuronale dans le cas de l'utilisation du DX243. Les graphes A et C sont une représentation des résultats obtenus pour le groupe A, et les graphes B et D sont une représentation des résultats obtenus pour
25 le groupe B. Ce premier test est un test immunocytochimique qui permet de mettre en évidence les cellules vivantes et les cellules mortes.

[0048] Une première série d'images est réalisée avec un marquage chimique par fluorescence. Ce marquage est effectué avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) qui est capable de se lier fortement aux bases adénine (A) et thymine (T) de l'ADN. Il permet
30 de détecter les cellules vivantes. Une deuxième série d'images est réalisée avec un marquage par fluorescence utilisant l'anticorps CC3. L'anticorps CC3 permet de détecter la caspase 3, et donc les cellules en état d'apoptose.

[0049] Pour visualiser la proportion de neurones sains parmi les différentes conditions de cultures, l'anticorps TUJ1 est utilisé. TUJ1 réagit avec la bêta-tubuline III, une protéine
35 structurale composant la tubuline et spécifique aux neurones. La bêta-tubuline III est

largement utilisée comme marqueur pour distinguer les neurones d'autres types de cellules.

[0050] A partir de ces images, la proportion de cellules vivantes (cell survival) a été calculée en déterminant le rapport du nombre de cellules vivantes sur le nombre total de cellules.

5 La proportion de cellules en apoptose a été réalisée à l'aide du rapport entre le nombre de cellules détectées par l'anticorps CC3 sur le nombre total de cellules. Les valeurs obtenues ont été rapportées à celles obtenues par le groupe normox.

[0051] On observe que la DOG induit une diminution de la proportion de cellules vivantes sur le groupe Ctrl sur les graphes A et B de la figure 2, et une augmentation de la proportion
10 de cellules en apoptose sur le groupe Ctrl sur les graphes C et D de la figure 2. En revanche, aussi bien un traitement avec du DX243 pendant la DOG et la reperfusion qu'un traitement avec du DX243 uniquement pendant la reperfusion, protège partiellement de la mort neuronale. En effet, on observe une augmentation de la proportion de cellules vivantes et une diminution de la proportion de cellules en apoptose suite au traitement au
15 DX243 en comparaison avec le groupe Ctrl. Une concentration en DX243 située entre 10 nmol.L⁻¹ et 100 nmol.L⁻¹ semble correspondre à une gamme de concentration idéale pour maximiser les effets neuroprotecteurs.

[0052] De plus, il semble qu'un traitement post-OGD pendant 24h au DX243 protège encore plus efficacement les neurones.

20 [0053] Pour confirmer les résultats obtenus avec le DX243, un test basé sur l'activité métabolique des neurones a été réalisé pour évaluer d'une autre façon la survie neuronale. Ce test est basé l'utilisation du sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium). Le tétrazolium est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan, précipité de couleur violette. La
25 quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes mais également à l'activité métabolique de chaque cellule. Ainsi, un simple dosage de la densité optique à 550 nm par spectroscopie permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement. Etant donné que plus le nombre de cellules vivante est important, plus l'intensité colorimétrique est importante, l'intensité colorimétrique a dès
30 lors été quantifiée et rapportée à l'intensité observée en conditions normoxiques. Les résultats obtenus ont été rapportés dans le graphe A de la figure 3 pour le groupe A et dans le graphe B de la figure 3 pour le groupe B.

[0054] Sur les graphes A et B de la figure 3, on observe que la DOG entraîne une diminution marquée de cellules métaboliquement actives dans le groupe Ctrl. En revanche, le
35 traitement des neurones avec du DX243 protège partiellement de cette diminution de

survie suite à la DOG. Cet effet est d'autant plus marqué pour le groupe de neurones ayant bénéficié du DX243 que pendant la reperfusion de 24h comme le montre le graphe B de la figure 3. Sur les deux graphes, un traitement comprenant une concentration de DX243 comprise entre 10 nmol.L⁻¹ et 100 nmol.L⁻¹ semble le plus efficace.

5 [0055] Un troisième test de survie cellulaire dans le cas de l'utilisation du DX243, basé sur l'intégrité des membranes cellulaire, laquelle est rompue chez les cellules mortes, a été réalisé. Ce dernier test utilise le bleu de trypan qui colorera les cellules mortes en bleu. Le calcul du pourcentage de cellules vivantes a dès lors été effectué en comptant la proportion de cellules bleues et non-bleues, et rapporté au pourcentage de cellules
10 vivantes observé dans le groupe normox. Les résultats obtenus ont été rapportés dans le graphe A de la figure 4 pour le groupe A et dans le graphe B de la figure 4 pour le groupe B.

[0056] On observe que la DOG induit une diminution significative du nombre de cellules ayant conservé l'intégrité de leur membrane que ce soit sur le graphe A de la figure 4 ou sur le
15 graphe B de la figure 4. Le traitement des neurones avec du DX243 restore le pourcentage de cellules vivantes à des niveaux proches de celui observé dans le groupe normox, principalement avec des concentrations entre 10 nmol.L⁻¹ et 100 nmol.L⁻¹.

[0057] Le DX243 est donc efficace à des concentrations comprises entre 10 nmol.L⁻¹ et 1
µmol.L⁻¹. Pour les concentrations de DX243 comprises entre 10 nmol.L⁻¹ et 100 nmol.L⁻¹,
20 les résultats sont plus stables et l'effet protecteur du DX243 est statistiquement plus importants. Cela peut s'expliquer par la fragilité des cultures primaires à en dehors de leur environnement naturel.

[0058] Pour les molécules du tableau I autre que le DX243 utilisées sur le groupe A, seul le troisième test de survie cellulaire a été réalisé. Les résultats obtenus ont été rapportés sur
25 le graphe de la figure 5 en y incluant les résultats obtenus avec le DX243. Le sigle NT signifie non traité. La barre non hachurée NT correspond à un groupe de neurones issus de la culture primaire placé en conditions normoxiques pendant 28h. Les barres hachurées représentent des groupes de neurones issus de la culture primaire ayant subie une DOG et la reperfusion soit sans molécules du tableau 1 (barre hachurée nommée NT)
30 soit en présence d'une molécule du tableau 1.

[0059] Pour tous les composés testés à l'exception du DX243BOC, le taux de survie des groupes de neurones est supérieur à celui des groupes de neurones NT ayant subie la DOG et la reperfusion (barre hachurée NT), ils présentent donc un effet neuroprotecteur. En particulier, il est à noter que le DX245, le DX244 et le DX242 ont un taux de survie
35 supérieur à celui du DX243.

[0060] Le composé de formule (I) et défini par : $Z_1 = Z_2 = 0$; $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = OH$; $R_5 = H$; $R_6 = -(CH_2)_3-N(COOC(CH_3)_3)-(CH_2)_4-NH(COOC(CH_3)_3)$; $T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = H$ est appelé DX243BOC, illustré dans le tableau 1.

[0061] Le taux de survie du groupe traité avec DX243BOC est quant à lui inférieur à celui du groupe traité avec le DX243 et à celui du groupe NT ayant subi la DOG et la reperfusion démontrant ainsi l'importance du groupe R_3 dans l'activité du composé de formule (I).

[0062] Il est donc attendu que dans une solution aqueuse pharmaceutiquement acceptable comprenant le composé de formule (I), une concentration en composé de formule (I) comprise entre 10 nmol.L^{-1} et 1 mmol.L^{-1} , préférentiellement entre 10 nmol.L^{-1} et $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, plus préférentiellement entre 10 nmol.L^{-1} et 100 nmol.L^{-1} soit efficace.

[0063] L'ensemble de ces résultats indique que les composés du tableau 1 possèdent un effet neuroprotecteur contre l'ischémie cérébrale, et donc contre les traumatismes cérébraux et les accidents vasculaires cérébraux.

[0064] Bien que les expériences aient été réalisées avec dix composés de formule (I) différents, il est bien évident que des résultats similaires sont attendus pour les composés de formule (I) autre que ceux du tableau 1.

[0065] En outre, dans le cadre d'une hypoxie seule ou d'une hypoglycémie seule, une composante mort neuronale apoptotique est observée tel que dans KATO, et al. Recurrent short-term hypoglycemia and hyperglycemia induce apoptosis and oxidative stress via the ER stress response in immortalized adult mouse Schwann (INMS32) cells. *Neuroscience Research*, 13 novembre 2018, retrieved from <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168010218304371?via%3Dihub>> <doi : <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.11.004>>, dans Sendoel, A., et al. Apoptotic Cell Death Under Hypoxia. *Physiology*, 29, pp.168-176, 2014, ou encore dans Xu, Y., et al. Protective effect of lithium chloride against hypoglycemia-induced apoptosis in neuronal PC12 cell. *Neuroscience*, 330, 25 août 2016, pp.100-108. Or, les résultats observés ci-dessus dans le modèle d'ischémie/reperfusion montre une protection due aux composés de formule (I) face à cette composante apoptotique. De plus, une hypoglycémie est capable d'induire un stress oxydatif dans des cellules neuronales, stress oxydatif présent dans le cadre d'une déprivation en oxygène et en glucose et qui est une composante majeure de l'induction de la mort neuronale. En conséquence, des mécanismes communs induisant la mort neuronale existent dans le cadre d'une mort neuronale induite par hypoglycémie et hypoxie, par hypoglycémie seule et par hypoxie seule, tels que l'apoptose. En conclusion l'effet neuroprotecteur des composés de formules (I) s'étend aux cas d'hypoxie seule ou d'hypoglycémie seule.

[0066] L'usage du verbe « comporter », « comprendre » ou « inclure » et de ses formes conjuguées n'exclut pas la présence d'autres éléments ou d'autres étapes que ceux énoncés dans une revendication.

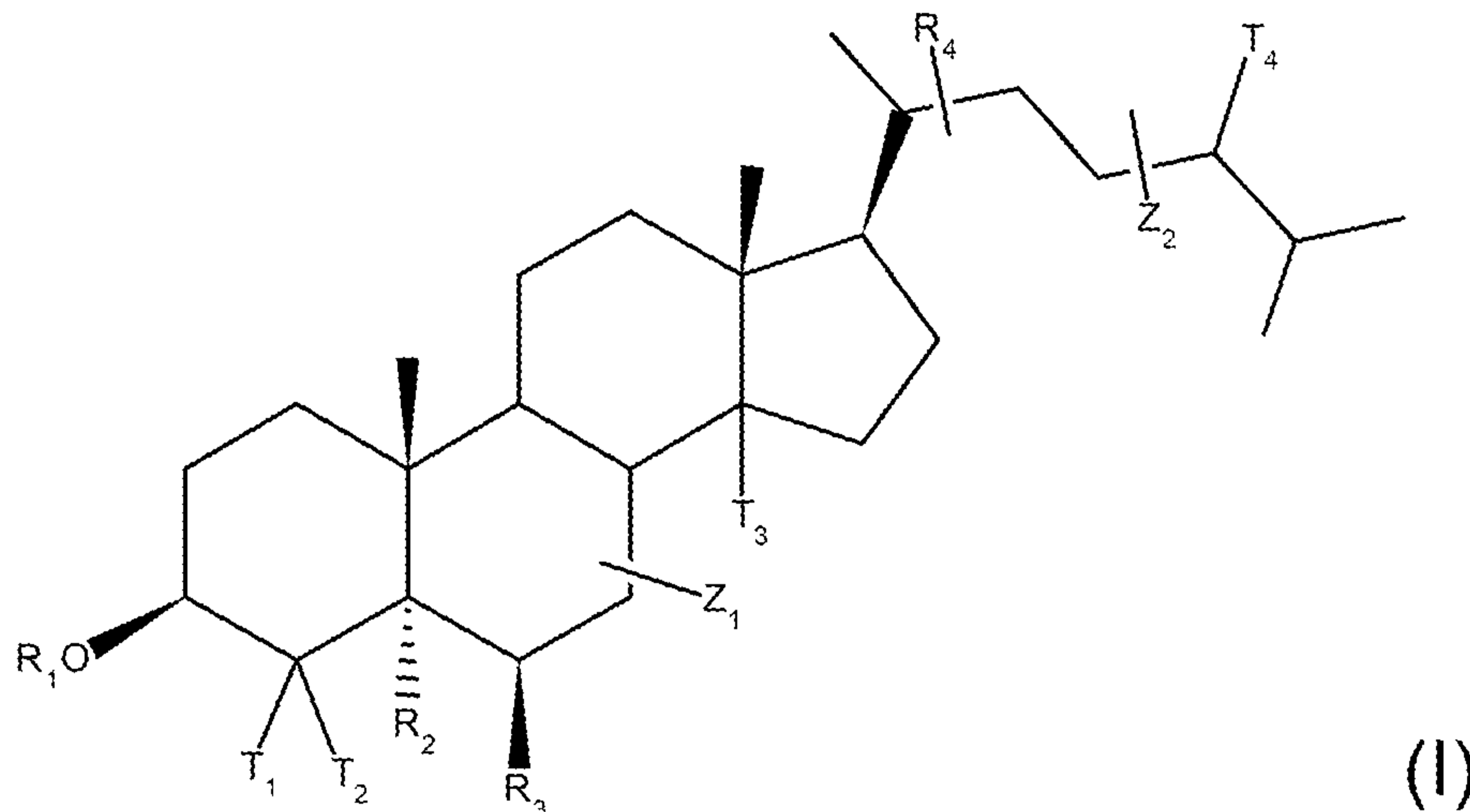
[0067] Dans les revendications, tout signe de référence entre parenthèses ne saurait être
5 interprété comme une limitation de la revendication.

[0068] Tableau 1 :

Nom	Structure	Nom	Structure
DX101		DX249	
DX243		DX301	
DX242		DX302	
DX245		DX401	
DX244		DX243BOC	

Revendications

1. Composition pour utilisation dans le traitement d'une pathologie neuronale d'un sujet liée à une hypoxie et/ou à une hypoglycémie affectant des cellules du système nerveux central, ladite composition comprenant au moins un composé de formule (I) :



formule dans laquelle,

$R_1 = \text{H}, \text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ ou R-CO avec $\text{R} = \text{H}$ ou $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$, avec $n \leq 16$;

$R_2 = \text{H}$ ou OH ;

$R_3 = -\text{NR}_5\text{R}_6$,

R_5 étant H ou $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, et

R_6 étant pris dans le groupe formé par $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NHR}_7$; $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHR}_7$;

$-(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHR}_7$; $-(\text{CH}_2)_3\text{NHR}_7$; $-(\text{CH}_2)_4\text{NHR}_7$ avec $R_7 = \text{H}$ ou COCH_3 ;

et

$-(\text{CH}_2)_2\text{-imidazol-4-yl}$; $-(\text{CH}_2)_2\text{-indol-3-yl}$;

$R_4 = \text{H}$ ou OH en position 20, 22, 24, 25, 26 ou 27, positionné de façon à créer un centre asymétrique de configuration R ou S ;

Z_1 et Z_2 représentent chacun le nombre de double liaisons entre les atomes de carbone C7 et C8 et C22 et C23 respectivement (soit 0 soit 1) ; T_1 , T_2 et $T_3 = \text{H}$ ou CH_3

indépendamment les uns des autres ; $T_4 = \text{H}$, CH_3 , C_2H_5 positionné de façon à obtenir un centre asymétrique de configuration R ou S en position 24 ;

et/ou au moins un sel pharmaceutiquement acceptable d'au moins un composé de formule

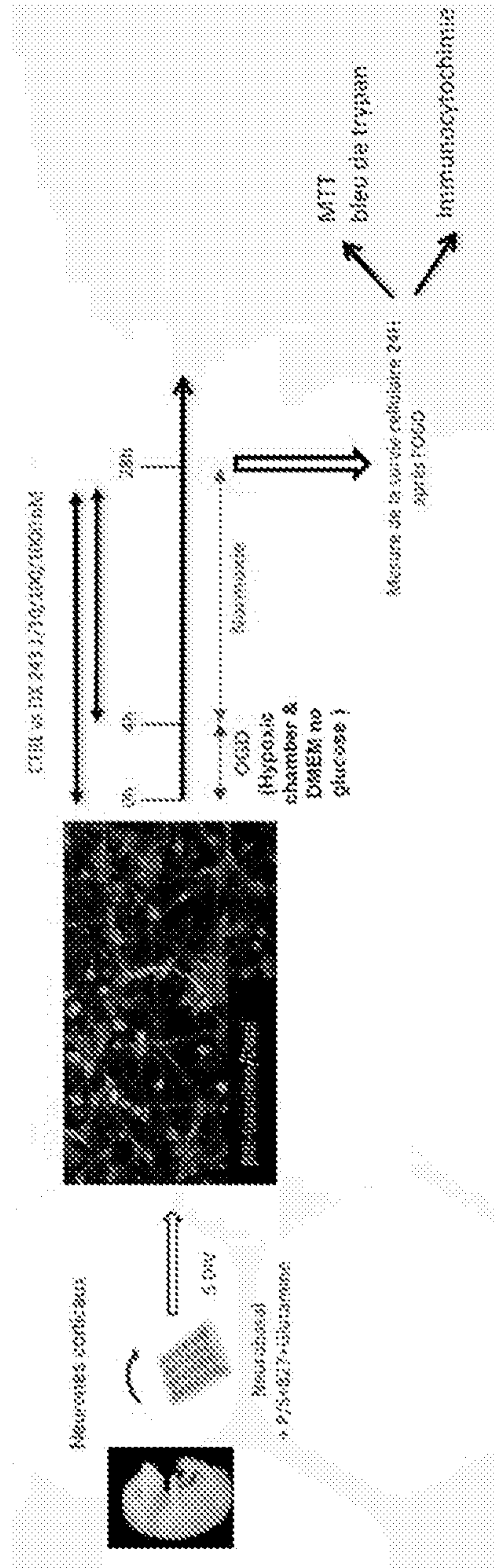
(I).

2. Composition selon la revendication 1, dans laquelle le composé de formule (I) est défini par $Z_2 = 0$; $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = OH$; $R_5 = H$; et $T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = H$.
3. Composition selon la revendication 2, dans laquelle le composé de formule (I) est défini par $Z_1 = 0$.
4. Composition selon la revendication 3, dans laquelle le composé de formule (I) est défini par $R_6 = -(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHR_7$ avec $R_7 = COCH_3$.
5. Composition selon la revendication 3, dans laquelle le composé de formule (I) est défini par $R_6 = -(CH_2)_2$ -imidazol-4-yl.
6. Composition selon la revendication 3, dans laquelle le composé de formule (I) est défini par $R_6 = -(CH_2)_3NH(CH_2)_4NHR_7$, $-(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHR_7$, $-(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHR_7$; ou $-(CH_2)_4NHR_7$; et $R_7 = H$.
7. Composition selon la revendication 2, dans laquelle le composé de formule (I) est défini par $Z_1 = 1$.
8. Composition selon la revendication 7, dans laquelle le composé de formule (I) est défini par $R_6 = -(CH_2)_3NH(CH_2)_4NHR_7$; $-(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHR_7$; ou $-(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHR_7$; et $R_7 = H$.
9. Composition selon l'une des revendications 1 à 8, dans laquelle la pathologie neuronale du système nerveux central est prise dans le groupe constitué des traumatismes cérébraux et des accidents vasculaires cérébraux.
10. Composition selon l'une des revendications 1 à 8, dans laquelle la pathologie neuronale du système nerveux central est une lésion cérébrale due à une ischémie.
11. Composition selon l'une des revendications 1 à 8, dans laquelle l'hypoglycémie est due à un diabète.
12. Composition selon l'une des revendications 1 à 8, sous forme de solution aqueuse pharmaceutiquement acceptable et présentant une concentration de composé de

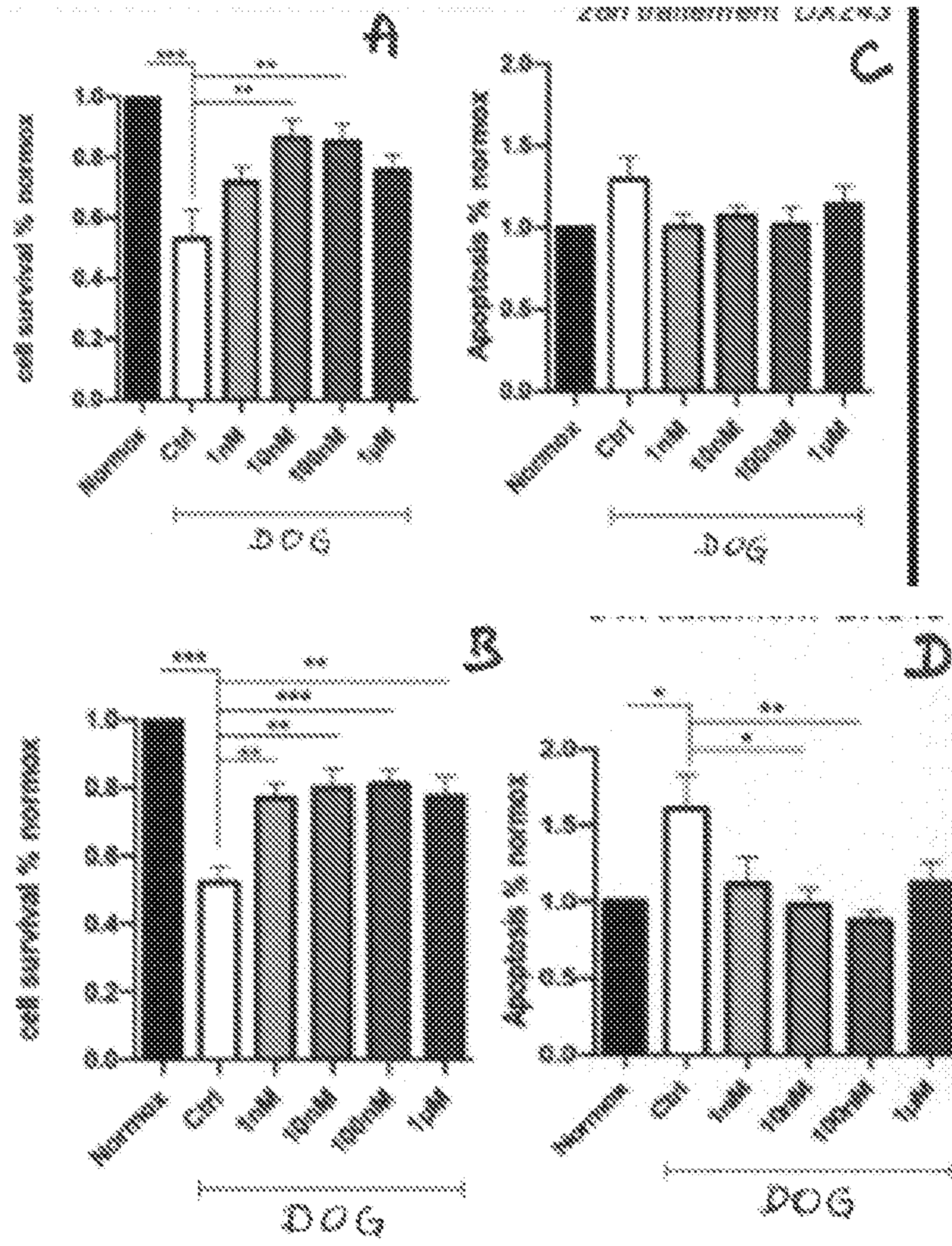
formule (I) comprise entre 10 nmol.L^{-1} et 1 mmol.L^{-1} , préférentiellement entre 10 nmol.L^{-1} et $1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, plus préférentiellement entre 10 nmol.L^{-1} et 100 nmol.L^{-1} .

⋮

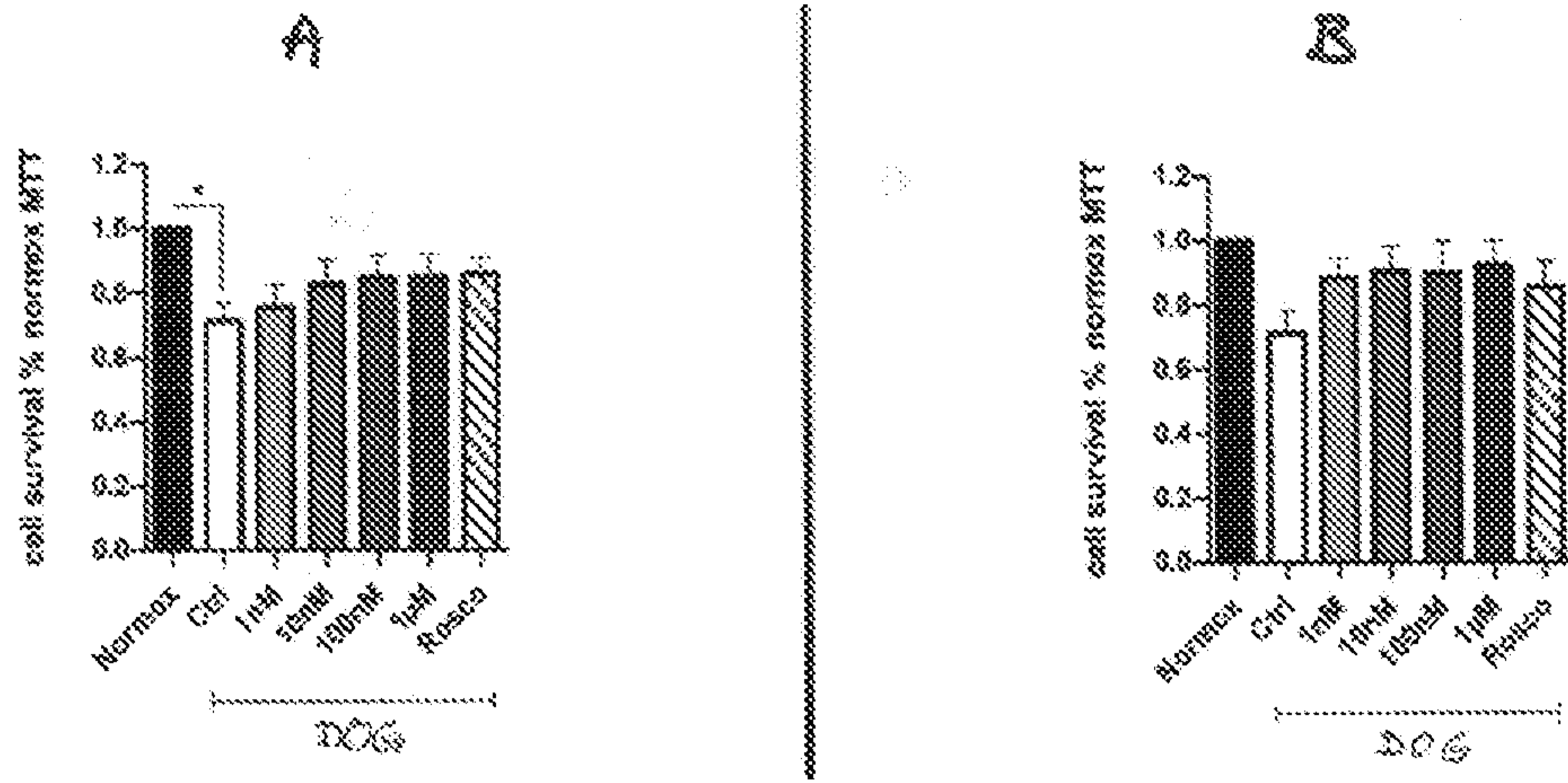
[Fig. 1]



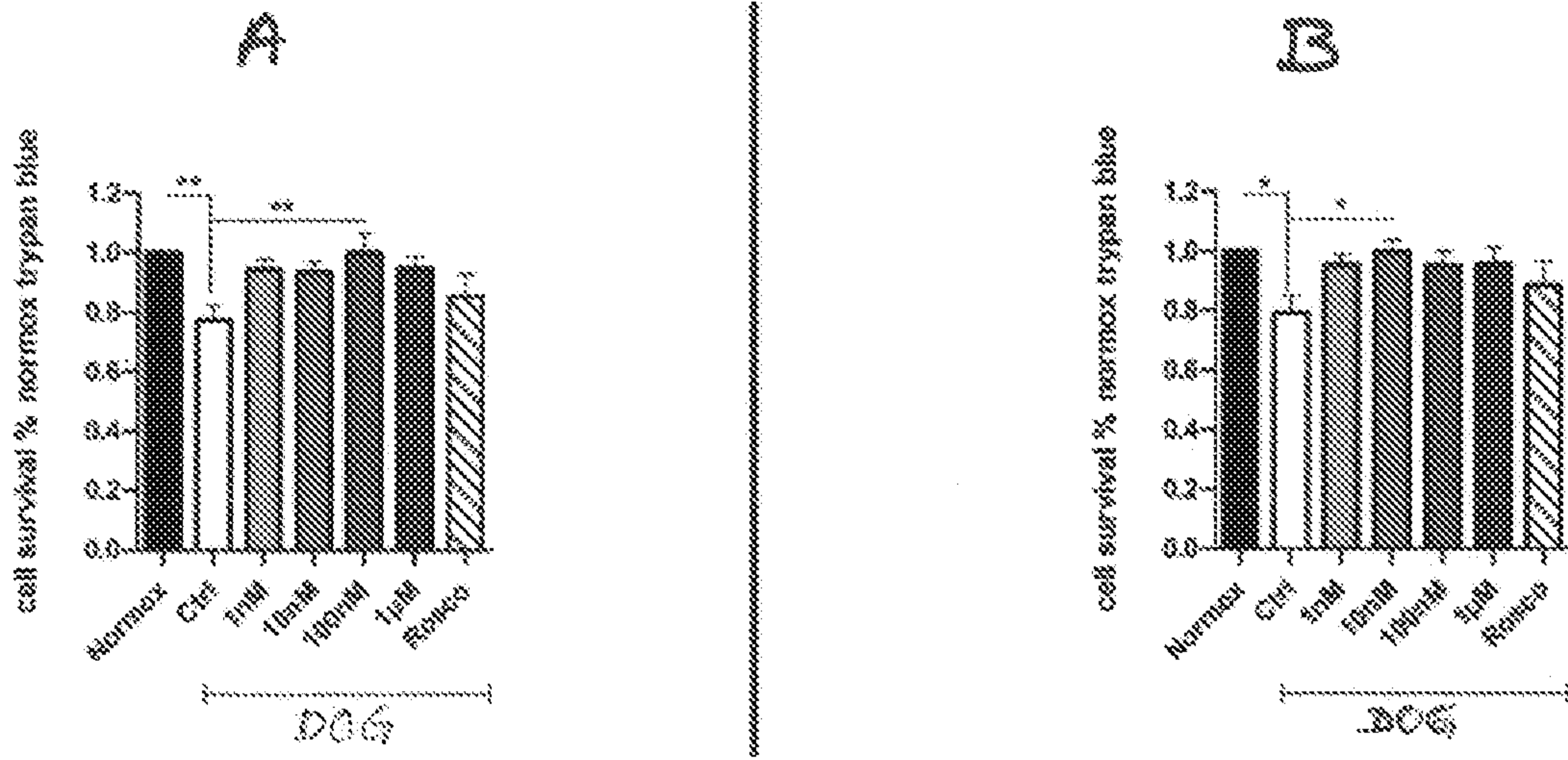
[Fig. 2]



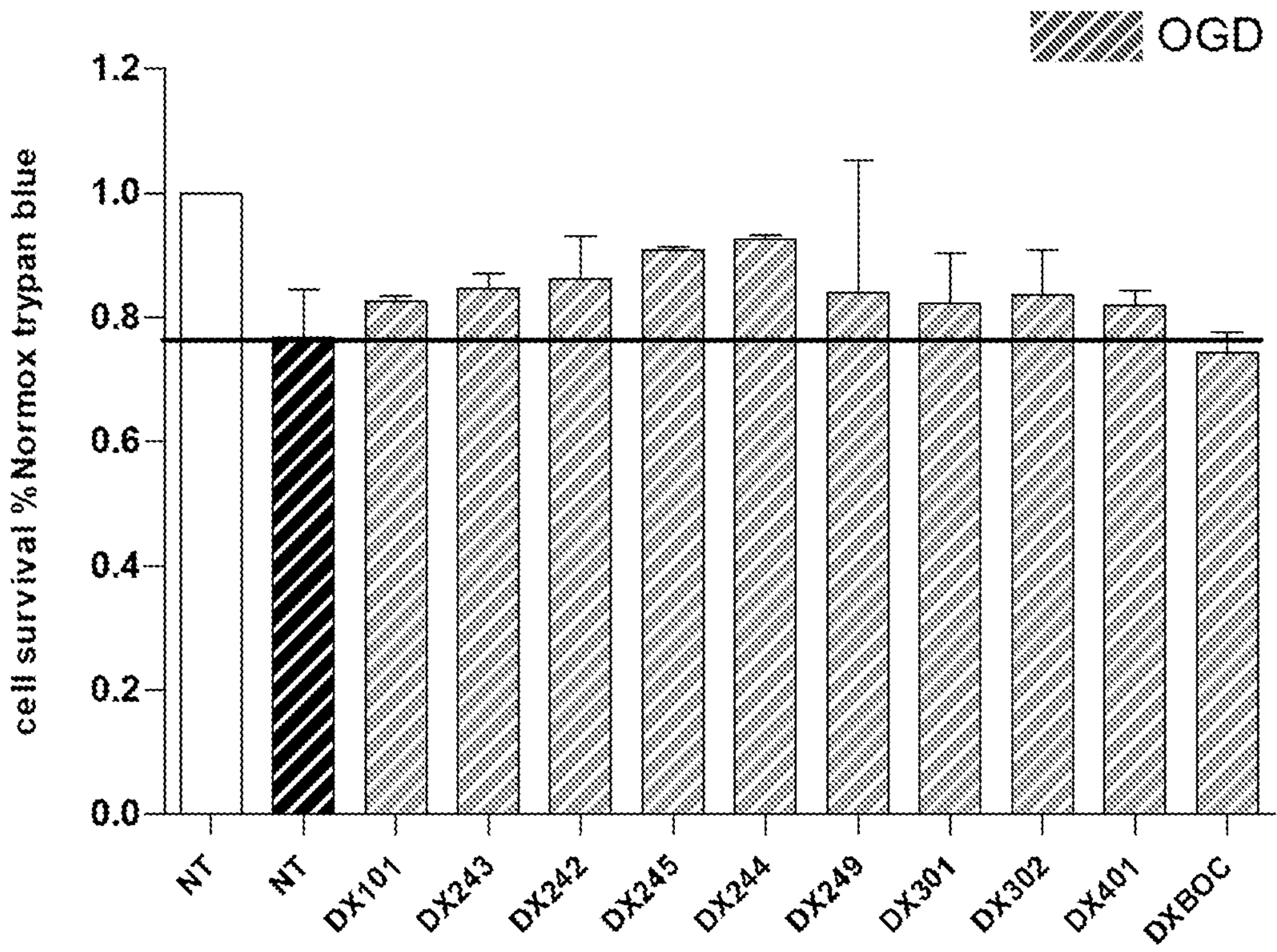
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ÉTABLI EN VERTU DE L'ARTICLE XI.23., §10 DU CODE DE DROIT ÉCONOMIQUE BELGE

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE	REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE T0302-BE-P
Demande nationale belge n° 201905501	Date du dépôt 01-08-2019
	Date de priorité revendiquée
Déposant (Nom) DENDROGENIX	
Date de la requête d'une recherche de type international 31-08-2019	Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international SN74373
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)	
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB Voir rapport de recherche	
II. DOMAINES RECHERCHES	
Documentation minimale consultée	
Système de classification	Symboles de la classification
IPC	Voir rapport de recherche
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés	
III. <input type="checkbox"/> IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDECTIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	
IV. <input type="checkbox"/> ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE À L'ÉTENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

BE 201905501

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K31/575 A61P25/00 A61P43/00 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61K A61P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2016/016518 A2 (AFFICHEM [FR]) 4 février 2016 (2016-02-04) * exemples 1-2 *	12
A,D	----- DE MEDINA PHILIPPE ET AL: "Synthesis of new alkylaminooxysterols with potent cell differentiating activities: identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 52, no. 23, 10 décembre 2009 (2009-12-10), pages 7765-7777, XP009131948, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/JM901063E [extrait le 2009-09-22] cité dans la demande * le document en entier * ----- -/--	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
° Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		"T" document ultérieur publié après la date de dépôt ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets
Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée 21 avril 2020		Date d'expédition du rapport de recherche de type international
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Houyvet-Landriscina

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>BRIGITTE MALGRANGE ET AL: "Targeting Cholesterol Homeostasis to Fight Hearing Loss: A New Perspective", FRONTIERS IN AGING NEUROSCIENCE, vol. 7, 29 janvier 2015 (2015-01-29), XP055687450, DOI: 10.3389/fnagi.2015.00003 * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-12
A	<p>WO 03/089449 A2 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; POIROT MARC [FR] ET AL.) 30 octobre 2003 (2003-10-30) * exemples 49, 57 *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-12
Y	<p>ZHAO H-B ET AL: "Ganoderma total sterol (GS) and GS"1 protect rat cerebral cortical neurons from hypoxia/reoxygenation injury", LIFE SCIENCES, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 76, no. 9, 14 janvier 2005 (2005-01-14), pages 1027-1037, XP004686351, ISSN: 0024-3205, DOI: 10.1016/J.LFS.2004.08.013 * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-12

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n
BE 201905501

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2016016518	A2	04-02-2016	AU 2015295184 A1 09-03-2017
			CA 2956192 A1 04-02-2016
			CN 106852121 A 13-06-2017
			EP 3174543 A2 07-06-2017
			FR 3024361 A1 05-02-2016
			JP 6601882 B2 06-11-2019
			JP 2017523240 A 17-08-2017
			US 2017209465 A1 27-07-2017
			WO 2016016518 A2 04-02-2016

WO 03089449	A2	30-10-2003	AT 420888 T 15-01-2009
			AU 2003262422 A1 03-11-2003
			CA 2481561 A1 30-10-2003
			EP 1497309 A2 19-01-2005
			ES 2321287 T3 04-06-2009
			FR 2838741 A1 24-10-2003
			JP 4601297 B2 22-12-2010
			JP 2005529882 A 06-10-2005
			US 2005222097 A1 06-10-2005
			US 2011275604 A1 10-11-2011
			US 2014005156 A1 02-01-2014
			WO 03089449 A2 30-10-2003



OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN74373	Date du dépôt(<i>jour/mois/année</i>) 01.08.2019	Date de priorité (<i>jour/mois/année</i>)	Demande n° BE201905501
Classification internationale des brevets (CIB) INV. A61K31/575 A61P25/00 A61P43/00			
Déposant DENDROGENIX			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- Cadre n° I Base de l'opinion
- Cadre n° II Priorité
- Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- Cadre n° VI Certains documents cités
- Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Formulaire BE237A (feuille de couverture) (Janvier 2007)	Examineur Houyvet-Landriscina
--	----------------------------------

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE201905501

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :
 - a. Nature de l'élément:
 - un listage de la ou des séquences
 - un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
 - b. Type de support:
 - sur papier
 - sous forme électronique
 - c. Moment du dépôt ou de la remise:
 - contenu(s) dans la demande telle que déposée
 - déposé(s) avec la demande, sous forme électronique
 - remis ultérieurement
3. De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE201905501

Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	1-11
	Non : Revendications	12
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-12
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-12
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

voir feuille séparée

Ad point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence aux documents suivants :

- D1 WO 2016/016518 A2
- D2 DE MEDINA PHILIPPE ET AL: "Synthesis of new alkylaminooxysterols with potent cell differentiating activities: identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 52, no. 23, 10 décembre 2009, pages 7765-7777, cité dans la demande
- D3 BRIGITTE MALGRANGE ET AL: "Targeting Cholesterol Homeostasis to Fight Hearing Loss: A New Perspective", FRONTIERS IN AGING NEUROSCIENCE, vol. 7, 29 janvier 2015
- D4 WO 03/089449 A2
- D5 ZHAO H-B ET AL: "Ganoderma total sterol (GS) and GS"1 protect rat cerebral cortical neurons from hypoxia/reoxygenation injury", LIFE SCIENCES, vol. 76, no. 9, 14 janvier 2005, pages 1027-1037

A moins qu'il n'en soit indiqué autrement, il est également fait référence aux passages pertinents cités dans le rapport de recherche pour ces documents.

La présente administration considère que l'objet des revendications 1-11 a trait à une méthode de traitement thérapeutique du corps humain. Par conséquent, leur brevetabilité dépend de la manière dont ces revendications sont formulées. Ainsi, l'Office européen des brevets n'accepte pas de revendications d'utilisation d'une substance ou composition à des fins médicales et ne reconnaît pas non plus comme brevetables des revendications rédigées selon le format dit de type Suisse, pour les demandes ayant une date de priorité ou de dépôt du ou ultérieure au 28.01.2011, lorsque les produits revendiqués sont déjà connus. Par contre, peuvent être acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première utilisation à des fins médicales ou une utilisation thérapeutique ultérieure, sous la forme : "substance/composition ... pour utilisation dans le traitement de ...". Peuvent être également acceptées des revendications dépendantes sous la forme : "substance/composition pour utilisation selon la revendication 1, ladite".

Bien qu'incorrectement formulées devant l'Office européen des brevets, la brevetabilité,

en particulier la nouveauté et l'activité inventive, des revendications 1-11 a été évaluée sur la base d'une revendication de composition à usage limité tenant compte des effets allégués de la composition.

V.2.1. La présente demande ne remplit pas les conditions de brevetabilité quant à la nouveauté, l'objet de la revendication 12 n'étant pas nouveau.

D1 décrit les alkylaminooxystérols de formule (I) pour prévenir la perte d'audition. D1 ne décrit pas l'utilisation de ces composés dans le traitement d'une pathologie neuronale étant liée à une hypoxie et/ou à une hypoglycémie affectant des cellules du système nerveux central, mais des solutions aqueuses comprenant 1 μM de ces composés. La revendication 12 n'est pas nouvelle au vu de D1.

D2 décrit également les composés de formule (I) mais cette fois pour le traitement du cancer et des maladies neurodégénératives. Les composés de formule (I), et notamment la dendrogénine B, induit une prolifération de neurites sur différentes lignées cellulaires d'origine neuronale, en particulier la différenciation des cellules souches pluripotentes du carcinome embryonnaire en neurones à des concentrations nanomolaires, et aide les motoneurones à survivre. D2 ne décrit cependant pas l'efficacité des composés de formule (I) sur une pathologie neuronale liée à une ischémie affectant des cellules du système nerveux central.

D3 rapporte que la dendrogénine A et la dendrogénine B favorisent la survie des motoneurones (en référence à D2) et induisent la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales. Ainsi, les dendrogénines pourraient être impliqué dans le maintien de l'état fonctionnel nerveux. D3 rapporte également que des changements dans l'homéostasie du cholestérol cérébral ont été décrits lors d'une excitotoxicité médiée par le glutamate, qui est impliquée dans l'effet délétère de nombreux stress neurologiques tels que l'AVC, les lésions cérébrales traumatiques et l'exposition au bruit. Un effet des dendrogénines sur L'AVC ou les traumatismes crâniens n'est cependant pas décrit.

D4 décrit des dérivés de stérol et leur utilisation dans le traitement des maladies dégénératives. Ils permettent la survie de moto-neurones et la pousse dendritique. Les dérivés de D4 ne présentent pas de groupe R3 comme requis à la revendication 1 et n'ont pas été testés sur un modèle d'ischémie.

D5 décrit l'effet protecteur du stérol Ganoderma GS et son principal composant GS1 sur les cultures de neurones corticaux de rats exposés à l'ischémie-réperfusion. Les composés de D5 diffèrent de ceux de la présente demande de part l'absence de groupe R3.

Les revendications 1-11 sont nouvelles au vu des documents de l'art antérieur.

V.2.2. La présente demande ne semble pas remplir les conditions de brevetabilité, l'objet des revendications 1-12 n'impliquant pas une activité inventive.

La revendication 12 n'étant pas nouvelle, elle ne peut impliquer une activité inventive.

D5 peut être considéré comme l'art antérieur le plus proche en ce qui concerne les revendications 1-11.

L'objet de la revendication 1 diffère de D5 de part la structure chimique des stéroïdes.

L'effet technique apporté par cette différence réside dans l'effet protecteur des composés revendiqués contre l'hypoxie dans un modèle d'ischémie.

Le problème que se propose de résoudre la demande vis-à-vis de D5 est donc de proposer de nouveaux stéroïdes pour traiter une pathologie neuronale liée à une hypoxie et/ou à une hypoglycémie affectant des cellules du système nerveux central.

La solution étant les alkylaminooxystérols de formule (I).

Cette solution semble efficace comme démontré dans la demande avec les composés DX101, DX243, DX242, DX245, DX244, DX249, DX301, DX302 et DX401 (figure 5). Aussi, au vu des résultats obtenus dans le modèle d'ischémie-réperfusion, il est plausible que ces mêmes composés aient également un effet sur des pathologies neuronales liées également à une hypoglycémie.

D5 décrit l'effet protecteur de stérols sur les cultures de neurones corticaux de rats exposés à l'ischémie-réperfusion, mais ces stérols sont différents de ceux revendiqués. Les composés de formule (I) sont cependant connus dans D1-D3 mais non pas pour leur effet protecteur dans un modèle d'ischémie tel que démontré dans la demande. D3 rapporte toutefois que des changements dans l'homéostasie du cholestérol cérébral ont été décrits lors d'une excitotoxicité médiée par le glutamate, qui est impliquée dans l'effet délétère de nombreux stress neurologiques tels que l'AVC ou les traumatismes crâniens. Pour autant, D3 ne teste pas les composés de formule (I) dans de tels modèles et ajoute que le rôle du cholestérol et ses métabolites n'est pas clair. Ainsi, l'homme du métier n'aurait pas été amené à tester les composés de D1-D3 dans le traitement d'une pathologie neuronale liée à une hypoxie et/ou à une hypoglycémie affectant des cellules du système nerveux central. En ce sens les revendications 4-11 impliquent une activité inventive. Par contre, l'effet protecteur n'étant pas obtenu avec le composé DX243BOC, l'effet revendiqué n'est pas démontré sur toute la portée de la revendication 1 ainsi que 2-3.

Ad point VIII

Certaines observations relatives à la demande

- a) A la revendication 1, la définition du groupe Z3 est absente. Cette définition ne se trouve pas non plus dans la description.
- b) A la revendication 1, le groupe $R6 = -(CH_2)_3NH(COC(CH_3)_3)(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCOC(CH_3)_3$ est erroné, de part la valence du premier azote de la chaîne.
- c) Aux revendications 3 et 7, la définition de $R_5 = H$ est superflue car déjà présente à la revendication 2.
- d) En page 6, les composés DX242 et DX244 sont dits posséder respectivement un effet curatif supérieur à eux-mêmes (voir lignes 28 et 34).