(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
14 avril 2022 (14.04.2022)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2022/074313 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 31/198 (2006.01) *A61P 29/02* (2006.01)
A61K 38/02 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2021/051694

(22) Date de dépôt international :
30 septembre 2021 (30.09.2021)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
FR2010186 06 octobre 2020 (06.10.2020) FR

(71) Déposants : **UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE** [FR/FR] ; 49 boulevard François Mitterrand, 63000 Clermont-Ferrand (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR] ; 3 rue Michel-Ange, 75016 Paris (FR). **SIGMA CLERMONT** [FR/FR] ; Les Cézeaux, 63170 Aubiere (FR). **INSERM-INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE** [FR/FR] ; 101 rue de Tolbiac, 75013 Paris (FR). **UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER** [FR/FR] ; 163 rue Auguste Broussonnet, 34090 Montpellier (FR).

(72) Inventeurs : **BUSSEROLLES, Jérôme** ; 22 rue de l'Eglise, 03800 SAULZET (FR). **BOURINET, Emmanuel** ; 6 allée Albert Dubout, 34270 SAINT-MATHIEU-DE-TREVIERS (FR). **TAILLEFUMIER, Claude** ; 2 route du Chouanet, 63320 CHIDRAC (FR). **ROY, Olivier** ; 24 rue Victor Schoelcher, 63800 COURNON D'AUVERGNE (FR). **NAUTON, Lionel** ; 38 rue de la Vernoze, 63320 CHAMPEIX (FR). **AISSOUNI, Youssef** ; 82 Faubourg de la Bade, 63200 RIOM (FR).

(74) Mandataire : **NOVAGRAAF TECHNOLOGIES** ; 2 rue Sarah Bernhardt, CS90017, 92665 Asnieres-Sur-Seine Cedex (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,

(54) **Title:** NOVEL PEPTOIDS AND USE THEREOF FOR PREVENTING OR TREATING CHRONIC PAIN

(54) **Titre :** NOUVEAUX PEPTOIDES ET LEUR UTILISATION DANS LA PREVENTION OU LE TRAITEMENT DE LA DOULEUR CHRONIQUE

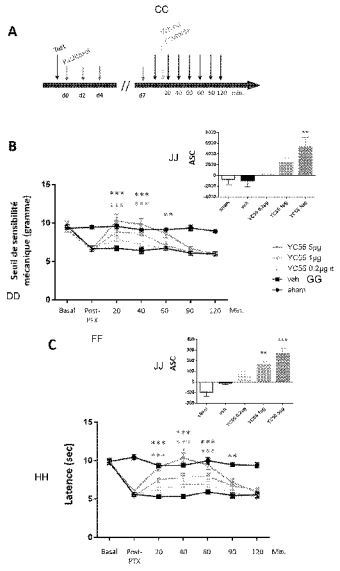


FIGURE 12

CC Carrier or peptoid
DD Mechanical sensitivity threshold (grams)
FF Post-PTX
GG carrier
HH Latency (sec)
JJ AUC

(57) **Abstract:** The invention relates to novel peptidomimetic molecules (or peptoids) for the prevention and/or treatment of chronic pain, in particular pain resulting from peripheral neuropathies.

(57) **Abrégé :** L'invention concerne de nouvelles molécules peptidomimétiques (ou peptoïdes) pour la prévention et/ou le traitement de la douleur chronique, notamment celle résultant de neuropathies périphériques.

WO 2022/074313 A1

[Suite sur la page suivante]

OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **États désignés** *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2(h))*

NOUVEAUX PEPTOIDES ET LEUR UTILISATION DANS LA PREVENTION OU LE TRAITEMENT DE LA DOULEUR CHRONIQUE

DESCRIPTION

Domaine technique de l'invention

L'invention concerne de nouvelles molécules peptidomimétiques (ou peptoïdes, également appelés hybrides peptide-peptoïde ou peptomères) pour la prévention et/ou le traitement de la douleur chronique, notamment celle résultant de neuropathies périphériques (*e.g.* induites par chimiothérapie).

Dans la description ci-dessous, les références entre crochets ([ ]) renvoient à la liste des références à la fin du texte.

Etat de l'art

La douleur chronique touche 1,5 milliard de personnes dans le monde pour lesquelles la réponse thérapeutique est clairement insuffisante (Finnerup NB et al., 2015) [1]. Des études épidémiologiques récentes ont estimé que la douleur chronique touche environ 20 % des adultes et 50 % des personnes âgées (von Hehn et al., 2012) [2]. Au niveau mondial, 60 % des personnes souffrant de douleurs sont moins aptes à travailler et 20 % déclarent avoir perdu leur emploi à cause de la douleur. Parallèlement, 20 milliards d'unités de médicaments analgésiques ont été vendues en 2010, contre 14 milliards en 2005 (+9,3 %). En 2017, le marché mondial de la douleur a atteint 61,05 milliards de dollars et devrait rapporter 77,13 milliards de dollars d'ici 2023, enregistrant un taux de croissance annuel composé de 4% de 2017 à 2023.

Les douleurs neuropathiques concernent environ 7% de la population générale et 25% des patients atteints de douleurs chroniques. Elles sont de deux types : la douleur neuropathique périphérique (selon son origine, elle peut concerner les territoires d'un plexus, d'une racine, d'un tronc ou être plus diffuse dans le cadre de polyneuropathies) et la douleur neuropathique centrale (lésions affectant les voies sensitives ou du contrôle de la douleur). Les neuropathies périphériques induites par la chimiothérapie, effets indésirables fréquents de nombreux agents anticancéreux, se caractérisent par des douleurs chroniques importantes affectant durablement la qualité de vie des patients et entrainant des adaptations posologiques avec le risque d'une

efficacité clinique amoindrie. La pharmacopée antalgique, qui s'appauvrit (retrait du Di-antalvic en 2011), se caractérise par des traitements anciens et souvent mal tolérés.

L'innovation est en panne depuis plus de 50 ans, la majorité des nouveaux médicaments proposés étant de simples reformulations ou associations de médicaments existants. De récentes méta-analyses montrent qu'aucun traitement contre la douleur neuropathique n'est réellement efficace à ce jour à l'exception de la gabapentine et de la duloxétine avec un score d'efficacité encore faible (Hershman et al., 2014) [3].

La famille des canaux ioniques HCN (Ludwig et al., Nature 1998 ; Santoro et al., 1998 ; Seifert et al., 1999) [4-6], qui comprend quatre membres HCN1-4, pourrait offrir d'excellentes possibilités de développement de nouveaux médicaments destinés à réduire la fréquence cardiaque et de nouveaux analgésiques. Les canaux HCN sont largement répartis dans les voies de la douleur et jouent un rôle important dans le développement et le maintien de la douleur neuropathique (Dunlop et al., 2009 ; Lewis et al., 2011) [7, 8]. Il a été démontré que les bloqueurs HCN non sélectifs atténuent les symptômes de la douleur dans des modèles de douleur neuropathique chez les rongeurs (Descoeur et al., 2011 ; Young et al., 2014) [9, 10]. Leurs effets secondaires cardiaques et visuels (*e.g.* bloqueurs pan-HCN) limitent toutefois la traduction clinique de leur utilisation pour traiter la douleur neuropathique.

Il est intéressant de noter que la fonction des canaux HCN est étroitement régulée par une sous-unité auxiliaire, la protéine d'interaction Rab8b (TRIP8b) qui n'est pas exprimée dans le cœur. Cette protéine cytoplasmique se lie à l'extrémité C-terminale des sous-unités du canal HCN via deux sites de contact (Lewis et al., 2009) [11]. Par ailleurs, la structure atomique de la région tétratricopeptide (TPR) de TRIP8b en complexe avec un peptide de 6 acides aminés représentant l'extrémité C-terminale de HCN2 a été déterminée par cristallographie aux rayons X (Bankston et al., 2012) [12].

Dans le contexte actuel, la majorité des travaux s'intéressant à développer des inhibiteurs agissant directement sur les canaux HCN, le ciblage de TRIP8b et/ou de l'interaction TRIP8b-HCN pourrait offrir une nouvelle possibilité pour moduler l'activité du HCN dans les états de douleur sans risque d'affecter les fonctions cardiaques et visuelles.

Description de l'invention

La présente invention repose sur l'hypothèse que la perturbation des interactions TRIP8b-HCN conduisant à une diminution des courants (Ih) induits par les canaux HCN, pourrait avoir un effet antalgique dans des modèles de neuropathies périphériques aiguë et chroniques induites par l'oxaliplatine chez le rongeur reproduisant fidèlement la symptomatologie humaine.

La preuve de l'efficacité de cette stratégie a dans un premier temps été validée à l'aide de NUCC-5953, une molécule issue d'un criblage d'une banque de 20 000 molécules, capable de perturber l'interaction TRIP8b-HCN (Han et al., 2015) [13]. Les Inventeurs ont ainsi démontré que l'hypersensibilité aiguë au froid induite par l'oxaliplatine est réversée de manière dose-dépendante par l'injection intrathécale (Figure 2) ou systémique (Figure 3) de NUCC-5953. Aucune altération de l'activité locomotrice n'a été observée. Les données préliminaires ont également montré que l'administration de NUCC-5953 réduit l'adressage à la membrane, et donc l'activité de HCN1 et 2 observée chez les animaux neuropathiques (Figure 5B). De plus, l'application *in vitro* de NUCC-5953 n'a montré aucun effet sur les courants induits par l'activation des HCN dans les cellules cardiaques (contrairement à des bloqueurs non spécifiques des canaux HCN, Figure 6).

Les inventeurs ont alors décidé de concevoir des bloqueurs spécifiques de l'interaction TRIP8b-HCN en se basant sur le mode d'interaction des deux protéines. Toutefois si les interactions protéine-protéine (PPI) jouent un rôle essentiel à tous les niveaux du fonctionnement cellulaire, ce qui en font des cibles thérapeutiques incontestables, la conception de puissants inhibiteurs de PPI demeure un réel défi. Les molécules de faible poids moléculaire bien que largement criblées, sont peu adaptées pour rivaliser avec des interactions impliquant de larges surfaces (>800Å). En outre pour concevoir des inhibiteurs efficaces, il est important de pouvoir mimer le segment de reconnaissance protéine/protéine « hot segment » dans sa conformation bioactive. Les peptides sont les composés de choix pour concevoir ces nouveaux inhibiteurs à condition de pouvoir résoudre les problèmes de stabilités métabolique et conformationnelle, mais également de pénétration cellulaire pour atteindre des cibles intracellulaires.

Les inventeurs se sont alors tournés vers une chimie peptidomimétique via la synthèse de peptoïdes (oligomères de glycine N-substitués) qui sont particulièrement adaptés au développement d'inhibiteurs ciblant une interaction protéine-protéine, et qui peuvent également être dénommés peptomères (*i.e.* des oligomères combinant

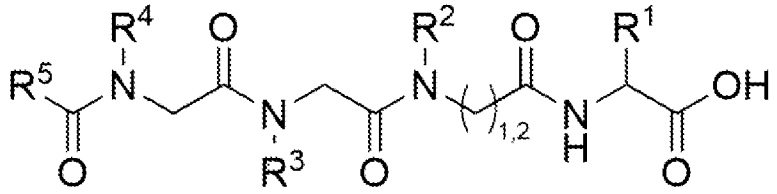
des monomères « peptoides » et des monomères « amino-acides » - Ostergaard et al 1997 [17] – soit des hybrides peptide-peptoide).

Ce sont en effet des mimes peptidiques synthétiques dont la nature oligomérique permet une grande modularité en termes de taille et de diversité chimique.

Ils permettent un design structural fin et possèdent une meilleure biodisponibilité que les peptides (résistance aux protéases, meilleure perméabilité membranaire, squelette non-immunogénique).

Les Inventeurs ont donc conçu de nouveaux peptoïdes ciblant l'interaction entre les domaines TPR de TRIP8b et l'extrémité C-terminale de HCN, capables d'exercer un effet analgésique dans un modèle de neuropathie aiguë induite par l'oxaliplatine sans effets cardiaques ou visuels indésirables.

La présente invention a donc pour objet un peptoïde de formule générale (I) suivante :



I

où

R^1 est de manière indépendante CH_3 (L-Ala), $CH(CH_3)_2$ (L-Val), $CH(CH_3)CH_2CH_3$ (L-Ile), $CH_2CH(CH_3)_2$ (L-Leu and D-Leu), $CH_2C(CH_3)_3$, $C(CH_3)_3$, CH_2(cyclobutyl) ;

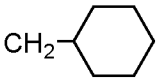
R^2, **R^3**, et **R^4** sont les chaînes latérales des unités peptoïdes incorporées séquentiellement au cours de la synthèse à partir d'amines primaires ;

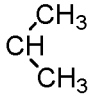
R^2 et **R^3** sont choisis de manière indépendante parmi : $CH_2CH(CH_3)_2$, $CH_2CH_2NH_2$, CH_2CH_2OH, $CH_2CH_2CH_2OH$, $CH_2CH(OH)CH_3$, CH_2CONH_2, $CH_2CH_2CONH_2$. Les chaînes latérales présentant une fonction alcool ou amine ont été incorporées aux oligomères sous forme protégée : éther de silyle pour la fonction alcool et tert-butyl carbamate (Boc) pour la fonction amine ;

R^4 est un groupe aliphatique ou aromatique choisi parmi :

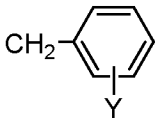
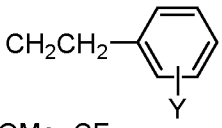
$CH_2CH(CH_3)_2$ (isobutyle)

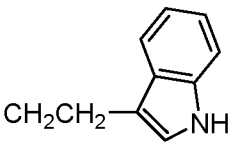
$CH_2C(CH_3)_3$ (neopentyle)

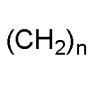

(cyclohexylmethyle)


(isopropyle)

$CH_2CH_2CH_2CH_3$ (*n*-butyle)



Y = H, OMe, CF_3




$(CH_2)_n$—Z n = 2 à 8
Z = OH, NH_2, COOH, SH, N_3, C≡CH

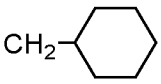
;

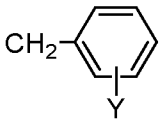
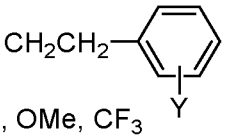
R^5 est de manière indépendante CH_3, $CH(CH_3)_2$, $CH_2C_6H_5$, C_6H_4X (où X en position ortho, méta ou para est de manière indépendante H, OMe, CF_3, CH_3, CH_2CH_3, F, Br, Cl, NO_2), 3-indolyl, 3-quinolinyl.

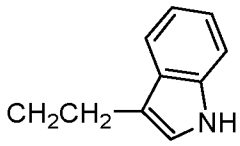
Avantageusement, **R^4** est un groupe aliphatique ou aromatique choisi parmi :

$CH_2CH(CH_3)_2$ (isobutyl)

$CH_2C(CH_3)_3$ (neopentyl)





Y = H, OMe, CF_3



.

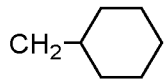
Avantageusement, **R^5** est de manière indépendante CH_3, $CH_2C_6H_5$, C_6H_4X (où X en position ortho, méta ou para est de manière indépendante H, OMe, CF_3, CH_3, CH_2CH_3, F, Br, Cl), 3-indolyl, 3-quinolinyl.

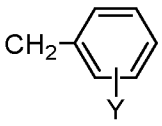
Avantageusement, les peptoïdes de la présente invention sont choisis parmi les peptoïdes de formule générale (I) dans laquelle :

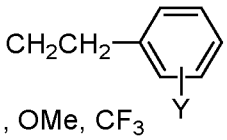
- **R^1** est de manière indépendante CH_3 (L-Ala), $CH(CH_3)_2$ (L-Val), $CH(CH_3)CH_2CH_3$ (L-Ile), $CH_2CH(CH_3)_2$ (L-Leu and D-Leu), $CH_2C(CH_3)_3$, $C(CH_3)_3$, CH_2(cyclobutyl) ;
- **R^2**, **R^3**, et **R^4** sont les chaînes latérales des unités peptoïdes incorporées séquentiellement au cours de la synthèse à partir d'amines primaires ;
- **R^2** et **R^3** sont choisis de manière indépendante parmi : $CH_2CH_2NH_2$, CH_2CH_2OH, $CH_2CH_2CH_2OH$, $CH_2CH(OH)CH_3$, CH_2CONH_2, $CH_2CH_2CONH_2$. Les chaînes latérales présentant une fonction alcool ou amine ont été incorporées aux oligomères sous forme protégée : éther de silyle pour la fonction alcool et tert-butyl carbamate (Boc) pour la fonction amine ;
- **R^4** est un groupe aliphatique ou aromatique choisi parmi :

$CH_2CH(CH_3)_2$ (isobutyl)

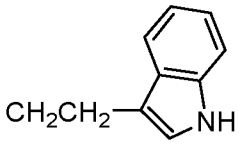
$CH_2C(CH_3)_3$ (neopentyl)







Y = H, OMe, CF_3

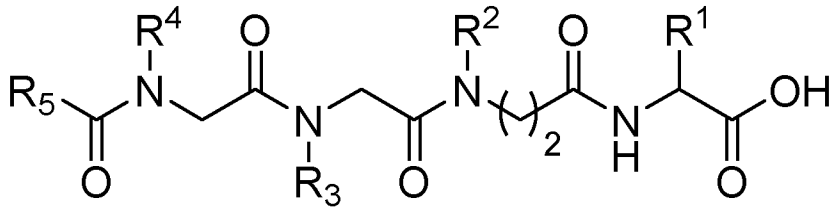


;

- **R^5** est de manière indépendante CH_3, $CH_2C_6H_5$, C_6H_4X (où X en position ortho, méta ou para est de manière indépendante H, OMe, CF_3, CH_3, CH_2CH_3, F, Br, Cl), 3-indolyl, 3-quinolinyl.

De préférence, les peptoïdes de la présente invention, de formule générale (I), comportent 2 atomes de carbone sur la seconde unité (en partant de l'extrémité C-terminale).

Avantageusement, les peptoïdes de la présente invention sont choisis parmi les peptoides de formule générale (I') suivante :

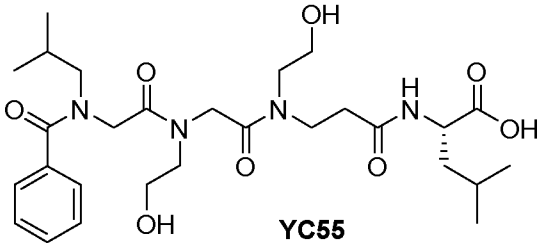


I'

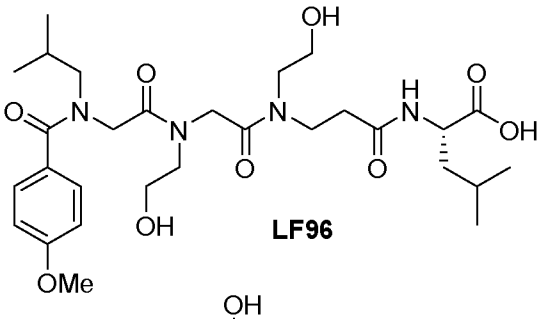
où

R^1, **R^2**, **R^3**, **R^4** et **R^5** sont tels que définis ci-dessus.

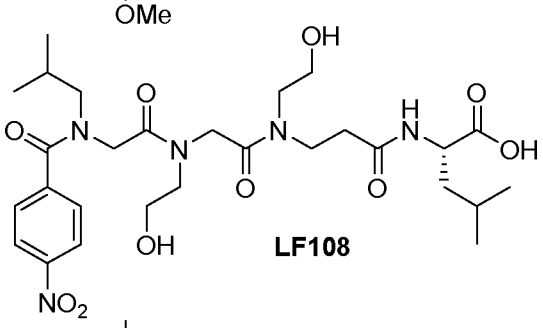
Selon un mode de réalisation particulier, les peptoïdes de la présente invention ont les formules suivantes :



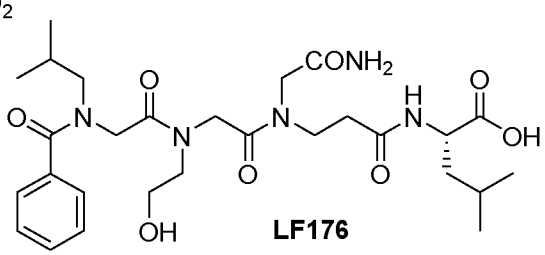
YC55



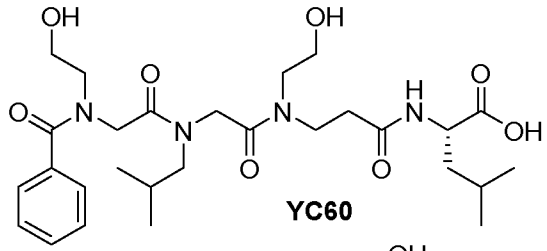
LF96



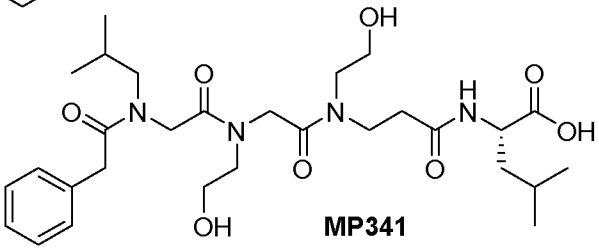
LF108



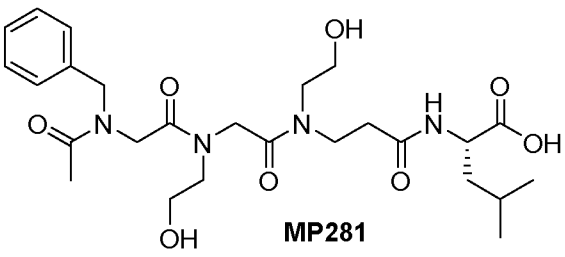
LF176



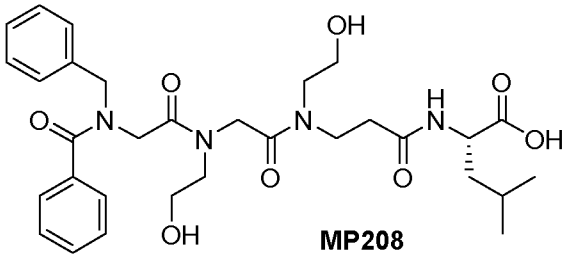
YC60



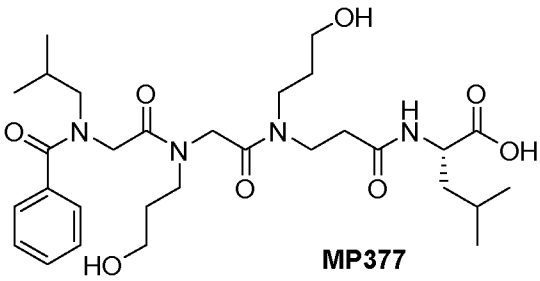
MP341



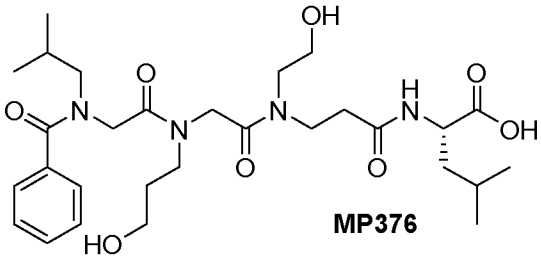
MP281



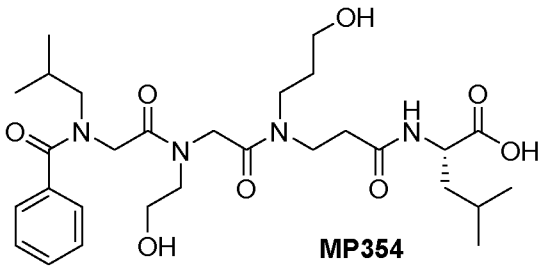
MP208



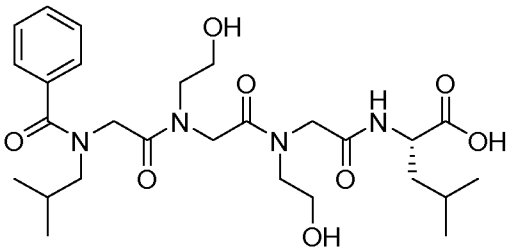
MP377



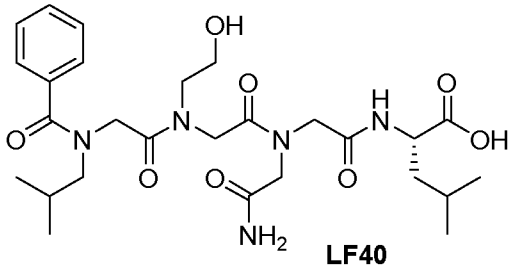
MP376



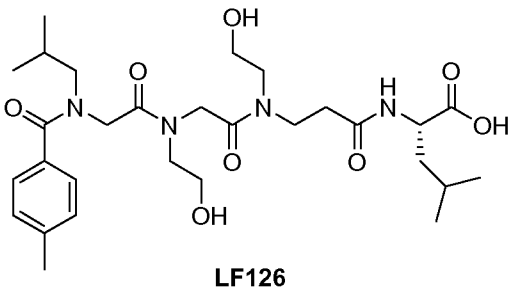
MP354



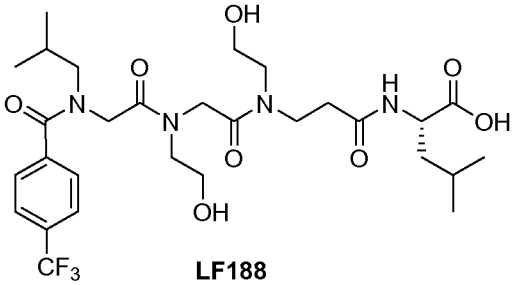
MP405



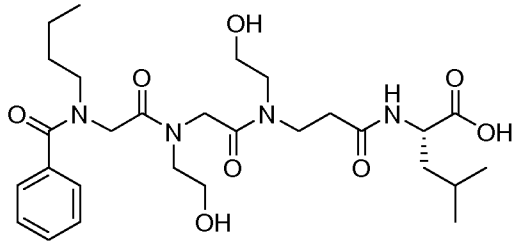
LF40



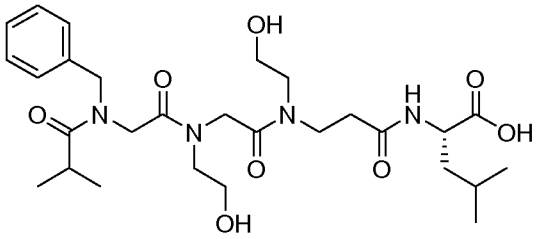
LF126



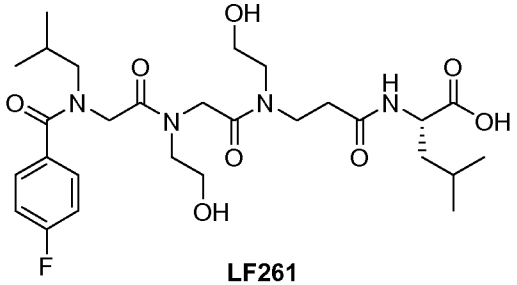
LF188



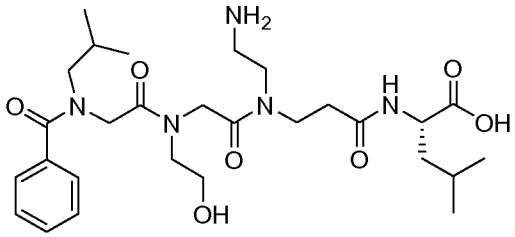
LF222



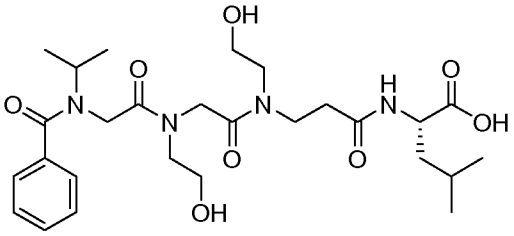
LF239



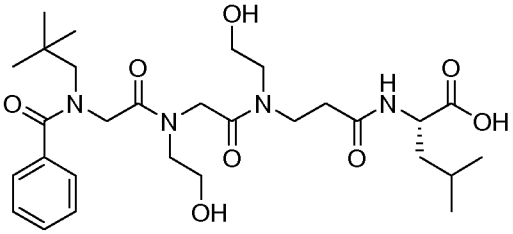
LF261



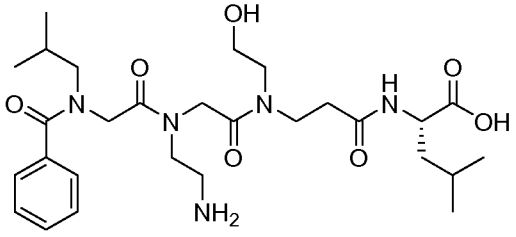
LF275



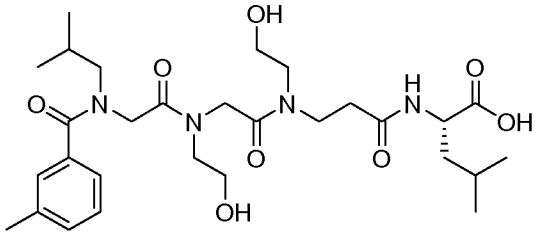
LF295



LF306

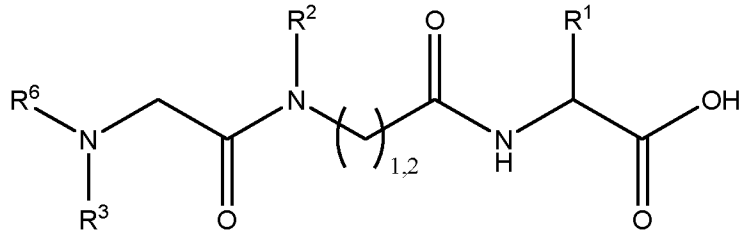


LF329



LF400

La présente invention a également pour objet un intermédiaire de synthèse du peptoïde de formule générale (I), le dit peptoïde comprenant 3 unités. Ledit intermédiaire de synthèse est un peptoïde de formule générale (II) suivante :



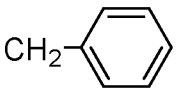
II

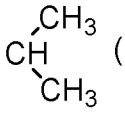
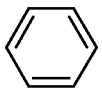
où

R^1, R^2 et R^3 sont tels que définis ci-dessus ;

R^6 est H, R^3, COR^5 (où R^5 est tel que défini ci-dessus) ou R^7 ;

R^7 est de manière indépendante un groupe parmi :

$(CH_2)_wCH_3$ alkyle (w = 1-4)  (phénylméthyle)

 (isopropyle)  (phényle)  (cyclohexyle).

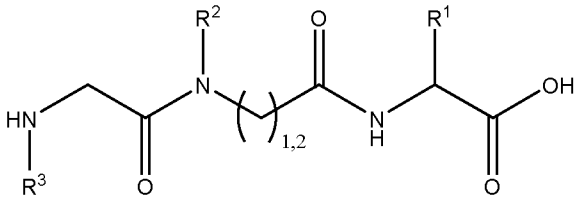
En particulier, la présente invention a pour objet les peptoïdes de formule (II) dans laquelle R^6 est H.

En particulier, la présente invention a pour objet les peptoïdes de formule (II) dans laquelle R^6 est COR^5.

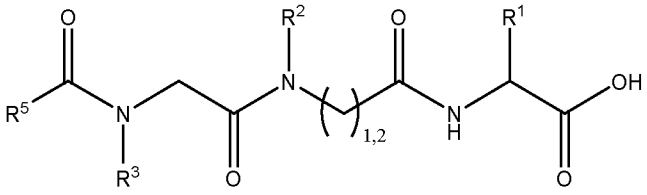
En particulier, la présente invention a pour objet les peptoïdes de formule (II) dans laquelle R^6 est R^7.

En particulier, la présente invention a pour objet les peptoïdes de formule (II) dans laquelle R^6 est R^3.

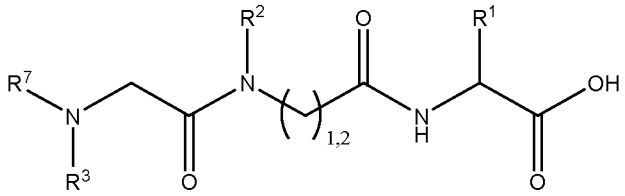
Avantageusement, les peptoïdes selon l'invention peuvent être choisis parmi les peptoïdes de formules générales (IIa), (IIb), (IIc) et (IId) suivantes :



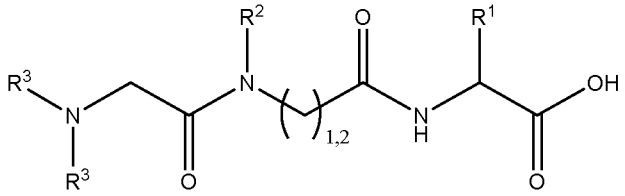
IIa



IIb



IIc

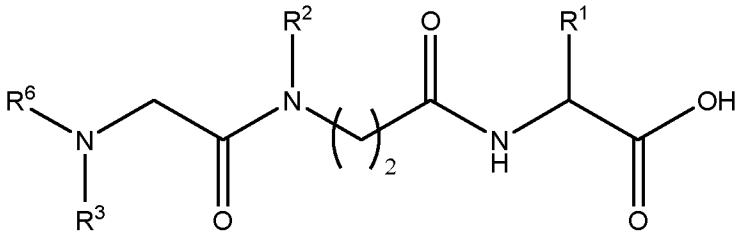


IId

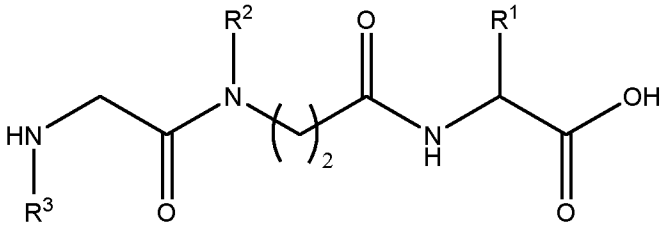
où

R^1, **R^2**, **R^3**, **R^5** et **R^7** sont tels que définis ci-dessus.

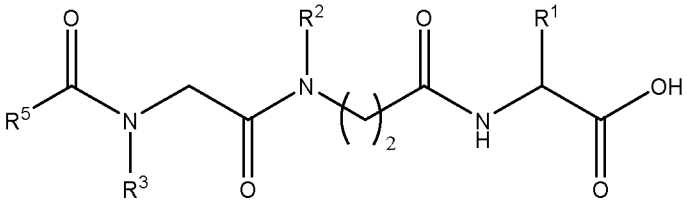
De préférence, les peptoïdes de la présente invention, de formule (II), (IIa), (IIb), (IIc) ou (IId), comportent 2 atomes de carbone sur la seconde unité (en partant de l'extrémité C-terminale). Avantageusement, les peptoïdes sont choisis parmi les peptoides de formules (II'), (II'a), (II'b), (II'c) ou (II'd) suivantes :



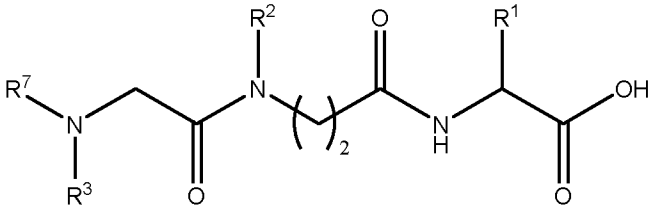
II'



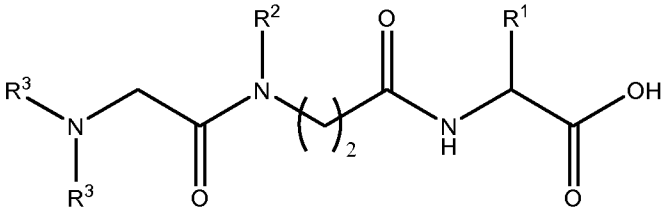
II'a



II'b



II'c



II'd

où

R^1, **R^2**, **R^3**, **R^5**, **R^6** et **R^7** sont tels que définis ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant un peptoïde selon la présente invention, et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention a également pour objet un peptoïde ou une composition pharmaceutique selon la présente invention pour une utilisation comme médicament.

La présente invention a également pour objet un peptoïde ou une composition pharmaceutique selon l'invention pour une utilisation dans la prévention ou le traitement de la douleur chronique, en particulier de la douleur chronique d'origine neuropathique, plus particulièrement de la douleur neuropathique périphérique par exemple induite par chimiothérapie.

Dans un contexte où l'innovation thérapeutique dans le domaine des antalgiques est en panne, les peptoïdes de la présente invention et leur potentiel thérapeutique peuvent avoir un impact important sur l'amélioration de la qualité de vie des patients souffrant de douleurs neuropathiques induites par des anticancéreux et éventuellement de leur survie. De plus, les canaux HCN étant également impliqués dans l'étiologie de diverses douleurs d'origine neuropathique et inflammatoire, les peptoïdes de la présente invention ouvrent la voie à de nouvelles classes de médicaments antalgiques actifs plus largement sur différents types de douleur chronique.

Brève description des figures

La figure 1 représente l'expression des protéines HCN1 (A), HCN2 (B) et TRIP8b (C) dans les neurones DRG 4 jours après l'administration de véhicule ou d'oxaliplatine (6mg/kg, i.p.). L'expression de la protéine TRIP8b dans la corne dorsale de la moelle épinière 4 jours après l'administration de véhicule ou d'oxaliplatine (6mg/kg, i.p.) (D) ou après l'administration répétée (deux fois par semaine pendant trois semaines) de véhicule ou d'oxaliplatine (E) N=3/groupe, test de Mann-Whitney.

La figure 2 représente (A) conception de l'étude (B) évolution temporelle de la moyenne +/- SEM du seuil de latence à l'immersion de la patte (en sec) et (C) aire sous la courbe (ASC, sec.min) de l'effet analgésique dépendant de la dose chez des souris OIPN (souris modèle de neuropathie induite par oxaliplatine) (n=8) traitées avec le véhicule ou NUCC5953 (0.2, 1 ou 5 µg, i.t.) ; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, *vs* le groupe veh., ANOVA à deux voies et test *post hoc* de Tukey.

La figure 3 représente (A) conception de l'étude (B) évolution temporelle de la moyenne +/- SEM du seuil de latence à l'immersion de la patte (en sec) et (C) aire sous la courbe (ASC, sec.min) de l'effet analgésique dépendant de la dose chez des souris OIPN (n=8) traitées avec le véhicule, NUCC5953 (4mg/kg, s.c.) ou duloxetine (30mg/kg, s.c.) ; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, *vs* le groupe veh., ANOVA à deux voies et test *post hoc* de Tukey.

La figure 4 représente les histogrammes montrant la latence à la chute (A) et à la vitesse de chute (B) de souris traitées avec le véhicule ou NUCC5953 (4 mg/kg, s.c.) soumise à un test de rotarod à vitesse croissante (de 4 à 40 tours/minute pendant 10 min).

La figure 5 représente (A) conception de l'étude (B) l'expression (membranaire) subcellulaire de HCN1, HCN2 et TRIP8b dans les DRGs d'animaux traités avec le véhicule (V), l'oxaliplatine (O) ou l'oxaliplatine+NUCC5953 (5 nmol, i.t.) (N).

La figure 6 représente l'absence d'effet de NUCC5953 sur l'amplitude du courant If contrairement à l'ivabradine (IVA).

La figure 7 représente le rythme cardiaque des souris (RC) : (A) valeur de référence, (B) moyenne de la fréquence cardiaque pendant 30 minutes après l'injection de NUCC5953 (4 mg/kg, s.c.) et (C) valeur moyenne à la fin des 30 minutes ; les valeurs sont une moyenne +/- SEM (n=3).

La figure 8 représente la dynamique moléculaire de TRIP8b en interaction avec le peptide SNL.

La figure 9 représente (A) conception de l'étude (B) évolution temporelle de la moyenne +/- SEM du seuil de latence à l'immersion de la patte (en sec) et (C) aire sous la courbe (ASC, sec.min) de l'effet analgésique dépendant de la dose chez des souris OIPN (n=8) traitées avec le véhicule ou le peptoïde YC55 (0.2, 1 ou 5 µg, i.t.) ; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, *vs* le groupe veh., ANOVA à deux voies et test *post hoc* de Tukey.

La figure 10 représente (A) conception de l'étude (B) évolution temporelle de la moyenne +/- SEM du seuil de latence à l'immersion de la patte (en sec) et (C) aire sous la courbe (ASC, sec.min) de l'effet analgésique dépendant de la dose chez des souris OIPN (n=8) traitées avec le véhicule ou le peptoïde YC55 (2.5, 5 ou 10 mg/kg, s.c.) ; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, *vs* le groupe veh., ANOVA à deux voies et test *post hoc* de Tukey.

La figure 11 représente des histogrammes montrant la latence à la chute (A) et à la vitesse de chute (B) de souris traitées avec le véhicule, le YC55 (2.5, 5 ou 10 mg/kg, s.c.) ou le valium (2.5 mg/kg, s.c.) soumise à un test de rotarod à vitesse croissante (de 4 à 40 tours/minute pendant 10 min). *** $p<0.001$ T30 min post administration (■) vs T0 (□) pour une molécule donnée, t-test de Student.

La figure 12 représente (A) conception de l'étude (B) Evolution temporelle de la moyenne +/- SEM des seuils mécaniques (en g) et du seuil de latence à l'immersion

de la patte (en sec) et (C) aire sous la courbe (ASC, sec.min) de rats PTX (n=7-9) traités avec le véhicule ou le peptoïde YC55 (0.2, 1 ou 5 µg, i.t.) ; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, *vs* le groupe veh., ANOVA à deux voies et test *post hoc* de Tukey.

La figure 13 représente (A) conception de l'étude (B) Evolution temporelle de la moyenne +/- SEM du seuil de latence à l'immersion de la patte (en sec) de rats neuropathiques (n=7-9) traités avec le véhicule (●) ou le peptoïde YC55 (▒) (5 µg, i.t.) ; *** p<0.001, vs le groupe veh., ANOVA à deux voies et test *post hoc* de Tukey.

La figure 14 représente (A) conception de l'étude (B) Evolution temporelle de la moyenne +/- SEM du seuil de latence à l'immersion de la patte (en sec) et (C) aire sous la courbe (ASC, sec.min) de l'effet analgésique de souris OIPN (n=7-9) traitées avec le véhicule ou les peptoïdes MP208, MP405, ou YC55 (5 µg, i.t.) ; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, *vs* le groupe veh., ANOVA à deux voies et test *post hoc* de Tukey.

La figure 15 représente (A) conception de l'étude (B) Evolution temporelle de la moyenne +/- SEM du seuil de latence à l'immersion de la patte (en sec) et (C) aire sous la courbe (ASC, sec.min) de l'effet analgésique de souris OIPN (n=7-9) traitées avec le véhicule ou les peptoïdes MP376, MP354, ou MP341 (10 mg/kg, s.c.) ; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, *vs* le groupe veh., ANOVA à deux voies et test *post hoc* de Tukey.

La figure 16 représente (A) conception de l'étude (B) Evolution temporelle de la moyenne +/- SEM du seuil de latence à l'immersion de la patte (en sec) et (C) aire sous la courbe (ASC, sec.min) de l'effet analgésique de souris OIPN (n=7-9) traitées avec le véhicule ou les peptoïdes LF108, LF306, ou LF188 (5 µg, i.t.) ; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, *vs* le groupe veh., ANOVA à deux voies et test *post hoc* de Tukey.

La figure 17 représente (A) conception de l'étude (B) Evolution temporelle de la moyenne +/- SEM du seuil de latence à l'immersion de la patte (en sec) et (C) aire sous la courbe (ASC, sec.min) de l'effet analgésique de souris OIPN (n=7-9) traitées avec le véhicule ou les peptoïdes LF295, LF400, ou LF329 (5 µg, i.t.) ; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, vs le groupe veh., ANOVA à deux voies et test post hoc de Tukey.

La figure 18 représente (A) conception de l'étude (B) Evolution temporelle de la moyenne +/- SEM du seuil de latence à l'immersion de la patte (en sec) et (C) aire sous la courbe (ASC, sec.min) de l'effet analgésique de souris OIPN (n=7-9) traitées avec le véhicule ou les peptoïdes LF126, LF261, ou LF275 (5 µg, i.t.) ; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, vs le groupe veh., ANOVA à deux voies et test post hoc de Tukey.

La figure 19 représente (A) conception de l'étude (B) Evolution temporelle de la moyenne +/- SEM du seuil de latence à l'immersion de la patte (en sec) et (C) aire sous la courbe (ASC, sec.min) de l'effet analgésique de souris OIPN (n=7-9) traitées avec le véhicule ou les peptoïdes LF222, LF239, ou LF176 (5 µg, i.t.) ; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, *vs* le groupe veh., ANOVA à deux voies et test *post hoc* de Tukey.

La figure 20 représente (A) conception de l'étude (B) Evolution temporelle de la moyenne +/- SEM du seuil de latence à l'immersion de la patte (en sec) et (C) aire sous la courbe (ASC, sec.min) de l'effet analgésique de souris OIPN (n=7-9) traitées avec le véhicule ou le peptoïde LF369 (5 µg, i.t.) ; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, *vs* le groupe veh., ANOVA à deux voies et test *post hoc* de Tukey.

EXEMPLES

EXEMPLE 1: MATERIEL ET METHODES

Animaux

Les expériences ont été réalisées sur des souris mâles C57Bl/6JRj de 20 à 24 g ou des rats Sprague-Dawley mâles de 150 à 175 g fournis par les laboratoires Janvier (France), maintenus à un cycle lumière/obscurité de 12 heures et nourris et abreuvés *ad libitum*. Les expériences comportementales ont été réalisées à l'aveugle, dans une pièce calme, par le même expérimentateur pour un test donné en prenant grand soin de minimiser ou d'éviter l'inconfort des animaux. Toutes les procédures sur les animaux ont été approuvées par le comité local d'éthique animale et les expériences ont été réalisées conformément aux lignes directrices fournies par la Communauté européenne concernant les soins et l'utilisation des animaux (directive 2010/63/UE).

Test comportementaux

Test de Von Frey : La sensibilité mécanique a été évaluée avec des filaments de Von Frey calibrés de 0,07 g, 0,6 g ou 1,4 g. Les filaments ont été appliqués cinq fois dans l'ordre de rigidité croissante, perpendiculairement à la surface plantaire de la patte arrière et pressés jusqu'à ce qu'ils se plient. Le nombre de réponses pour une force de filament donnée a été compté.

Test d'immersion : La queue ou la patte a été immergée dans un bain d'eau réglé à 10°C ou 46°C jusqu'à ce qu'un retrait soit observé (temps de coupure : 30 s). La

moyenne de deux déterminations distinctes de la latence du retrait a été calculée (Janssen, Niemegeers & Dony, 1963) [14].

Test de pression des pattes chez le rat : Les rats ont été soumis à l'épreuve de pression des pattes décrite précédemment par Randall et Selitto (1957) [15]. Les seuils nociceptifs, exprimés en grammes, ont été mesurés avec un analgésimètre Ugo Basile (Apelex, diamètre de la pointe de la sonde 1 mm, poids 30 g) en appliquant une pression croissante sur la patte arrière droite des rats jusqu'à l'obtention d'un signe de douleur (seuil de vocalisation) (le cut-off a été de 750 g). Avant les traitements, les rats ont été habitués au test en les manipulant sans les soumettre à la pression de la patte. Ensuite, après avoir obtenu deux valeurs de seuil de vocalisation stables consécutives, les effets du traitement ont été évalués après 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min. Les résultats sont exprimés sous forme de seuils de vocalisation, en grammes. Pour étudier les effets globaux, les aires sous les courbes d'évolution dans le temps (ASC, g.min) des effets antihyperalgésiques ont été calculées à partir des scores individuels à chaque fois, en utilisant la méthode trapézoïdale. Les données ont été analysées par un ANOVA à deux voies suivi d'un test de Bonferroni, lorsque l'évolution temporelle des effets a été étudiée. Un ANOVA à une voie suivi d'un test de Student Newman-Keuls ont été utilisés pour analyser l'effet des différents traitements déterminés par les ASC. Le niveau de signification statistique a été fixé à $p < 0,05$.

Test du Rotarod : Pour le test du Rotarod (Bioseb), les animaux ont d'abord été habitués à rester sur le cylindre immobile pendant 10 min avant de passer à 10 autres min avec une vitesse de rotation de 4 tours par minute. Les animaux ont reçu le médicament immédiatement après l'entraînement et le test a été effectué 30 minutes plus tard. Le test a consisté à mesurer la latence à la chute des animaux lorsque la rotation passe de 4 à 40 tr/min de façon linéaire sur 5 min. La moyenne des deux valeurs les plus proches sur 3 essais a été calculée.

Enregistrement de la fréquence cardiaque in vivo : Les enregistrements télémétriques de l'ECG ont été réalisés à l'aide d'émetteurs télémétriques TA10EA-F20 (DSI) dans une poche sous-cutanée avec des électrodes filaires jumelées placées sur le thorax comme publié précédemment (Mesirca et al., 2014) [27].

Modèle de douleur animale

Neuropathie aiguë induite par l'oxaliplatine chez la souris : Les souris ont reçu une injection intrapéritonéale (i.p.) d'oxaliplatine à 6 mg/kg dissous dans du glucose à

5% directement après la première évaluation comportementale. 90h après l'administration du médicament, correspondant au temps nécessaire pour atteindre le pic d'hyperalgésie (Descoeur et al., 2011) [9], une deuxième évaluation de la sensibilité au froid et de la sensibilité mécanique a été réalisée.

Neuropathie aiguë induite par le paclitaxel chez le rat : Les rats ont reçu une injection i.p. de diméthyl sulfoxyde (DMSO ; solvant) ou de 1 mg/kg/1 mL de paclitaxel (Sigma-Aldrich, Lyon, France) aux jours J0, J2, J4 et J7. Le test de comportement a été réalisé le jour de la première injection de paclitaxel (J0) et aux jours 10 (J10) et 14 (J14) après l'injection de paclitaxel.

La ligature des nerfs spinaux a provoqué une neuropathie chez le rat : Selon la procédure de Kim et Chung (1992) [16], les rats ont été placés en position couchée et anesthésiés avec 10 mg/kg de xylazine et 75 mg/kg de kétamine (i.p). La fourrure du côté gauche de la colonne vertébrale a ensuite été rasée pour exposer la peau. La peau a été coupée parallèlement à la colonne vertébrale et les muscles paravertébraux ont été séparés. L'apophyse transverse L5 a été enlevée jusqu'à ce que le nerf spinal L5 soit exposé. Le nerf L5 a été isolé et ligaturé avec du fil de soie. Enfin, les incisions musculaires et cutanées ont été suturées et la plaie a été désinfectée avec de l'iodophore et de l'alcool éthylique à 75%. Dans le groupe sham, les rats ont subi la même procédure chirurgicale sans la ligature du nerf.

Tests *ex vivo*

Isolement et quantification de l'ARN : Les paires de DRG des segments lombaires L4 à L6 ont été disséquées et mises en commun. L'ARN a été extrait à l'aide du réactif TRIzol® (Azote) conformément aux instructions du fabricant (Thermofisher). La qualité de l'ARN a été évaluée par le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies), les échantillons dont le RIN (RNA Intégrity Number) était supérieur à 8 ont été conservés pour la suite des analyses. La transcription inverse a été effectuée avec la transcriptase inverse SuperScript II conformément au protocole fourni par Invitrogen. Pour la PCR quantitative en temps réel, l'amplification a été réalisée en utilisant le kit Light Cycler Fast Start DNA (Roche diagnostic) et la quantité d'ADN en temps réel a été mesurée avec un thermocycleur Mastercycler Realplex (Eppendorf). La moyenne de la quantité relative d'ADNc de chaque triplicat a été calculée à l'aide d'une courbe de concentration standard et a été normalisée sur l'ADNc du gène GUS.

Les conditions d'amplification étaient les suivantes : préincubation pendant 7 min à 95 °C suivi de 50 cycles de 20 s à 95 °C et 20 s à la température spécifique d'hybridation de la paire d'amorces suivi de 20 s à 72°C.

Séquençage de l'ARN : Nous avons utilisé l'analyse du séquençage de l'ARN sur les DRG L4-L5-L6 de souris traitées à l'oxaliplatine (3mg/kg, i.p.) ou au véhicule deux fois par semaine pendant 3 semaines. À la fin de l'expérience (D21), les souris ont été anesthésiées et mises à mort, et les DRG L4-L5-L6 ont été rapidement récoltés, congelés dans de l'azote liquide et stockées à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les ARNs totaux des DRG L4-L5-L6 ont été extrait à l'aide du kit RNeasy Micro (Qiagen) selon le protocole du fabricant et l'ARN Ribosomal éliminé en utilisant Ribo-Zero Plus rRNA depletion kit (Illumina). La concentration d'ARN a été déterminée à l'aide de la plaque de quantification des acides nucléiques Take3 (Epoch, BioTek, USA). L'intégrité de l'ARN a été analysée par un instrument d'électrophorèse capillaire (Fragment Analyser, Agilent®) et envoyée à Fasteris (https://www.fasteris.com) pour le séquençage de l'ARN. Les bibliothèques ont été préparées en utilisant le protocole TruSeq d'Illumina et un séquençage basé sur SBS a été réalisé en utilisant une plateforme HiSeq 2500 (Illumina). L'analyse a été effectuée en différentes étapes : cartographie des jonctions d'épissage (TopHat2), comptage (HTSeq-count), filtrage, normalisation (edgeR, DESeq et DESeq2) et analyse différentielle (edgeR, DESeq et DESeq2) effectuée par Benjamin Bertin et Yoan Renaud (GreD, Clermont-Ferrand).

Fractionnement des membranes : Les tissus ont été homogénéisés dans un tampon HEPES (20mM HEPES pH 7,4, 320mM de saccharose, 5mM d'EDTA, 5mM d'EGTA) contenant des inhibiteurs de protéases à 4 °C, soniqués et centrifugés à 1000 g pendant 15min à 4°C. Les culots ont été éliminés. Pour le spin des organelles, les surnageants ont été centrifugés à 15 000 g pendant 10 min à 4°C et les culots d'organelles ont été conservés. Pour le spin cytosolique, les surnageants ont été centrifugés à 100 000 g pendant 1 heure à 4°C. La fraction cytosolique se trouvait dans les surnageants et la fraction membranaire dans les culots. Les culots de membranes ont ensuite été remis en suspension dans le tampon SB (20mM HEPES pH 7,4, 1M KI, 5mM EDTA, 5mM EGTA à 4 degrés) et centrifugé à 100 000 g pendant 1 heure à 4°C pour éliminer les protéines membranaires faiblement liées. Les fractions membranaires ont ensuite été remises en suspension dans du tampon RB (20mM HEPES pH 7,4, 100mM NaCl, 5mM EDTA, 5mM EGTA) contenant du Triton (1 %) et des inhibiteurs de protéases. Après sonication dans un bain de glace, les fractions

membranaires ont par la suite été soumises à une agitation douce pendant 2 heures à 4°C. °C. Les fractions membranaires solubilisées ont été centrifugées à 100 000 g pendant 1 heure à 4°C. La fraction membranaire se trouvait dans le surnageant.

Western blot : Les DRG L4 à L6 de trois souris ont été mis en commun et homogénéisés dans un tampon de lyse contenant du triton (1%) et des inhibiteurs de protéases. Les homogénats ont été centrifugés à 18 000 g 20 min à 4°C et les surnageants collectés. 50 µg de protéines totales ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel à 7,5 %. Après transfert sur membrane de nitrocellulose et saturation avec du BSA (5%), les anticorps primaires ont été utilisés à une dilution de 1/500 pour HCN1 et HCN2 (Neuromab), 1/1000 pour TRIP8b (Neuromab), et 1/5000 pour Actinβ (Sigma-Aldrich). Après 3 lavages successifs avec du TBST, les anticorps secondaires couplés HRP correspondants (ThermoFisher) ont été incubés à une dilution au 1/10 000 et détectés avec le substrat chimioluminescent (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermofisher).

Enregistrement par patch-clamp : Les expériences d'électrophysiologie ont été réalisées sur des cellules cardiaques pacemaker isolées comme précédemment décrit (Marger et al., 2011) [28]. La technique du patch-clamp en cellule entière a été utilisée pour enregistrer les courants If générés par les canaux HCN, en employant un amplificateur Axopatch 200A (Axon Instruments Inc., Foster USA). Les électrodes d'enregistrement de résistance de ~5m MΩ ont été remplies par une solution intracellulaire contenant (mM/L) : K+-aspartate, 130 ; NaCl, 10 ; sel ATP-Na+, 2 ; phosphate de créatine, 6,6 ; GTP-Mg2+, 0,1 ; CaCl2, 0,04 (pCa = 7) ; Hepes-KOH, 10 ; (pH = 7,2 avec du KOH). Une solution extracellulaire de Tyrode contenant 5 mM de BaCl2 pour bloquer les courants IK1 a été utilisée. L'effet de la molécule NUCC5953 (5µM) sur l'amplitude et la cinétique du courant If a été comparé à celui de l'ivabradine (3µM), tous les deux dilués dans la solution extracellulaire. L'acquisition des données a été effectuée en utilisant le logiciel pClamp (ver. 9, Axon Instruments Inc.).

Essais *in vitro*

Essai de polarisation de la fluorescence : un test basé sur la polarisation de fluorescence (FP) a été utilisé pour identifier les composés capables de perturber l'interaction entre le HCN et la queue TRIP8b, comme cela a été publié (Han et al., 2015) [13].

EXAMPLE 2 : RESULTATS

Pour la première fois la présence de l'ARNm TRIP8b (les données RNAseq obtenues à partir de souris DRG montrent la présence (FPKM>1) des variantes d'épissage 2 à 5 : NM_01163516, NM_01163517, NM_01289505, NM_01310460) et de la protéine dans les neurones DRG et TG chez la souris, a été observée. De plus, l'expression des transcrits et des protéines des canaux HCN1-2 et de TRIP8b a été significativement augmentée dans les neurones périphériques des animaux traités à l'oxaliplatine par rapport aux témoins, ce qui suggère l'implication des 2 protéines dans le développement de l'OIPN (souris modèle de neuropathie induite par oxaliplatine) (Figure 1 A-C). L'analyse de l'expression de la protéine TRIP8b dans la moelle épinière des animaux traités avec une seule (Figure 1D) ou après administration répétée (figure 1E) d'oxaliplatine par rapport au véhicule montre une nette augmentation de la protéine TRIP8b sous l'effet de l'oxaliplatine.

En utilisant NUCC5953, une molécule capable de perturber l'interaction TRIP8b-HCN (Han et al., 2015) [13], il a été démontré que l'hypersensibilité au froid aiguë induite par l'oxaliplatine peut être inversée en fonction de la dose administrée soit par voie i.t. (0,2 ; 1 ; 5 µg /souris ; Figure 2) ou par voie systémique (4mg/kg ; Figure 3).

Aucune altération de l'activité locomotrice n'a été observée lors du test Rotarod lorsque les souris ont été traitées avec NUCC5953 (4mg/kg) administrée par voie sous-cutanée (Figure 4).

Parallèlement, des données préliminaires suggèrent également que l'administration de NUC5953 réduit la surexpression des protéines HCN1 et 2 et TRIP8b dans la fraction membranaire des neurones de DRG des animaux OIPN (Figure 5).

Les expériences de patch-clamp sur des cellules pacemaker cardiaque isolées n'ont montré aucun effet du NUCC5953 sur l'amplitude du courant If, contrairement à l'Ivabradine, un bloqueur pan-HCN (Figure 6).

NUCC5953 n'affecte pas la fréquence cardiaque *in vivo* lorsqu'il a été administré à une dose analgésique (4mg/kg, i.p.) (Figure 7). Les résultats montrent que la moyenne de fréquence cardiaque n'est pas modifiée chez trois souris avant (A), au moment de l'injection de NUCC5953 (B) et 30 minutes après injection (C).

EXEMPLE 3 : CONCEPTION DES PEPTIDOMIMETIQUES

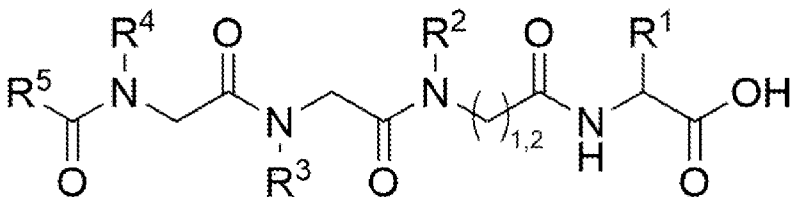
Conception de peptidomimétiques

A- Peptidomimétiques tétramères

Des composés peptoïdes imitant la séquence de l'extrémité carboxy-terminale du canal HCN2 ont été conçus et synthétisés. La conception de ces peptidomimétiques s'est appuyée sur une étude approfondie de la structure aux rayons X d'un co-cristal de TRIP8b avec la région C-terminale de HCN2, disponible dans la base de données des protéines (pdb : 4EQF). Un travail de modélisation préparatoire destiné à compléter et à améliorer cette structure a été réalisé. Les parties manquantes ont été modélisées par homologie de séquences provenant de différentes structures PEX5 (PDB : 1FCH, 3R9A, 4KXK, 4KYO, 2J9Q, 2C0M et 2C0L) présentant une identité de séquence allant de 30 à 60% avec TRIP8b. Le modèle résultant a permis d'identifier les contacts entre résidus responsables de la formation du complexe HCN-TRIP8b. Cette étude a notamment permis d'identifier deux poches hydrophobes du domaine TPR de TRIP8b, essentielles à une bonne affinité des ligands à ce domaine protéique (Figure 8).

La poche hydrophobe 1 de TRIP8b assure un ancrage de la chaîne latérale du résidu C-terminal des ligands. Une interaction efficace des ligands avec la poche hydrophobe 2, située à proximité de la région centrale de TRIP8b, identifiée comme site de liaison au domaine CNBD de HCN, permet également de renforcer l'affinité des inhibiteurs. Plusieurs oligomères hybrides peptide-peptoïde de 4 résidus et portant diverses chaînes latérales capables de cibler ces poches hydrophobes ont été conçus et évalués par dynamique moléculaire (DM).

La conception basée sur la structure a permis d'identifier des ligands peptidomimétiques interagissant au site de liaison peptidique SNL (domaines TPR) de TRIP8b. Ces ligands ont une formule qui est représentée par la formule LF108 ci-dessus ou la formule générale (I) suivante :



I

où

R^1, R^2, R^3, R^4 et R^5 sont tels que définis précédemment.

Les composés sont des oligomères hybrides peptide-peptoïde (peptomères) (Ostergaard et al., 1997) [17]. Ils comprennent quatre résidus dont un α-amino acide positionné à l'extrémité C-terminale de la séquence, et trois résidus peptoïdes consécutifs. Le troisième résidu (à partir de l'extrémité N-terminale) est soit une unité ß-peptoïde soit une unité α-peptoïde. Les α-peptoïdes généralement appelés « peptoïdes » font référence aux oligomères de glycine N-substitués (Simon et al., 1992) [18]. Par rapport aux peptides, les chaînes latérales sont attachées aux atomes d'azote des liens amide plutôt qu'aux atomes de carbone α. Les ß-peptoïdes sont des oligomères composés d'unités d'acide ß-aminopropionique N-substitués (Hamper et al., 1998) [19]. Ainsi, un résidu ß-peptoïde contient un groupe méthylène supplémentaire dans le squelette par rapport à un résidu α-peptoïde. Les peptoïdes présentent des caractéristiques avantageuses pour le développement de composés bioactifs. Ils se prêtent à la synthèse en phase solide, en utilisant une approche itérative dite "sous-monomère" dans laquelle chaque nouvelle unité est construite en deux étapes (Zuckermann et al., 1992) [20]. Les peptoïdes peuvent incorporer des chaînes latérales très diverses, aussi bien des chaînes latérales protéinogènes que des chaînes latérales non naturelles (Culf et al., 2010) [21]. Les synthèses « sous-monomères » utilisent des molécules de départ simples telles que l'acide bromoacétique et des amines primaires pour la construction d'unités α et le chlorure d'acryloyle et des amines primaires pour la construction d'unités ß-peptoïdes. Les amines primaires, à partir desquelles les chaînes latérales sont incorporées, sont disponibles commercialement par centaines, ou peuvent être préparées avant leur utilisation le cas échéant. Il a été démontré que le squelette peptoïde reposant sur des amides *N*,*N*-disubstitués (amides tertiaires) est résistant aux protéases (Miller et al., 1995) [22]. La présence de liaisons amides tertiaires leur confère également une meilleure perméabilité cellulaire (Kwon et al., 2007 ; Vollrath et al., 2013) [23, 24], et quelques études tendent à démontrer que les peptoïdes sont moins immunogènes que les peptides (Li et al., 2010 ; Chongsiriwatana et al., 2008) [25, 26].

Les synthèses ont été réalisées sur de la résine chlorure de 2-chlorotrityle (2-CTC) conduisant à un acide carboxylique à l'extrémité C-terminale du peptomère après clivage. Le premier résidu immobilisé sur le support, un α-amino acide, a été choisi principalement dans le groupe des acides aminés protéinogènes hydrophobes,

dont la L-leucine qui correspond à l'extrémité C-terminale du peptide SNL. Les α-amino acides ont été immobilisés sur la résine sous une forme protégée N-Fmoc. Après élimination du groupe Fmoc, l'extension de la chaîne par les résidus peptoïdes a été réalisée par des approches de "chimie sous-monomères". Des protocoles connus ont été mis en œuvre mais certains ajustements techniques ont été nécessaires pour la synthèse du monomère ß-peptoïde. L'extrémité N-terminale a été acylée avant le clivage en condition acide par l'hexafluoroisopropanol (HFIP) et la déprotection des chaînes latérales par de l'acide trifluoroacétique (TFA) dans le dichlorométhane

Les composés peptomères bruts ont été analysés par LC-MS puis purifiés sur des cartouches de chromatographie flash C18 avec une détection UV à 214 et 220 nm. Les fractions pures ont été rassemblées et lyophilisés. Les composés purs ont été analysés par HPLC en phase inverse sur colonne Nucleodur® C_4 (5 µm, 300 Å, 250 mm x 4,6 mm). Le Tableau 2 ci-dessous présente les données HRMS et HPLC des composés.

Tableau 2

Référence molécule	masse attendue	masse observée / formule	temps de rétention (min) chromatogrammes LCMS[a] ou HPLC[b]	pureté HPLC (%)[c]
YC55	564.3159	565.3227 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{45}N_4O_8$	22,02[b]	97
YC60	564.3159	565.3229 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{45}N_4O_8$	3,74[a]	n.d.
MP208	598.3003	599.3075 $[M+H]^+$ / $C_{31}H_{43}N_4O_8$	22,86[b]	92
MP281	536.2846	537.2919 $[M+H]^+$ / $C_{26}H_{41}N_4O_8$	20,69[b]	96
MP341	578.3316	579.3388 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{47}N_4O_8$	4,05[a]	n.d.
MP354	578.3316	579.3388 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{47}N_4O_8$	3,81[a]	n.d.
MP376	578.3316	579.3388 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{47}N_4O_8$	3,76[a]	n.d.
MP377	592.3472	593.3545 $[M+H]^+$ / $C_{30}H_{49}N_4O_8$	3,81[a]	n.d.
MP405	550.3003	551.3075 $[M+H]^+$ / $C_{27}H_{43}N_4O_8$	21,59[b]	85
LF40	563.2955	564.3021 $[M+H]^+$ / $C_{27}H_{42}N_5O_8$	21,66[b]	91
LF96	594.3265	595.3337 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{47}N_4O_8$	22,06 [b]	92
LF108	609.3010	608.2939 $[M+H]^-$ / $C_{28}H_{42}N_5O_{10}$	22,07 [b]	92
LF176	577.3112	578.1388 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{44}N_5O_8$	21,53[b]	97

LF126	578.3316	579.3381 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{47}N_4O_8$	24,53 [b]	89
LF188	632.3033	633.3099 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{44}F_3N_4O_8$	23,30 [b]	98
LF222	564.3159	565.3229 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{45}N_4O_8$	21,55 [b]	94
LF239	564.3159	565.3228 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{45}N_4O_8$	21,12 [b]	95
LF261	582.3065	583.3138 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{44}FN_4O_8$	21,34 [b]	98
LF275	563.3319	564.3395 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{46}N_5O_7$	30,79 [b]	94
LF295	550.3003	551.3068 $[M+H]^+$ / $C_{27}H_{43}N_4O_8$	20,36 [b]	86
LF306	578.3316	579.3387 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{47}N_4O_8$	21,32 [b]	95
LF329	563.3319	564.3383 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{46}N_5O_7$	20,90 [b]	95
LF400	578.3316	579.3381 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{47}N_4O_8$	21,78 [b]	91
LF369	389.4490	390.2231 $[M+H]^+$ $C_{17}H_{32}N_3O_7$	18,32[b]	90

[a]LCMS. Chaîne UHPLC Ultimate 3000 RSLC (ThermoScientific), colonne Kinetex EVO C18 (100 x 2,1mm; 1,7µm) (Phenomenex), débit: 0.45 mL/min, four colonne: 30°C, gradient H_2O (0,1% acide formique/ ACN (0,1% acide formique) : t = 0 min 95:5 ; t = 7,5 min 1:99, t = 8,5 min 1:99 ; t = 9 min 95:5 ; t = 11 min 95:5.

[b]HPLC Chaîne Agilent série 1100, colonne Nucleodur® C_4 (5 µm, 300 Å, 250 mm x 4,6 mm), débit 0,5 mL/min. gradient H_2O/ACN (0,1% TFA) : t = 0 min 95:5 ; t = 5 min 95:5 ; t = 25 min 5:95 ; t = 35 min 5:95, t = 40 min 95:5, t = 50 min 95:5.

[c]Détection UV 214 nm

Chaînes latérales

R^1 est de manière indépendante CH_3 (L-Ala), $CH(CH_3)_2$ (L-Val), $CH(CH_3)CH_2CH_3$ (L-Ile), $CH_2CH(CH_3)_2$ (L-Leu and D-Leu), $CH_2C(CH_3)_3$, $C(CH_3)_3$, CH_2(cyclobutyl) ;

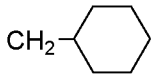
R^2, **R^3**, et **R^4** sont les chaînes latérales des unités peptoïdes incorporées séquentiellement au cours de la synthèse à partir d'amines primaires ;

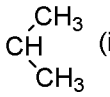
R^2 et **R^3** sont choisis de manière indépendante parmi : $CH_2CH(CH_3)_2$, $CH_2CH_2NH_2$, CH_2CH_2OH, $CH_2CH_2CH_2OH$, $CH_2CH(OH)CH_3$, CH_2CONH_2, $CH_2CH_2CONH_2$. Les chaînes latérales présentant une fonction alcool ou amine ont été incorporées aux oligomères sous forme protégée : éther de silyle pour la fonction alcool et tert-butyl carbamate (Boc) pour la fonction amine ;

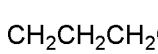
R^4 est un groupe aliphatique ou aromatique choisi parmi :

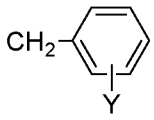
$CH_2CH(CH_3)_2$ (isobutyle)

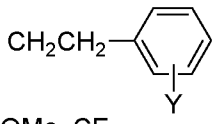
$CH_2C(CH_3)_3$ (neopentyle)

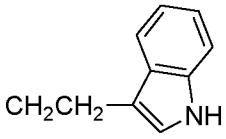

(cyclohexylmethyle)


(isopropyle)


(*n*-butyle)


Y = H, OMe, CF_3



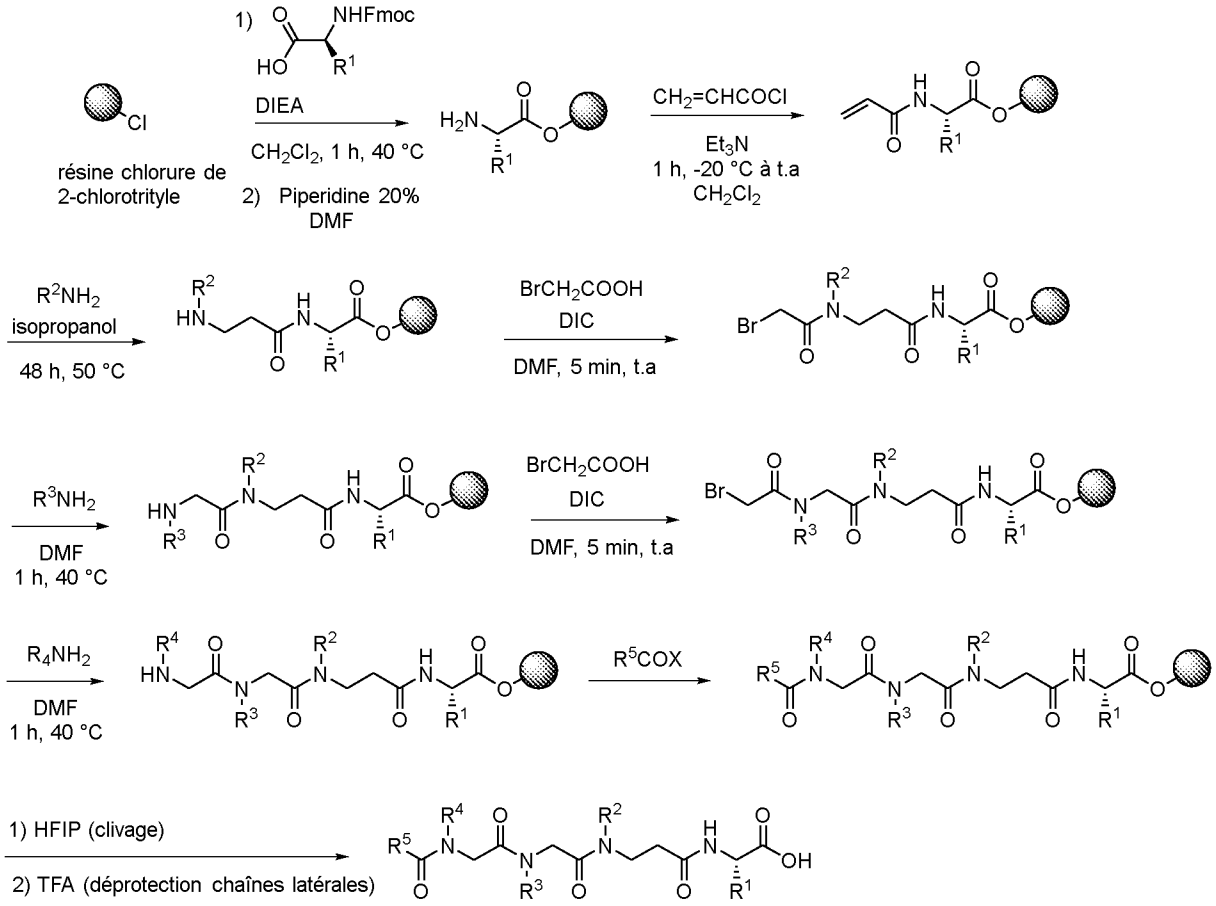


$(CH_2)_n$—Z n = 2 à 8
Z = OH, NH_2, COOH, SH, N_3, C≡CH

;

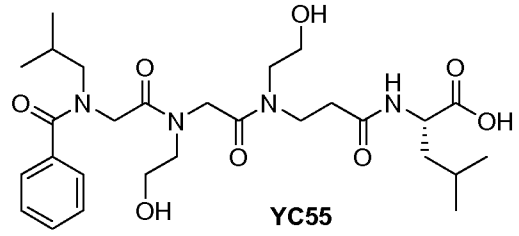
R^5 est de manière indépendante CH_3, $CH(CH_3)_2$, $CH_2C_6H_5$, C_6H_4X (où X en position ortho, méta ou para est de manière indépendante H, OMe, CF_3, CH_3, CH_2CH_3, F, Br, Cl, NO_2), 3-indolyl, 3-quinolinyl.

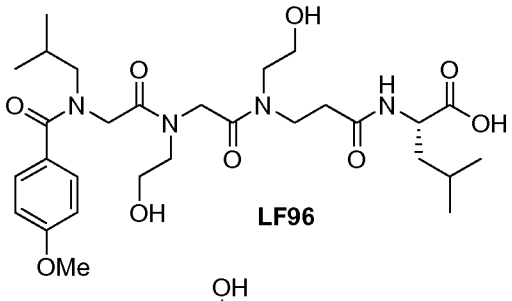
Schéma synthétique représentatif sur résine de chlorure de 2-chlorotrityle, pour la synthèse de peptomères N-acylés incorporant un acide α-aminé à l'extrémité C-terminale, suivi d'un résidu ß- et de deux résidus α-peptoïdes.

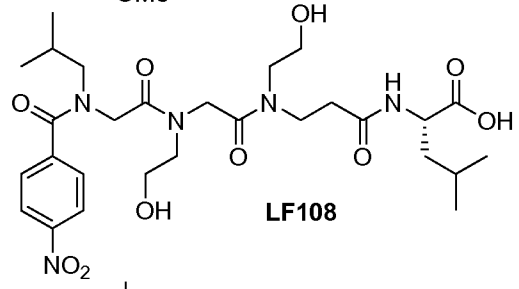


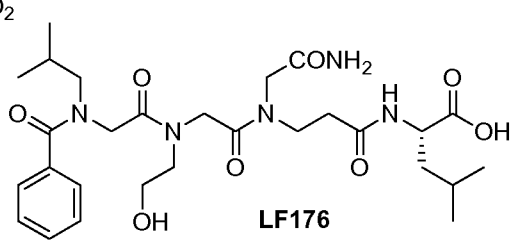
DIEA : diisopropyléthylamine ; Fmoc : fluorénylméthyloxycarbonyle ; DMF : N,N-diméthylformamide ; DIC : diisopropylcarbodiimide ; HFIP : 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol ; t.a : température ambiante ; TFA : acide trifluoroacétique

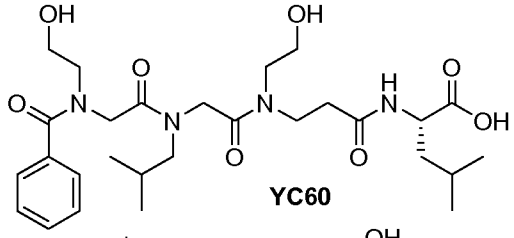
Molécules synthétisées

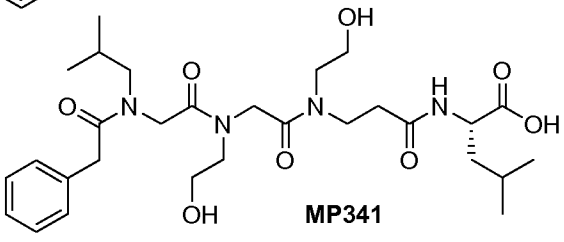

YC55

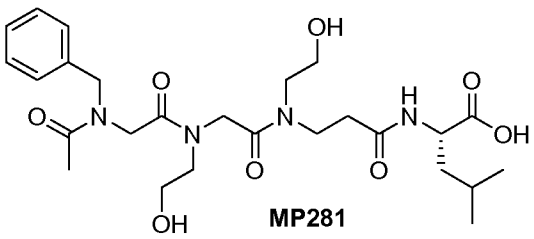

LF96

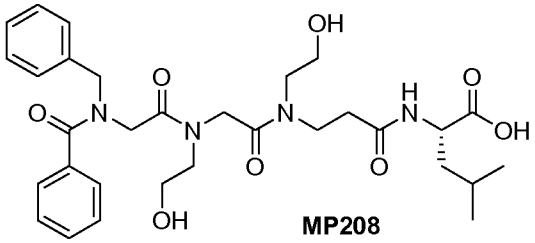

LF108

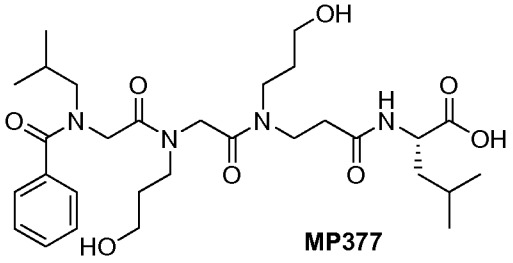

LF176

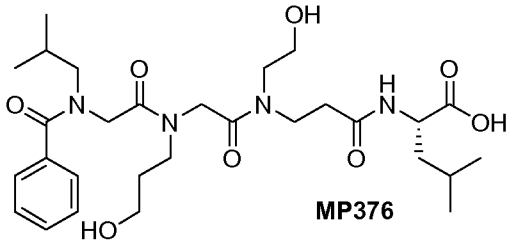

YC60

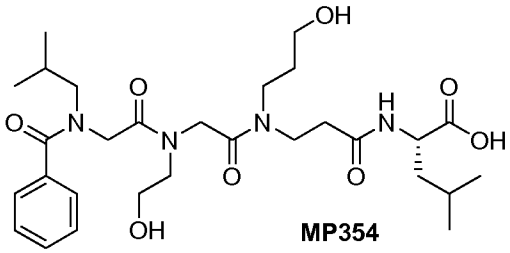

MP341

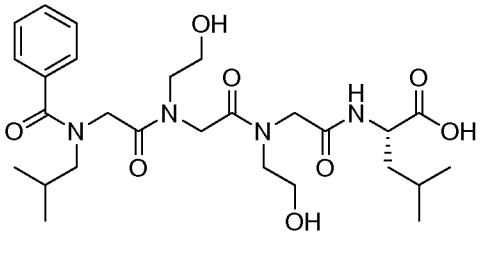

MP281

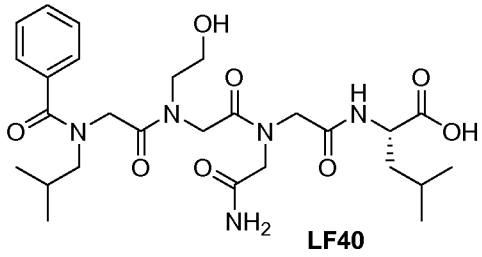

MP208

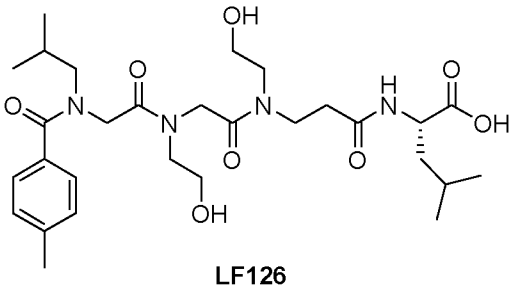

MP377


MP376

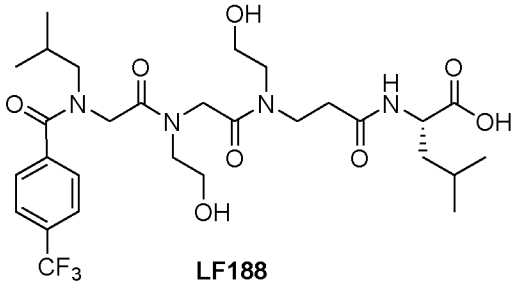

MP354


MP405

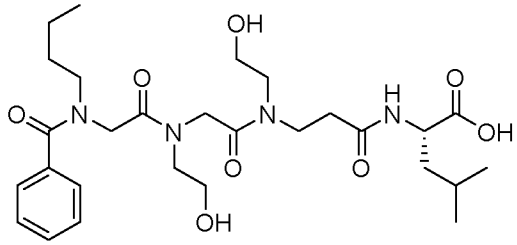

LF40



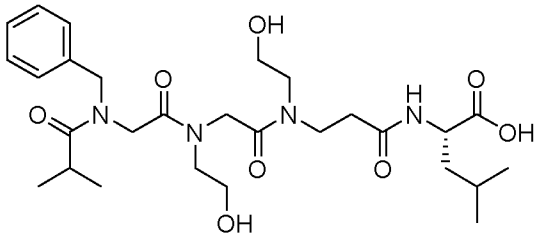
LF126



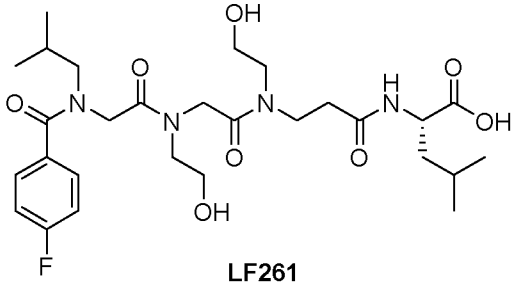
LF188



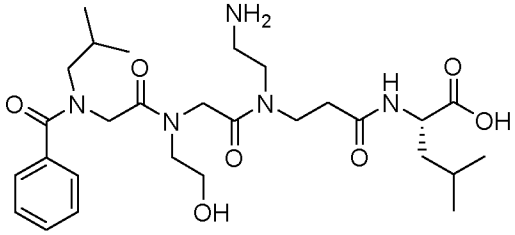
LF222



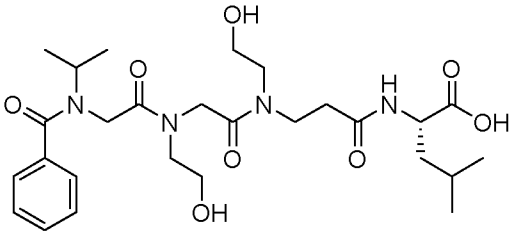
LF239



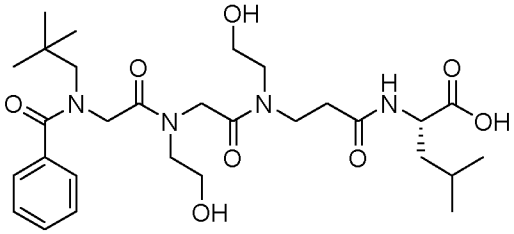
LF261



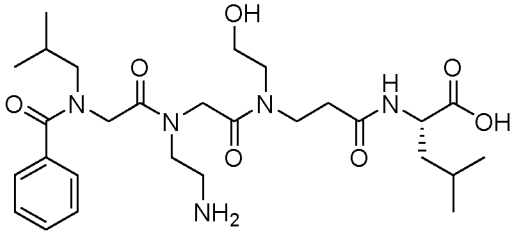
LF275



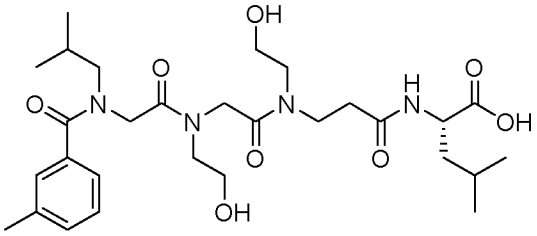
LF295



LF306



LF329



LF400

Synthèse

Les composés correspondant à la formule générale (I) ont été synthétisés sur une résine de type chlorure de 2-chlorotrityle (Novabiochem 100-200 mesh) dans des seringues en plastique de 5 mL équipées d'un fritté et d'un robinet d'arrêt. Les seringues ont été placées sur une plateforme chauffante à agitation orbitale pendant les réactions.

Dans une synthèse typique décrite avec de la L-leucine à l'extrémité C-terminale et un résidu ß-peptoïde précédant cet acide aminé, de la résine chlorure de 2-chlorotrityle (1,33 mmol g^{-1}, 0,100 g, 0,133 mmol) a été mise à gonfler dans 2 mL de CH_2Cl_2 sec (2 × 20 min). Après filtration, 0,12 mL d'une solution 2,2 M de Fmoc-Leu-OH dans le CH_2Cl_2 (2,0 équivalents) a été ajoutée, suivie de 2,0 mL d'une solution 0,4 M de DIEA dans le CH_2Cl_2 (6,0 équivalents). Le mélange a été agité pendant 40 min à 25 °C. La résine a été égouttée, lavée avec du CH_2Cl_2 (2 x 2 mL) et la fixation de la Fmoc-Leucine à la résine a été répétée dans les mêmes conditions. La résine a été lavée avec du CH_2Cl_2 (5 x 2 mL). Le groupe Fmoc a été éliminé par ajout de 2,0 mL d'une solution de pipéridine à 20 % dans le DMF et agitation pendant 15 minutes à température ambiante. L'opération a été répétée dans les mêmes conditions, après quoi la résine a été lavée avec du DMF (5 x 2 mL) et égouttée.

Introduction du résidu ß-peptoïde. La résine a été refroidie par deux lavages avec du CH_2Cl_2 à -20 °C. 1,21 mL d'une solution 0,22 M de chlorure d'acryloyle (2,0 équivalents) dans du CH_2Cl_2 refroidie à -20°C a été ajoutée, suivie de 0,8 mL d'une solution 0,5 M de Et_3N (3,0 équivalents) dans du CH_2Cl_2 refroidie (-20 °C). La résine a été agitée pendant 1 h à 25 °C, égouttée, puis traitée à nouveau avec du chlorure d'acryloyle dans les mêmes conditions. La résine a été filtrée et lavée avec du CH_2Cl_2 (5 × 2 mL), puis égouttée. L'acrylamide obtenu a été traité par une solution 2,0 M de l'amine R^2NH_2 dans l'isopropanol (12,0 équivalents) pendant 24 h à 50 °C. Après filtration de la résine, la réaction d'aza-Michael a été répétée dans les mêmes conditions. La résine a été lavée avec de l'isopropanol (5 x 2 mL) avant la synthèse sous-monomère de deux résidus α-peptoïdes.

Synthèse des résidus α-peptoïdes. A la résine ont été ajoutées 2,0 mL d'une solution 0,4 M d'acide bromoacétique dans le DMF (6,0 équivalents), suivie de 2,13 mL d'une solution 0,5 M de DIC dans le DMF (8,0 équivalents). Après avoir été agitée pendant 5 minutes à 25 °C, la résine a été égouttée et lavée avec du DMF (5 x 2 mL). Le bromoacétamide obtenu a ensuite été traité par une solution 2.0 M de l'amine R^3NH_2 (20,0 équiv) dans le DMF et le mélange a été laissé sur la plate-forme

d'agitation pendant 1 h à 40 °C. La résine a été filtrée et lavée avec du DMF (5 x 2 mL). Les deux dernières étapes de bromoacétylation et de substitution ont été reproduites dans les mêmes conditions afin de construire le quatrième résidu portant la chaîne latérale R^4 souhaitée. L'extrémité N-terminale du peptomère a ensuite été acylée selon l'une des procédures générales décrites ci-après, avant son décrochage de la résine.

Pour le clivage, la résine a été traitée par 1,5 mL d'une solution 2,4 M de HFIP dans du CH_2Cl_2. Après agitation pendant 40 minutes à 25°C, la résine a été filtrée et lavée avec du CH_2Cl_2 (5 x 2 mL). Le solvant a été éliminé sous pression réduite. Enfin, les groupes protecteurs silylés ou Boc des chaînes latérales ont été éliminés par traitement du peptomère par 2 mL de TFA à 25 % (v/v) dans du CH_2Cl_2 pendant 10 minutes à température ambiante. Le mélange réactionnel contenant le produit final a été dilué avec du CH_2Cl_2 (5 mL) avant l'évaporation complète sous vide. Afin d'éliminer toute trace de TFA, le produit dissous dans le CH_2Cl_2 a été évaporé sous vide, en répétant cette opération 5 fois.

<u>Procédures générales pour l'acylation de l'extrémité N-terminale du peptomère lié à la résine</u>

Acétylation : À la résine a été ajoutée 1,56 mL d'une solution 1,7 M d'anhydride acétique dans le DMF (20,0 équivalents), suivie de 0,8 mL d'une solution 2,0 M de DIEA dans le DMF (12,0 équivalents). Après avoir été agitée pendant 90 minutes à 25 °C, la résine a été filtrée et lavée avec du DMF (5 x 2 mL).

Benzoylation : À la résine a été ajoutée 0,8 mL d'une solution 1.0 M de chlorure de benzoyle dans du CH_2Cl_2 (6,0 équiv.), suivie de 0,8 mL d'une solution 2,0 M de DIEA dans du CH_2Cl_2 (12,0 équiv.,). Après avoir été agitée pendant 40 minutes à 25 °C, la résine a été égouttée et lavée avec du CH_2Cl_2 (5 x 2 mL).

Acylation à partir d'acides carboxyliques : Dans une réaction de couplage typique décrite ici à partir de l'acide phénylacétique, 2,0 mL d'une solution 0,4 M d'acide phénylacétique dans le DMF (6,0 équivalents) et 2,13 mL d'une solution 0,5 M de DIC (8,0 équivalents) dans le DMF ont été ajoutées successivement à la résine. Après avoir été agitée pendant 1 h à 25 °C, la résine a été égouttée et lavée avec du DMF (5 x 2 mL).

Parmi les composés (YC55, YC-60) qui ont été synthétisés, YC55 a démontré une puissance égale à NUCC5953 pour perturber l'interaction TRIP8b-HCN (Tableau 1 : IC50 des peptoïdes).

Tableau 1

	YC55	YC60	Acox3
IC50	8.862	12.71	0.6029

L'effet analgésique de composés peptidomimétiques innovants injectés soit par voie intrathécale soit par voie systémique a été démontré dans la douleur neuropathique aiguë induite par l'oxaliplatine chez la souris.

Ainsi, le composé principal YC55 a démontré un effet analgésique dépendant de la dose chez les souris OIPN lorsqu'il est administré par voie i.t. (Figure 9).

Le composé YC55 a également démontré un effet analgésique dépendant de la dose chez les souris OIPN lorsqu'il est administré par voie s.c. (Figure 10).

Aucune altération de l'activité locomotrice n'a été observée lors du test Rotarod lorsque les souris sont traitées par YC55 administré par voie sous-cutanée (Figure 11).

YC55 a également démontré un effet analgésique dépendant de la dose dans un modèle de rat de neuropathie induite par le paclitaxel lorsqu'il est administré par voie i.t. (Figure 12).

L'administration intrathécale de YC55 a montré un effet antihypéralgique dans un modèle de neuropathie induite par une lésion traumatique du nerf sciatique (Figure 13), ce qui suggère que la stratégie de perturbation de l'interaction TRIP8b pourrait avoir un effet analgésique dans plusieurs états de douleur neuropathique.

Les composés MP208, MP405 (5µg, i.t.) et MP341, MP354, MP376 (10mg/kg, s.c.) ont démontré un effet analgésique dans un modèle de neuropathie induite par l'oxaliplatine chez la souris (Figure 14 et Figure 15 respectivement).

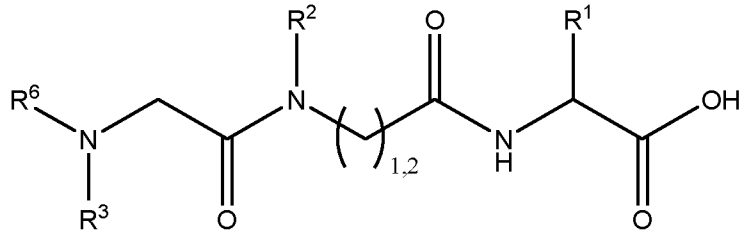
De même, les composés LF108, LF306, LF188 (Figure 16), LF400, LF329, et LF295 (Figure 17), LF275, LF261 et LF126 (Figure 18), LF239, LF222 et LF176 (Figure 19), ont démontré un effet analgésique (5µg, i.t.) dans un modèle de neuropathie aigüe induite par l'oxaliplatine chez la souris.

B- Peptidomimétiques trimères

Les composés peptomères trimériques sont également des mimes de la séquence de l'extrémité carboxy-terminale du canal HCN_2. Ils ont été conçus en

s'appuyant sur l'étude approfondie de la structure aux rayons X d'un co-cristal de TRIP8b avec la région C-terminale de HCN2 (pdb : 4EQF)

Ces ligands ont une formule qui est représentée par la formule LF369 ci-dessous ou la formule générale (II) suivante :



II

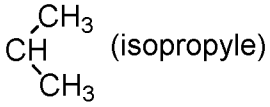
où

R^1, **R**^{2} et **R**^{3} sont tels que définis précédemment ;

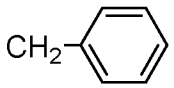
R^6 est H, **R**^{3}, CO**R**^{5} (où **R**^{5} est tel que défini précédemment), ou **R**^{7} ;

R^7 est de manière indépendante un groupe parmi :

$(CH_2)_w$ alkyle (w = 1-4)



(isopropyle)



(phénylméthyle)


(phényle)


(cyclohexyle)

.

Les composés sont des oligomères hybrides peptide-peptoïde (peptomères) (Ostergaard et al., 1997) [17]. Ils comprennent trois unités dont un α-amino acide positionné à l'extrémité C-terminale de la séquence, suivi par deux résidus peptoïde.

Les synthèses ont été réalisées en solution à partir d'un acide α-aminé protégé sous forme d'ester de *tert*-butyle (Xaa-*t*Bu, la L-Leu-*t*Bu dans le cas de la synthèse de LF369). Ces synthèses peuvent également être réalisées sur résine comme précédemment décrit pour les peptidomimétiques tétramères. A partir de cette unité, l'élongation a été réalisée comme pour les molécules répondant à la formule générale (I), par des approches de "chimie sous-monomères ». Lorsque l'unité centrale est de type β-peptoïde, les deux étapes nécessaires à sa construction sont la réaction de Xaa-*t*Bu avec le chlorure d'acryloyle, suivi d'une réaction aza-Michael permettant d'introduire la chaîne latérale souhaitée (**R**^{2}) au squelette. La troisième unité α-peptoïde est construite par acylation du dimère avec le bromure de l'acide bromoacétique suivi de la substitution de l'atome de brome par une amine. Dans le cas où **R**^{6} est H, l'amine utilisée est une amine primaire **R**$^3NH_2$. Lorsque **R**^{6} est CO**R**^{5}, l'amine secondaire obtenue après traitement par **R**$^3NH_2$ est acylée par un chlorure

d'acide, un anhydride d'acide ou un acide carboxylique dans des conditions de couplage. Les composés pour lesquels $\mathbf{R^6} = \mathbf{R^7}$ sont obtenus en traitant les dimères bromoacétylés à l'extrémité N-terminale par une amine secondaire $\mathbf{R^3R^7}NH$. Ils peuvent également être obtenus par amination réductrice des composés dont l'extrémité N-terminale est $NH\mathbf{R^3}$. L'étape finale consiste à déprotéger les chaînes latérales et l'extrémité C-terminale par un traitement au TFA.

Le protocole expérimental précis pour la synthèse de LF369 est le suivant :

Dans un ballon, la L-leu-*t*Bu (1,74 g, 7,8 mmol) est dissoute dans 45 mL de THF anhydre. Le ballon sous atmosphère inerte d'argon est refroidi à 0°C. La triéthylamine (2,3 mL, 31,4 mmol, 4 équiv.) est ajoutée, suivi du chlorure d'acryloyle (0,76 mL, 9,4 mmol, 1,2 équiv). Après 3 h d'agitation à 0 °C une chromatographie sur couche mince (50/50 cyclohexane/AcOEt) indique une conversion totale. Les sels formés sont éliminés par filtration, le filtrat est évaporé sous vide et le produit obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (50/50 cyclohexane/AcOEt). L'acrylamide est isolé avec un rendement de 93% (1,76 g, 7,27 mmol) sous la forme d'un solide blanc.

Réaction aza-Michael. L'acrylamide formé précédemment (1,76 g, 7,27 mmol) est dissout dans 20 mL d'éthanol. L'éthanolamine dont la fonction alcool a été protégée sous forme d'éther de tertbutyldiméthylsilyle (2,68 g, 15,28 mmol, 2,1 équiv.) est ajoutée et le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 60 h. Le solvant est alors évaporé et le brut réactionnel purifié par chromatographie sur gel de silice (90/10/0,1 AcOEt/MeOH/Et_3N) ce qui permet l'obtention du dimère avec un rendement de 90 % (2,74 g, 6,58 mmol) sous forme d'une huile jaunâtre.

Réaction d'acylation du dimère. Le dimère (2,74 g, 6,58 mmol) est dissout dans 10 mL de THF, le réacteur est inerté à l'argon puis refroidi à -20°C. De la triéthylamine (1,1 mL, 7,89 mmol, 1,2 équiv.) est ajoutée à la solution, suivi de l'ajout de bromure de 2-bromoacétyle (0,62 mL, 7,89 mmol, 1,2 équiv.). Après 3 h d'agitation à -20 °C, le mélange réactionnel est filtré. Le filtrat obtenu est évaporé et le brut réactionnel est chromatographié sur gel de silice (60/40/0,1 Cyclohexane/AcOEt/Et_3N). Le dimère bromoacétylé est isolé pur avec un rendement de 67% (2,36 g, 4,4 mmol) sous forme d'une huile jaunâtre.

Réaction de substitution. Le produit précédemment obtenu (2,36 g, 4,4 mmol) est dissout dans 10 mL de THF. De la triéthylamine (1,2 mL, 8,8 mmol, 2 équiv.) puis l'éthanolamine protégée $H_2NCH_2CH_2OTBDMS$ (2,31 g, 13,2 mmol, 3 équiv.) sont

ajoutées à la solution. Le milieu réactionnel sous atmosphère d'argon est agité pendant une nuit à température ambiante. Le mélange réactionnel est alors filtré et le filtrat obtenu est évaporé. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (95/5/0.1 AcOEt/MeOH/Et_3N) conduisant au trimère avec un rendement de 83 % (2,30 g, 3,64 mmol) sous forme d'huile.

Acétylation du trimère. L'amine obtenue (2,3 g, 3,64 mmol) est dissoute dans 20 mL d'acétate d'éthyle. De la triéthylamine (2,02 mL, 14,5 mmol, 4 équiv.) puis de l'anhydride acétique (2,75 mL, 29 mmol, 8 équiv.) sont ajoutés à la solution. La réaction est placée sous argon, à température ambiante pendant 60 h. Après évaporation du solvant le brut obtenu est chromatographié sur gel de silice (90/10/0.1 AcOEt/cyclohexane/Et_3N) conduisant au trimère N-acétylé avec un rendement de 92 % (2,27 g, 3,36 mmol) sous forme d'huile incolore.

Déprotection des chaînes latérales et de l'extrémité C-terminale. Le composé trimérique (502 mg, 0,776 mmol, 1 équiv.) est dissout dans 4 mL d'un mélange TFA/ CH_2Cl_2/H_2O (47,5 : 47,5 : 5). Après 2 h d'agitation à température ambiante, 10 mL de dichlorométhane sont ajoutés. Le milieu réactionnel est évaporé sous vide puis 5 coévaporations au dichlorométhane sont effectuées. Le produit est ensuite redissout dans 5 mL d'eau distillée puis laissé sous agitation à température ambiante pendant 2 h. Le solvant est évaporé puis cinq coévaporations au toluène sont effectuées conduisant à LF369 (362 mg) sous forme d'huile.

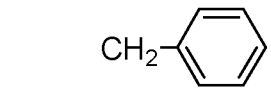
Chaînes latérales

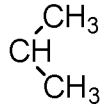
R^1, **R^2** et **R^3** sont tels que définis précédemment ;

R^6 est **R^3**, H, CO**R^5** (où **R^5** est tel que défini précédemment), ou **R^7** ;

R^7 est de manière indépendante un groupe parmi :

$(CH_2)_wCH_3$ alkyle (w = 1-4)


(phénylméthyle)


(isopropyle)


(phényle)


(cyclohexyle)

.

Schéma synthétique représentatif de la synthèse en solution de peptoïdes de formule générale (II), *e.g.* LF369

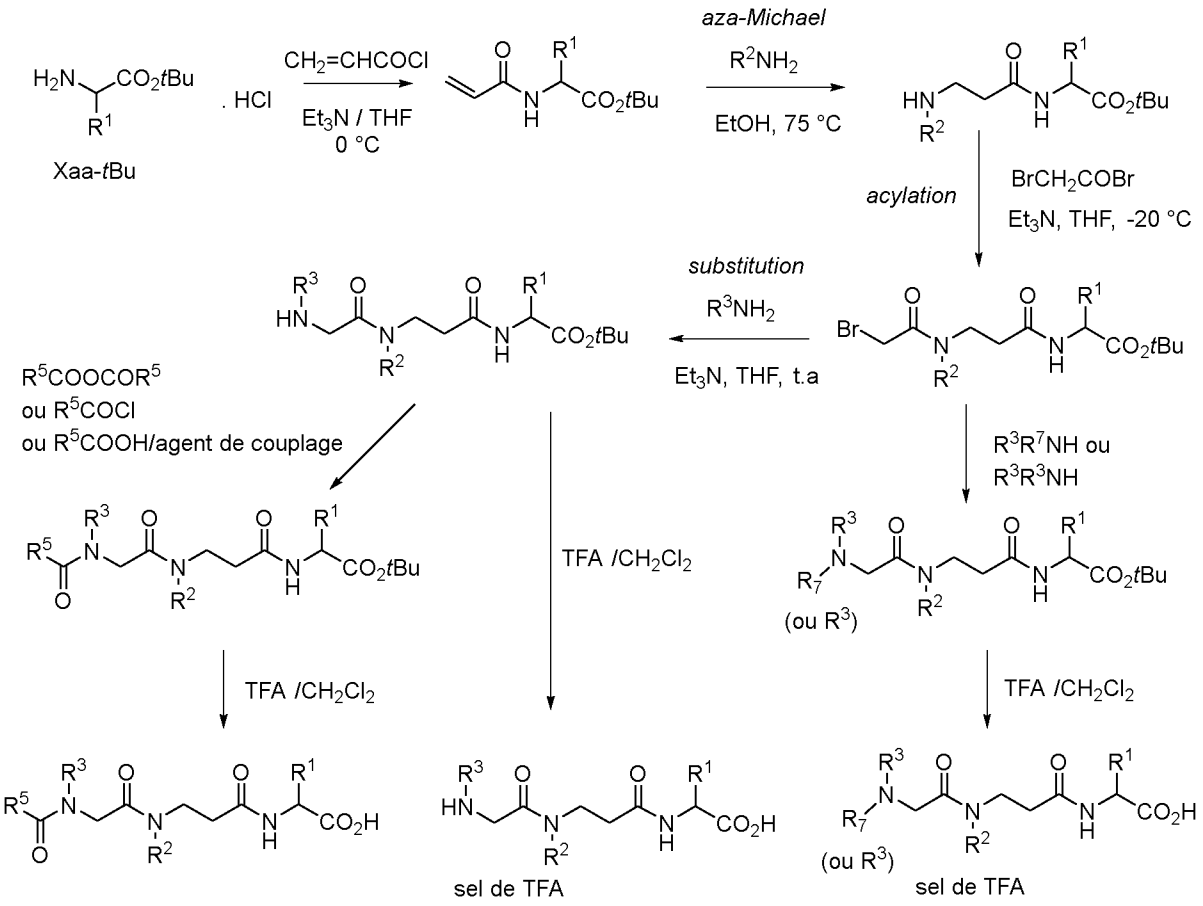
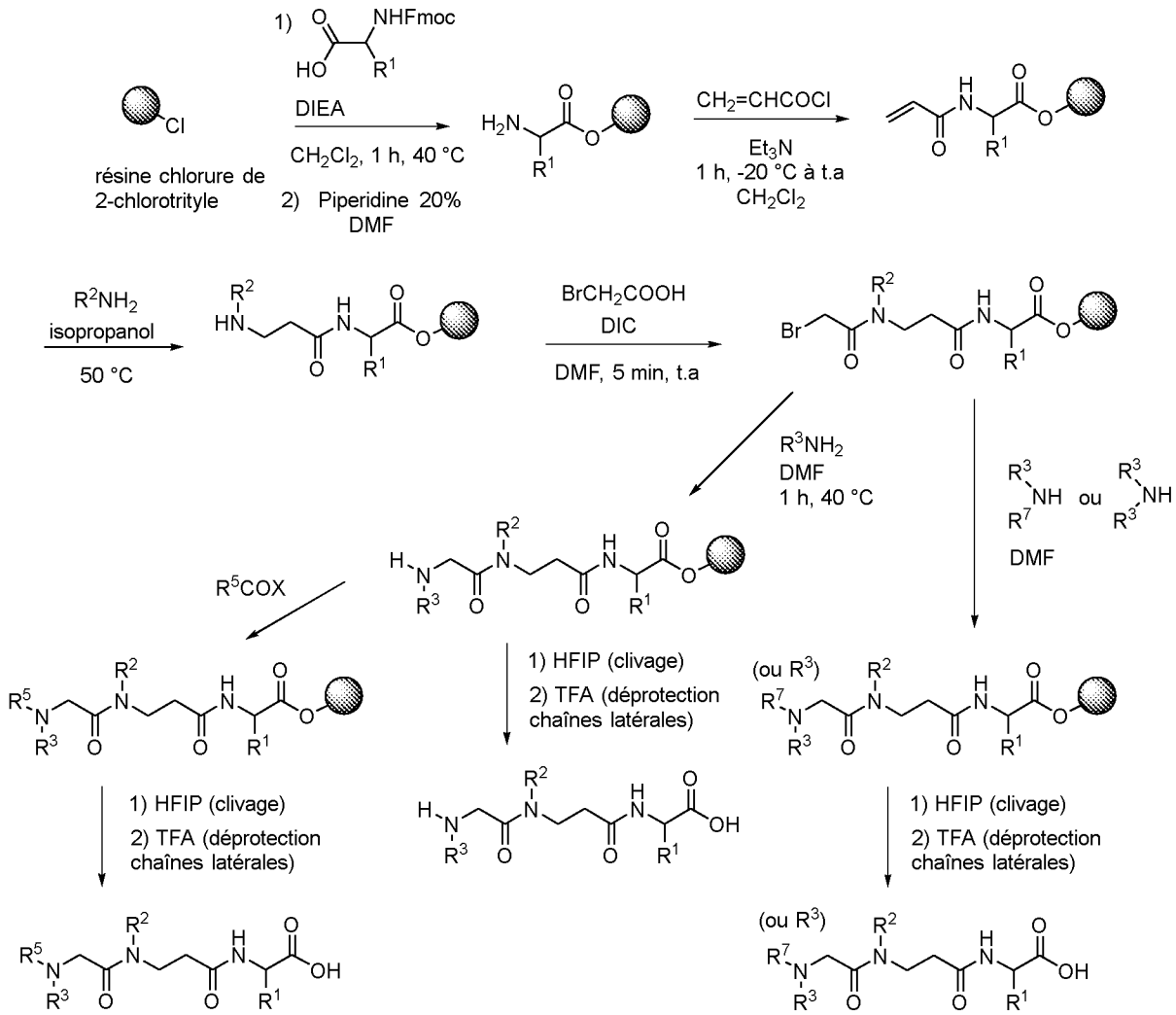
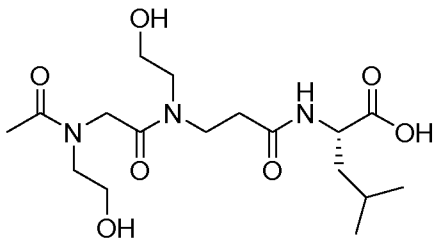


Schéma synthétique représentatif de la synthèse supportée de peptoïdes de formule générale (II), *e.g.* LF369



Molécule synthétisée



LF369

Synthèse

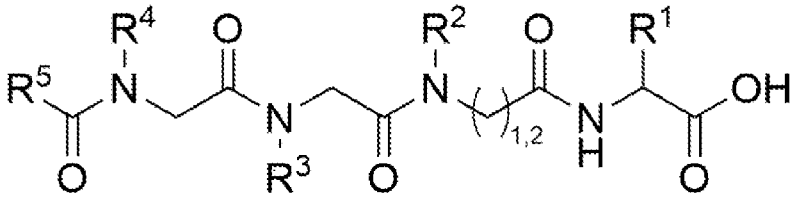
Le composé LF369 (5 µg, i.t.) a démontré un effet analgésique dans un modèle de neuropathie induite par l'oxaliplatine chez la souris (Figure 20).

Liste de Références

1. Finnerup et al., Lancet Neurol., 14(2) : 162-173, 2015
2. von Hehn et al., Neuron, 73(4) : 638-652, 2012
3. Hershman et al., J. Clin. Oncol., 32(18) : 1941-1967, 2014
4. Ludwig et al., Nature, 393(6685) : 587-591, 1998
5. Santoro et al., Cell, 93(5) : 717-729, 1998
6. Seifert et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(16) : 9391-9396, 1999
7. Dunlop et al., Curr. Pharm. Des., 15(15) : 1767-1772, 2009
8. Lewis et al., Mol. Cell Neurosci., 46(2) : 357-367, 2011
9. Descoeur et al., EMBO Mol. Med., 3(5) : 266-278, 2011
10. Young et al., Pain, 155(9) : 1708-1719, 2014
11. Lewis et al., J. Neurosci., 29(19) : 6250-6265, 2009
12. Bankston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109 : 7899, 2012
13. Han et al., J. Biomol. Screen, 20(9) : 1-8, 2015
14. Janssen et al., Arzneimittelforschung, 13 : 502-507, 1963
15. Randall et Selitto, Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 111(4) : 409-419, 1957
16. Kim et Chung, Pain, 50(3) : 355-363, 1992
17. Ostergaard et al., Molecular Diversity, 3 : 17-27, 1997(
18. Simon et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89 : 9367-9371, 1992
19. Hamper et al., J. Org. Chem., 63 : 708-718, 1998
20. Zuckermann et al., J. Am. Chem. Soc., 114 : 10646-10647, 1992
21. Culf et al., Molecules, 15 : 5282-5335, 2010
22. Miller et al., Drug Dev. Res., 35 : 20-32, 1995
23. Kwon et al., J. Am. Chem. Soc., 129 : 1508-1509, 2007
24. Vollrath et al., Organic & Biomolecular Chemistry, 11 : 8497-8201, 2013
25. Li et al., Cellular & Molecular Immunol., 7 : 133-142, 2010
26. Chongsiriwatana et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA, 105 : 2794-2799, 2008
27. Mesirca et al., Nat. Commun., 5 : 4664.doi :10.1038/ncomms5664, 2014
28. Marger et al., Channels (Austin), 5(3) : 241-250, 2011

REVENDICATIONS

1) Peptoïde de formule générale (I) suivante :



I

où

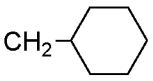
R^1 est de manière indépendante CH_3 (L-Ala), $CH(CH_3)_2$ (L-Val), $CH(CH_3)CH_2CH_3$ (L-Ile), $CH_2CH(CH_3)_2$ (L-Leu and D-Leu), $CH_2C(CH_3)_3$, $C(CH_3)_3$, CH_2(cyclobutyl) ;

R^2 et **R^3** sont choisis de manière indépendante parmi: $CH_2CH(CH_3)_2$, $CH_2CH_2NH_2$, CH_2CH_2OH, $CH_2CH_2CH_2OH$, $CH_2CH(OH)CH_3$, CH_2CONH_2, $CH_2CH_2CONH_2$;

R^4 est un groupe aliphatique ou aromatique choisi parmi :

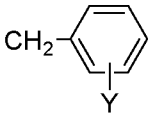
$CH_2CH(CH_3)_2$ (isobutyle)

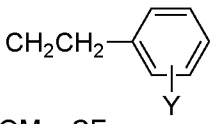
$CH_2C(CH_3)_3$ (neopentyle)

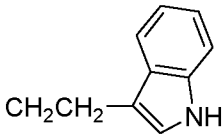

(cyclohexylmethyle)


(isopropyle)

$CH_2CH_2CH_2CH_3$ (*n*-butyle)


Y = H, OMe, CF_3



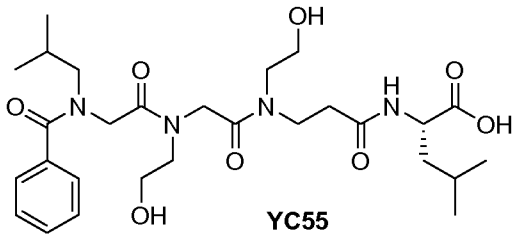


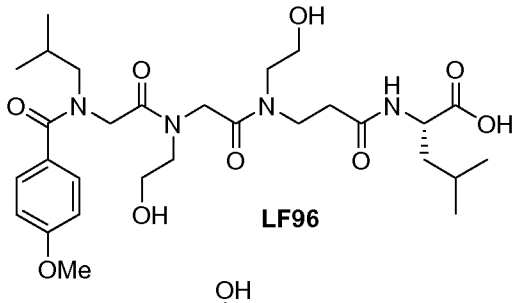

n = 2 à 8
Z = OH, NH_2, COOH, SH, N_3, C≡CH

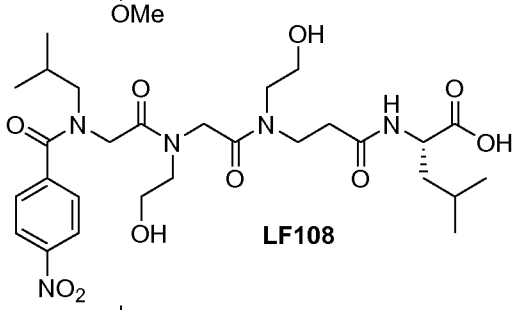
;

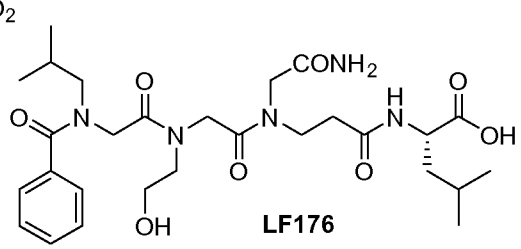
R^5 est de manière indépendante CH_3, $CH(CH_3)_2$, $CH_2C_6H_5$, C_6H_4X (où X en position ortho, méta ou para est de manière indépendante H, OMe, CF_3, CH_3, CH_2CH_3, F, Br, Cl, NO_2), 3-indolyl, 3-quinolinyl.

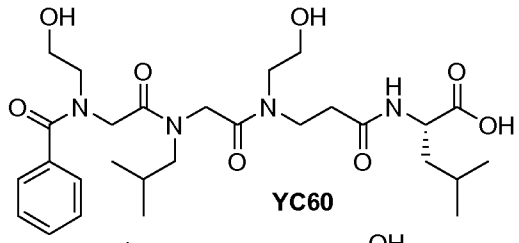
2. Peptoïde selon la revendication 1 de formules suivantes :

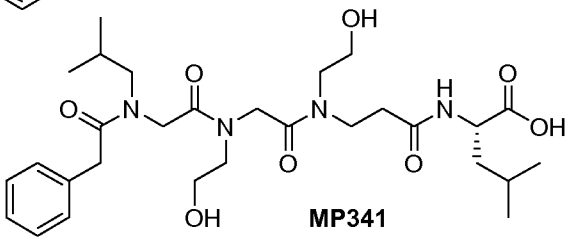

YC55

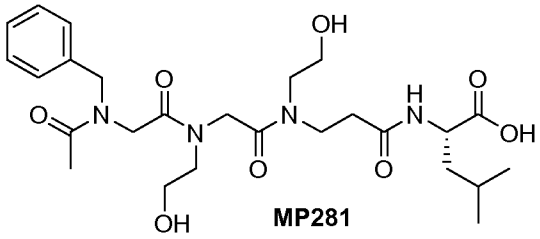

LF96

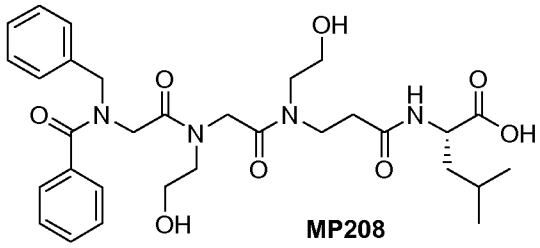

LF108

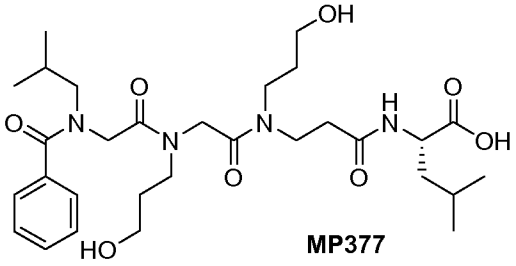

LF176

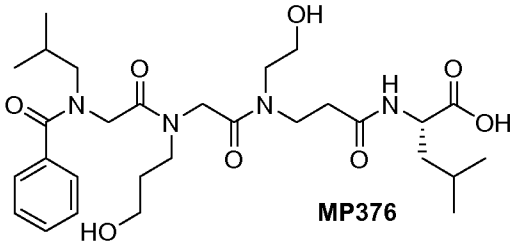

YC60

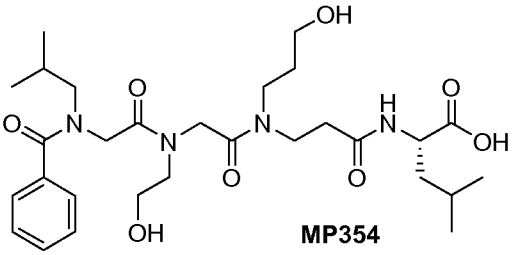

MP341

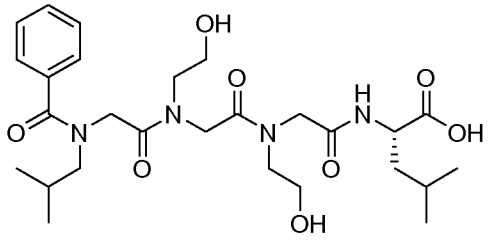

MP281

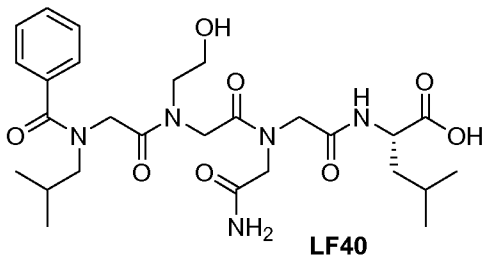

MP208

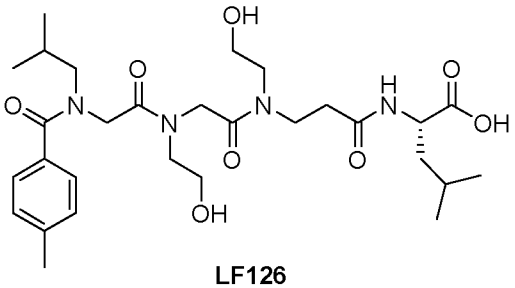

MP377


MP376

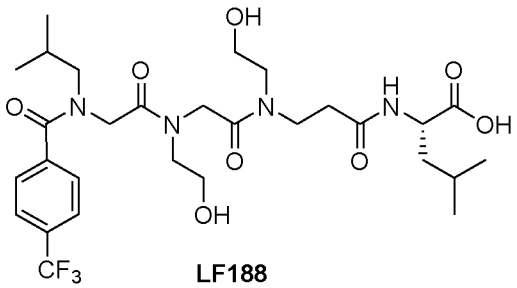

MP354


MP405

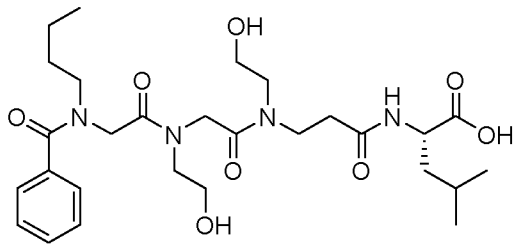

LF40



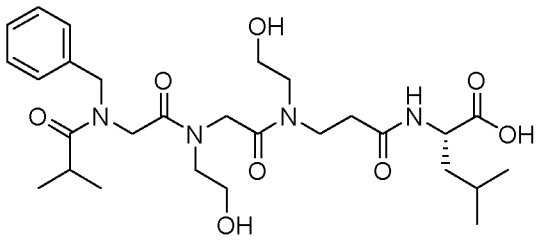
LF126



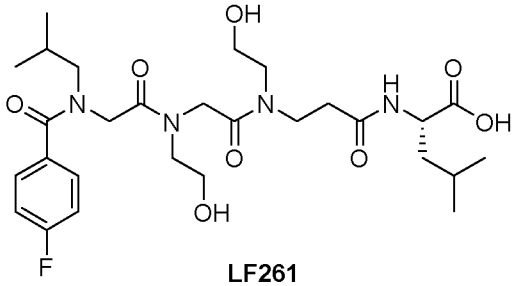
LF188



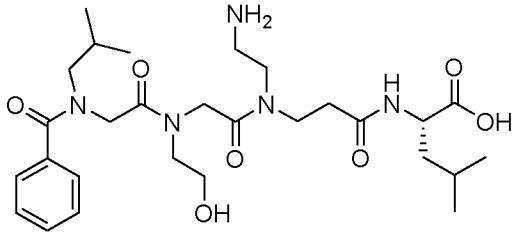
LF222



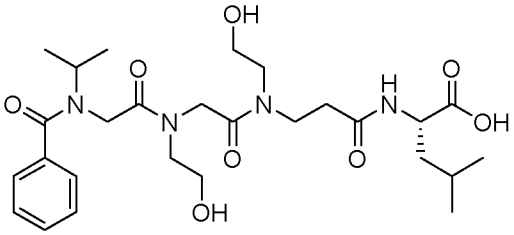
LF239



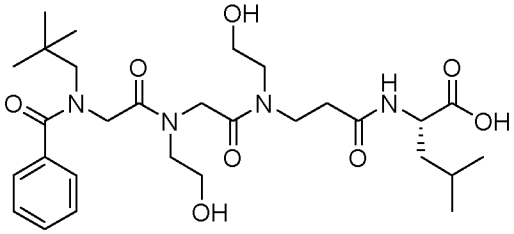
LF261



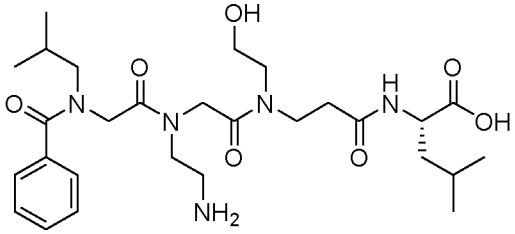
LF275



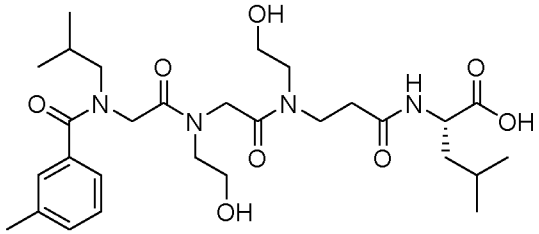
LF295



LF306

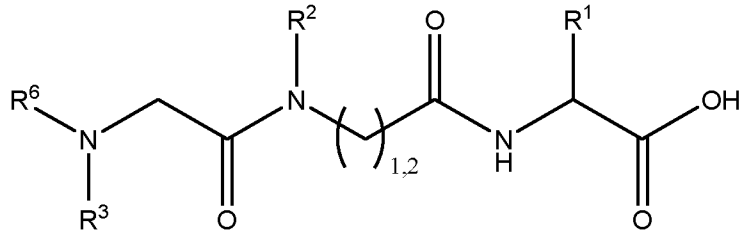


LF329



LF400

3. Peptoïde de formule générale (II) suivante :



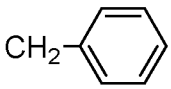
II

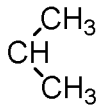
où

R^{1}, **R**^{2} et **R**^{3} sont tels que définis dans la revendication 1 ;

R^{6} est **R**^{3}, H, CO**R**^{5} (où **R**^{5} est tel que défini ci-dessus) ou **R**^{7} ;

R^{7} est de manière indépendante un groupe parmi :

$(CH_2)_wCH_3$ alkyle (w = 1-4)  (phénylméthyle)

 (isopropyle)  (phényle)  (cyclohexyle).

4. Composition pharmaceutique comprenant un peptoïde selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

5. Peptoïde selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou composition pharmaceutique selon la revendication 4, pour une utilisation comme médicament.

6. Peptoïde selon l'une quelconque des revendications1 à 3 ou composition pharmaceutique selon la revendication 4, pour une utilisation dans la prévention ou le traitement de la douleur chronique.

7. Peptoïde pour une utilisation selon la revendication 6, où la douleur chronique est d'origine neuropathique.

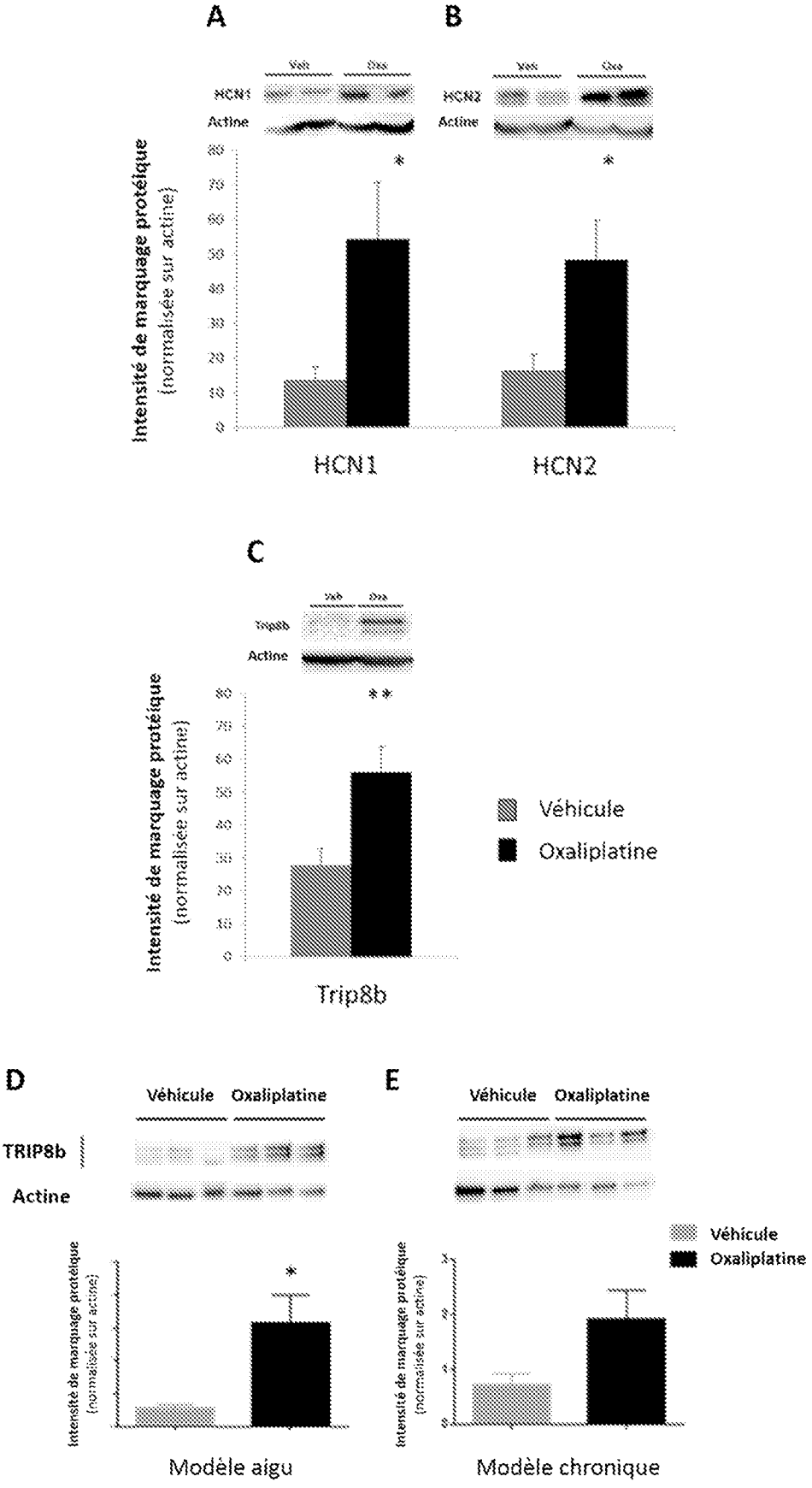
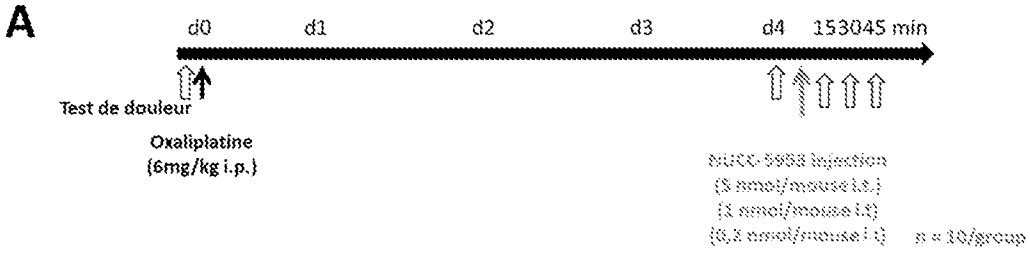
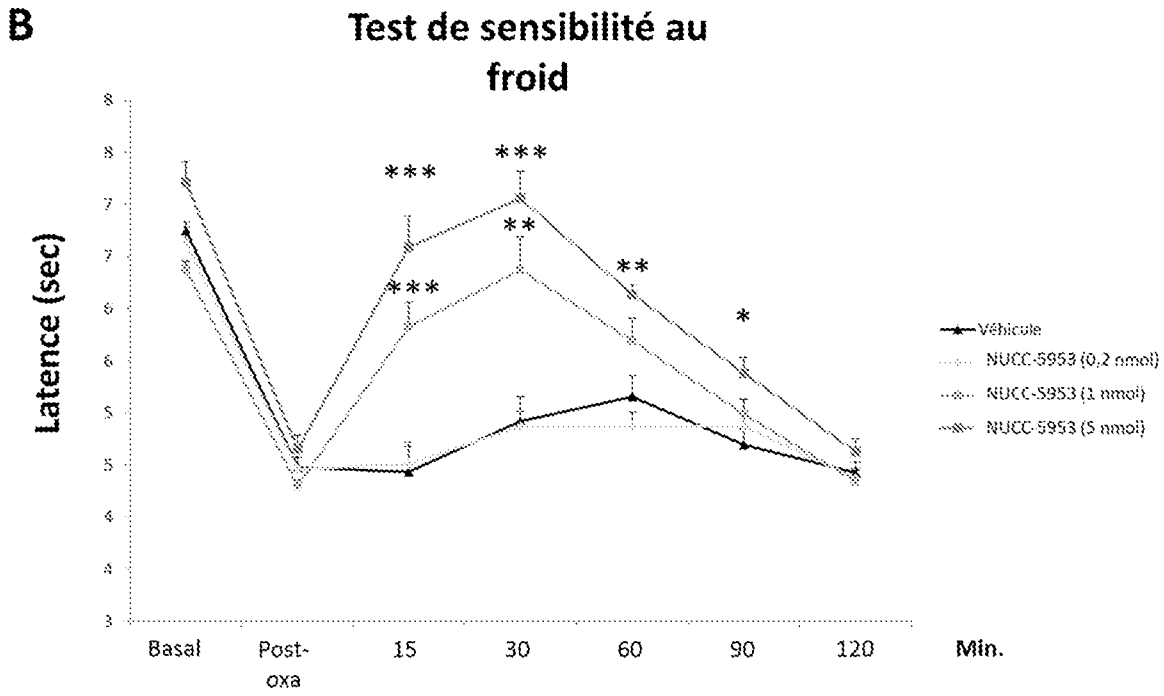

A
B
HCN1
HCN2
Actine
Véh
Oxa
Intensité de marquage protéique
(normalisée sur actine)
HCN1
HCN2
C
Trip8b
Actine
Trip8b
Véhicule
Oxaliplatine
D
E
Véhicule
Oxaliplatine
TRIP8b
Actine
Modèle aigu
Modèle chronique

FIGURE 1


A
d0
d1
d2
d3
d4
153045 min
Test de douleur
Oxaliplatine
(6mg/kg i.p.)
NUCC-5953 injection
(5 nmol/mouse i.t.)
(1 nmol/mouse i.t.)
(0,2 nmol/mouse i.t.)
n = 10/group


B
Test de sensibilité au froid
Latence (sec)
Basal
Post-oxa
15
30
60
90
120
Min.
Véhicule
NUCC-5953 (0,2 nmol)
NUCC-5953 (1 nmol)
NUCC-5953 (5 nmol)

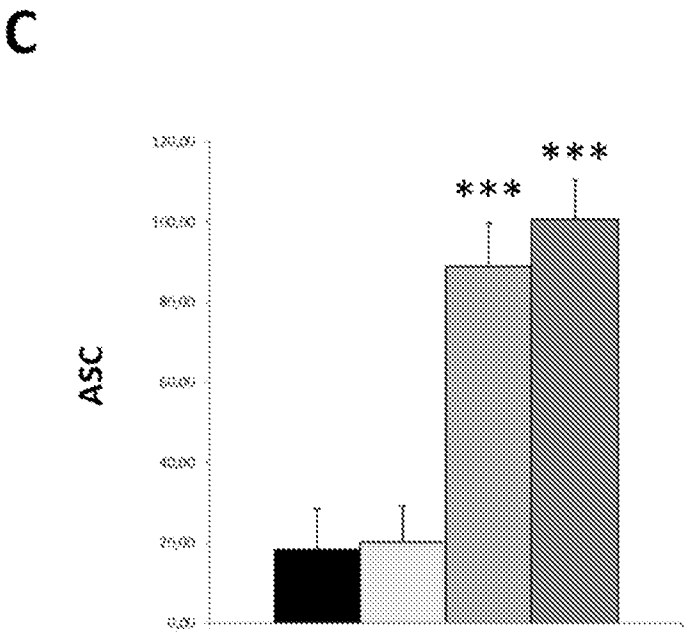
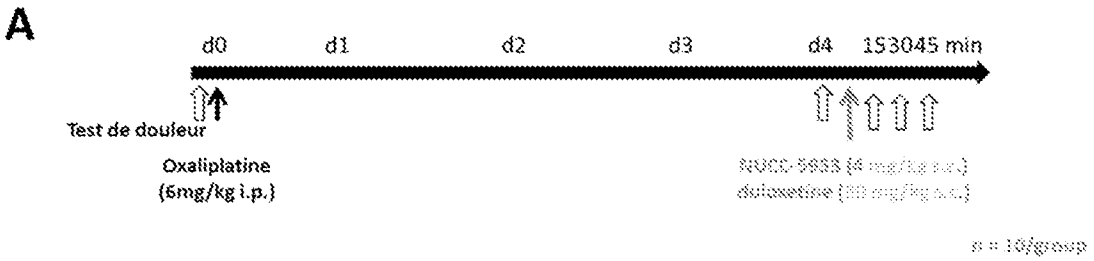
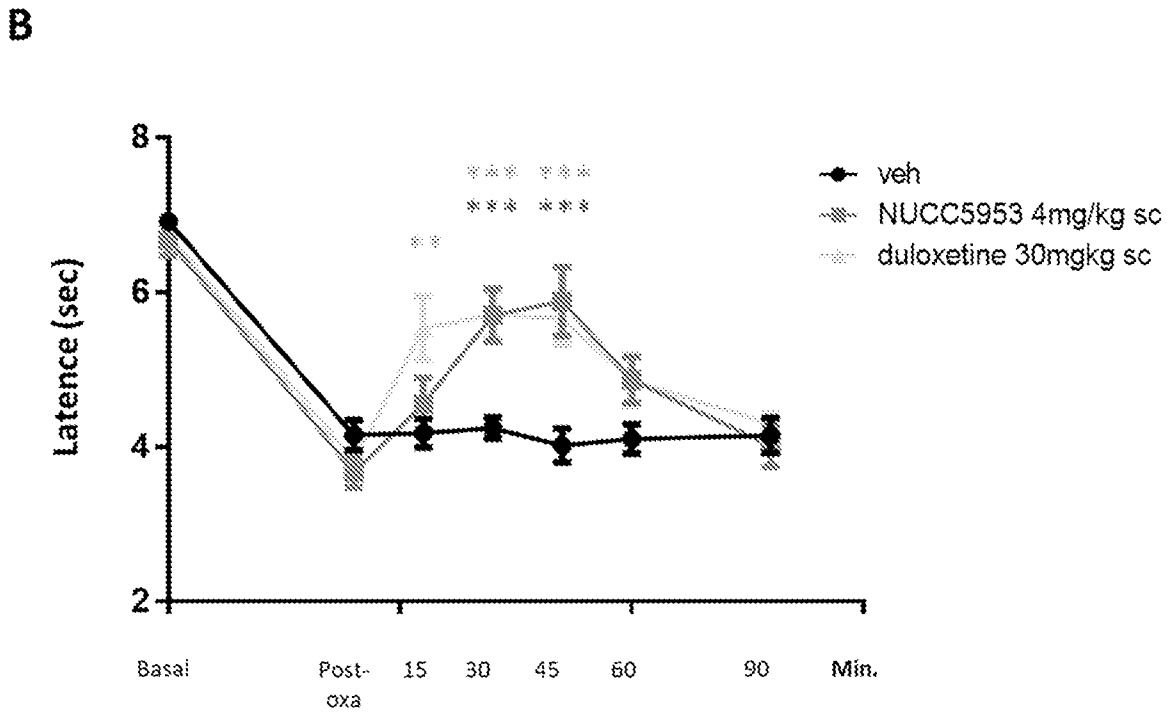

C
ASC

FIGURE 2


A
d0
d1
d2
d3
d4
153045 min
Test de douleur
Oxaliplatine
(6mg/kg i.p.)
n = 10/group


B
Latence (sec)
8
6
4
2
veh
NUCC5953 4mg/kg sc
duloxetine 30mgkg sc
Basal
Post-oxa
15
30
45
60
90
Min.

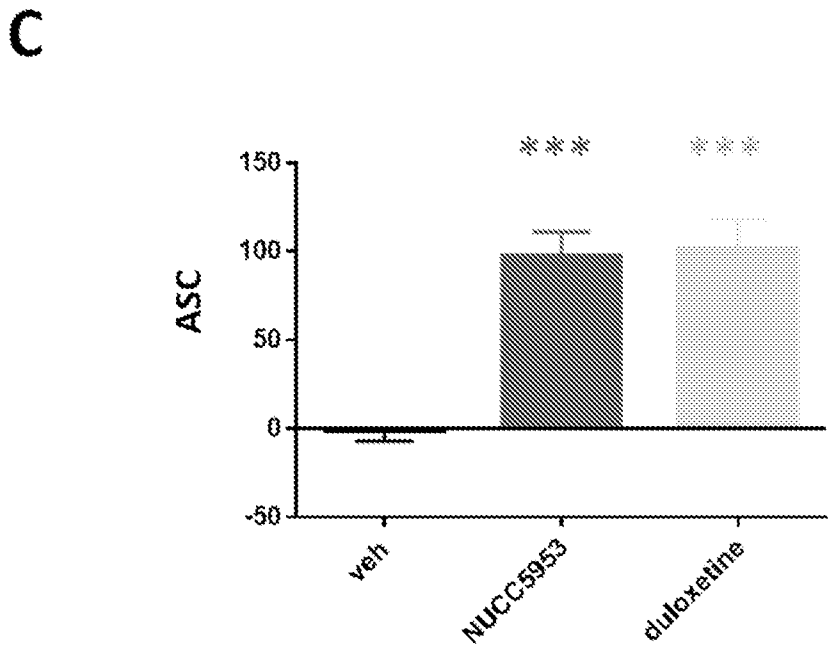

C
ASC
150
100
50
0
-50
veh
NUCC5953
duloxetine

FIGURE 3

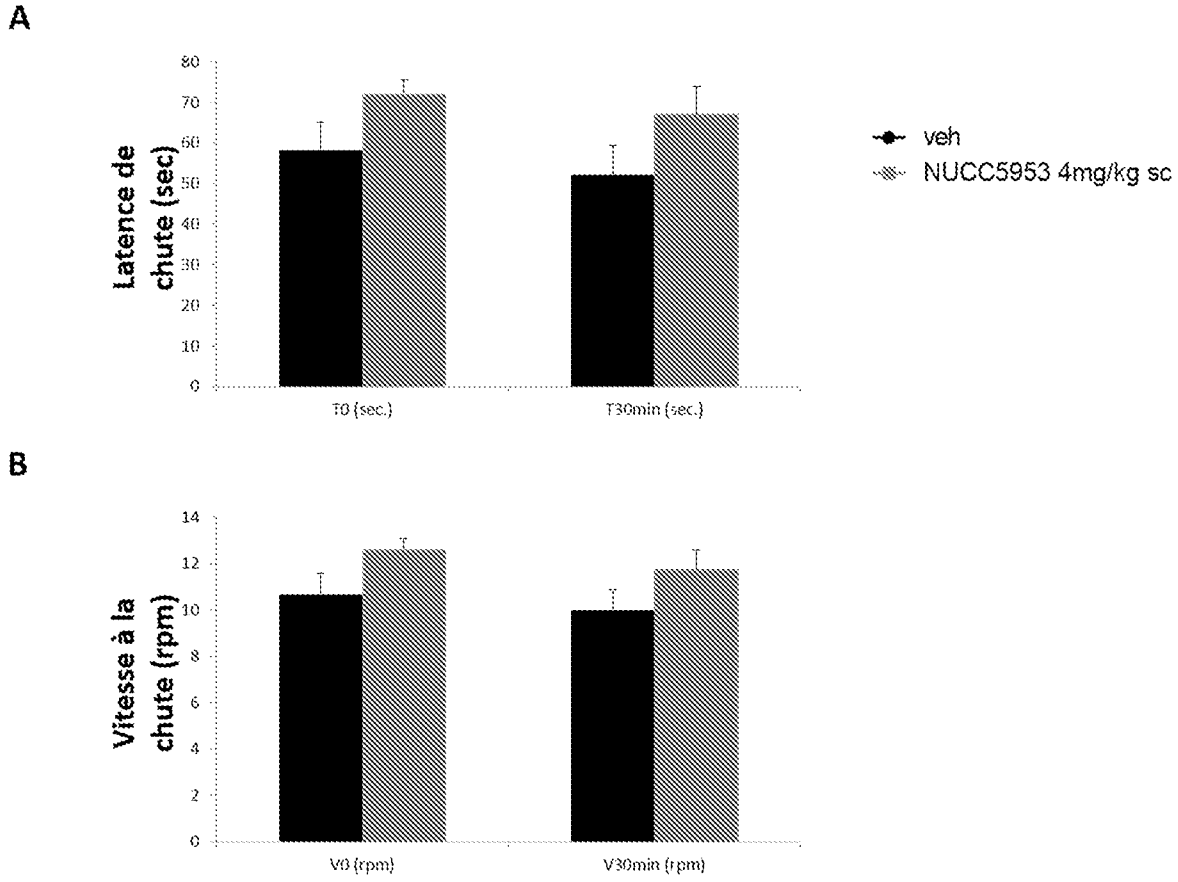


FIGURE 4

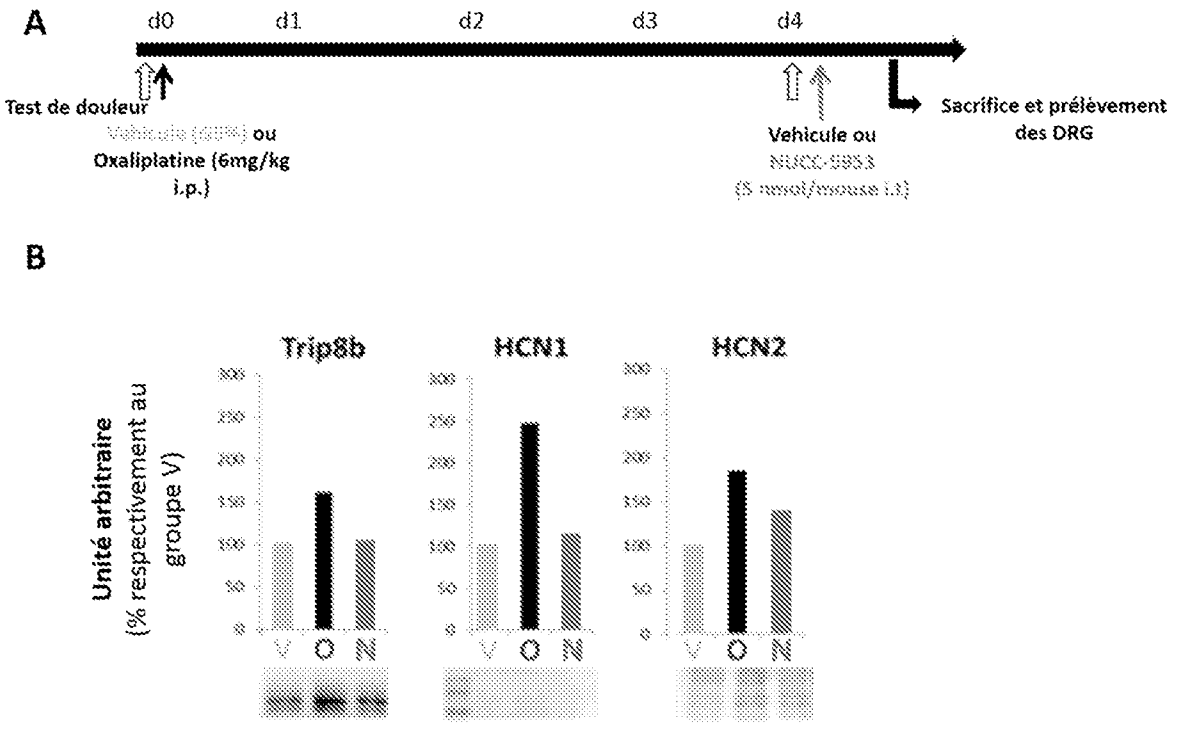


FIGURE 5

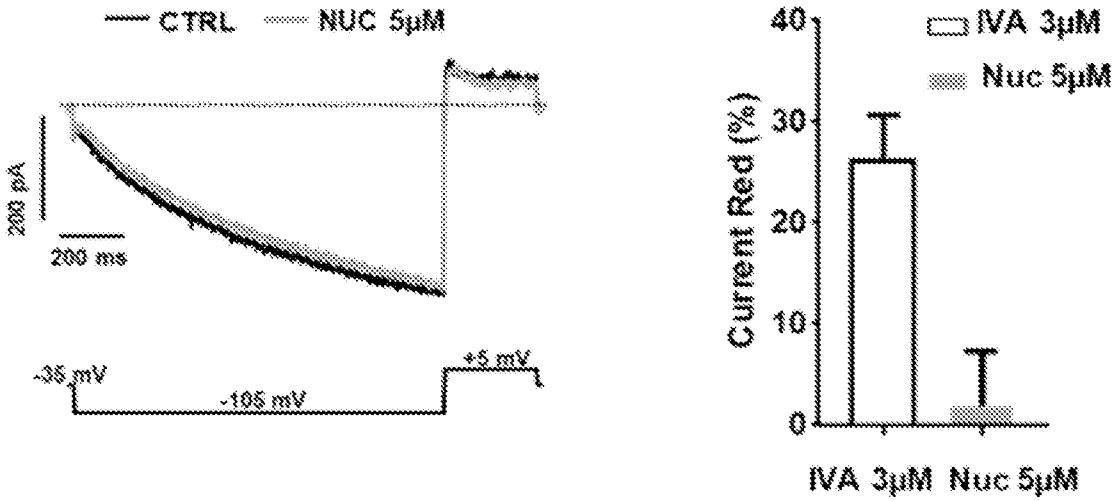


FIGURE 6

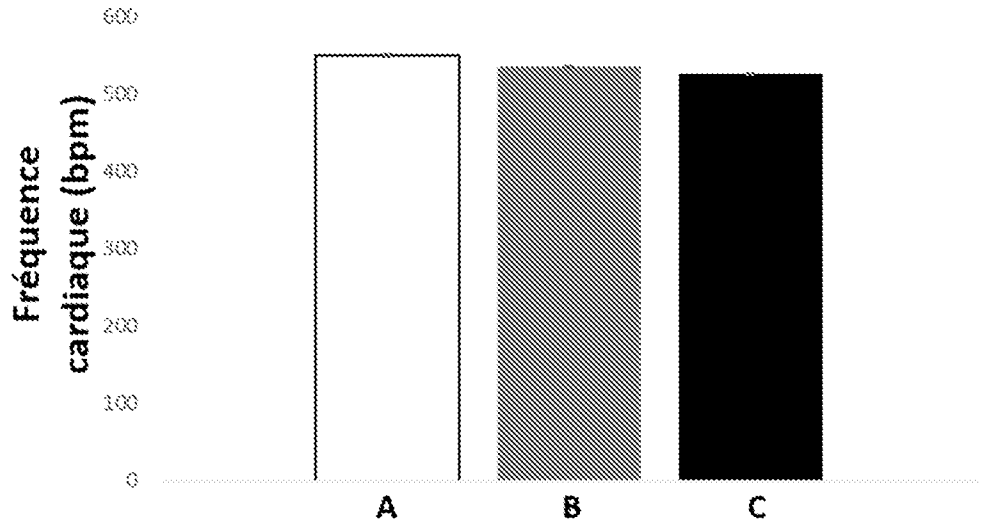


FIGURE 7

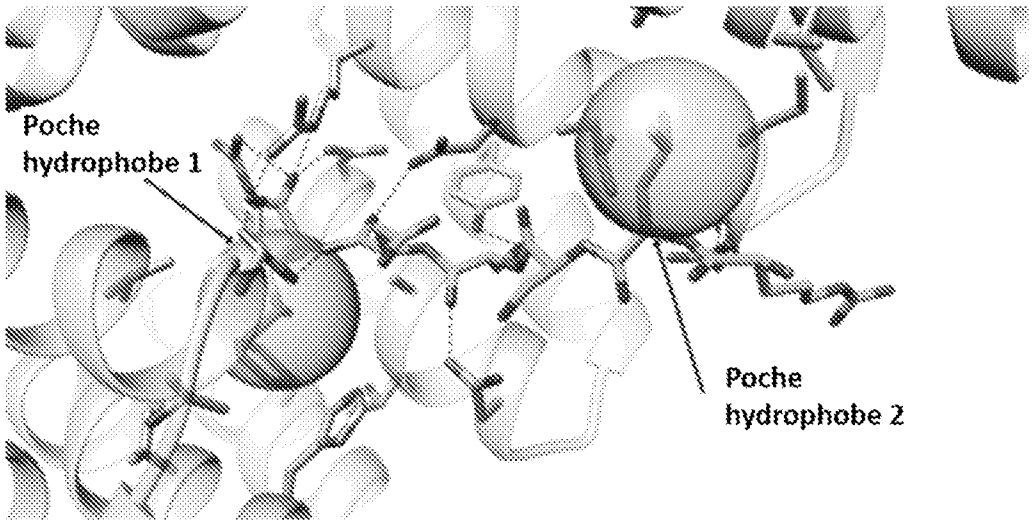


FIGURE 8

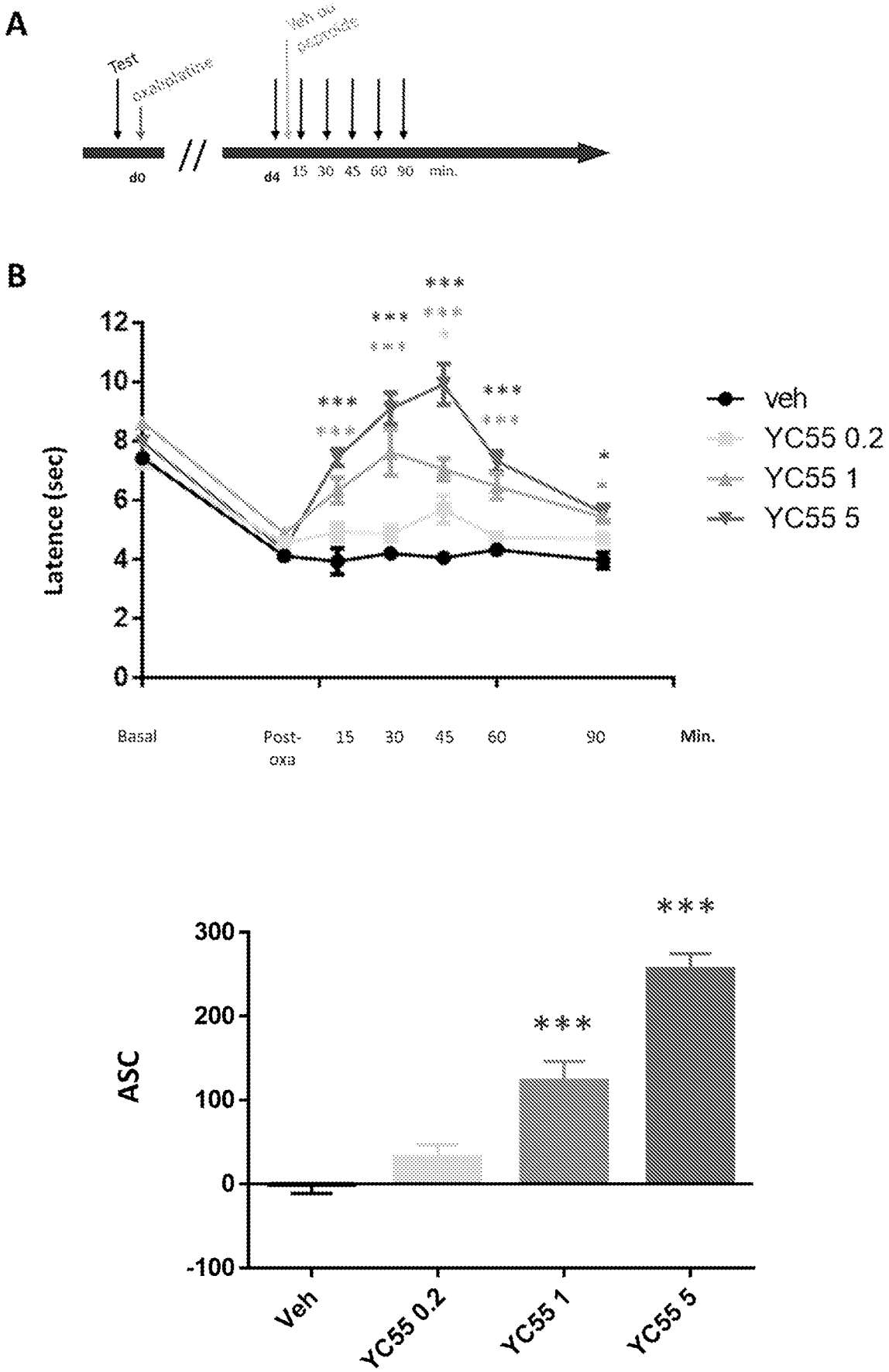

A
Test
oxaliplatine
Veh ou
escitalopram
d0
d4
15
30
45
60
90
min.
B
Latence (sec)
0
2
4
6
8
10
12
***
Basal
Post-
oxa
15
30
45
60
90
Min.
veh
YC55 0.2
YC55 1
YC55 5
ASC
300
200
100
0
-100
***
Veh
YC55 0.2
YC55 1
YC55 5

FIGURE 9

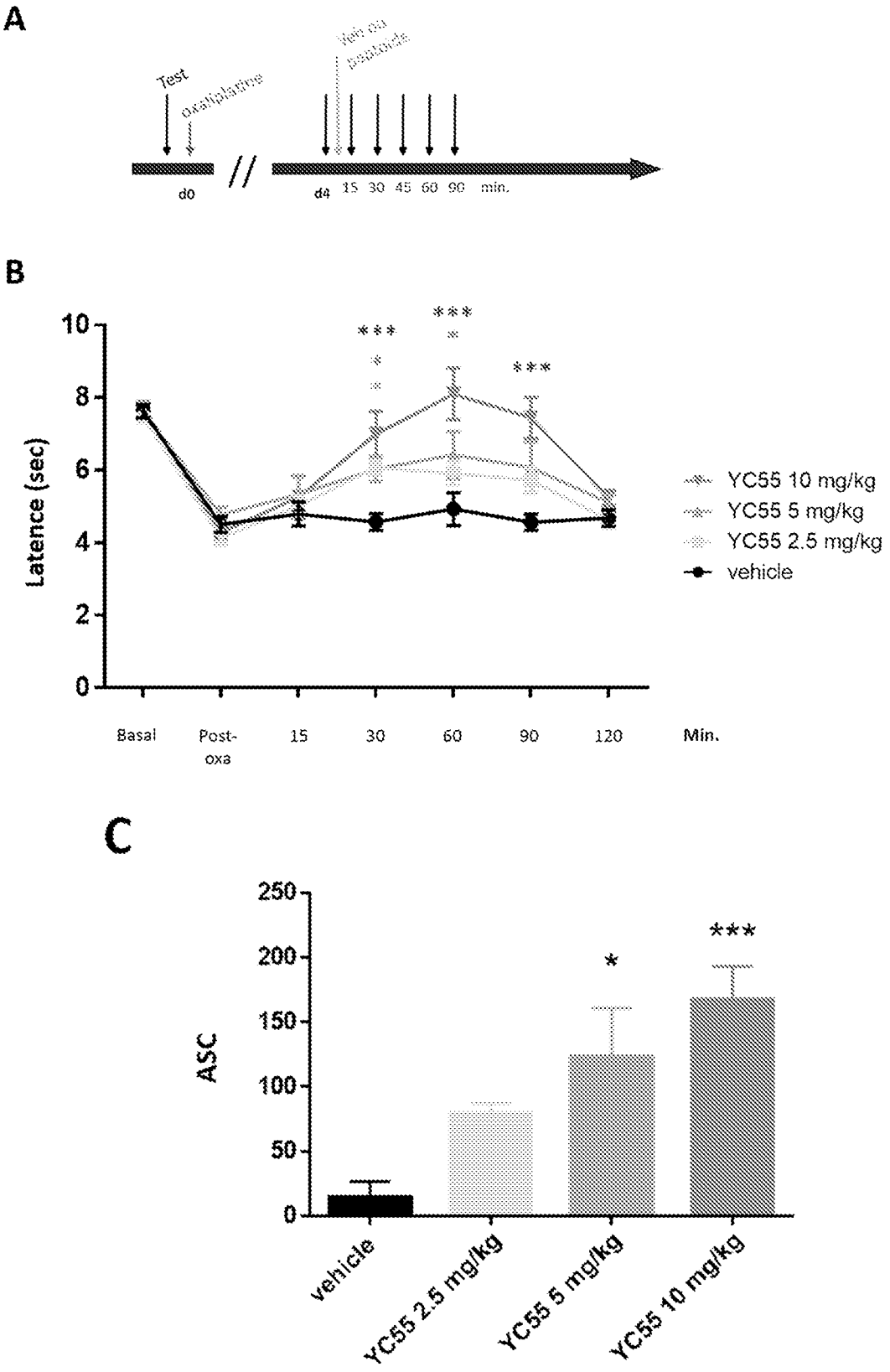

A
Test
oxaliplative
Veh ou YC55
d0
d4 15 30 45 60 90 min.
B
Latence (sec)
10
8
6
4
2
0
***
***
***
YC55 10 mg/kg
YC55 5 mg/kg
YC55 2.5 mg/kg
vehicle
Basal
Post-oxa
15
30
60
90
120
Min.
C
ASC
250
200
150
100
50
0
*
***
vehicle
YC55 2.5 mg/kg
YC55 5 mg/kg
YC55 10 mg/kg

FIGURE 10

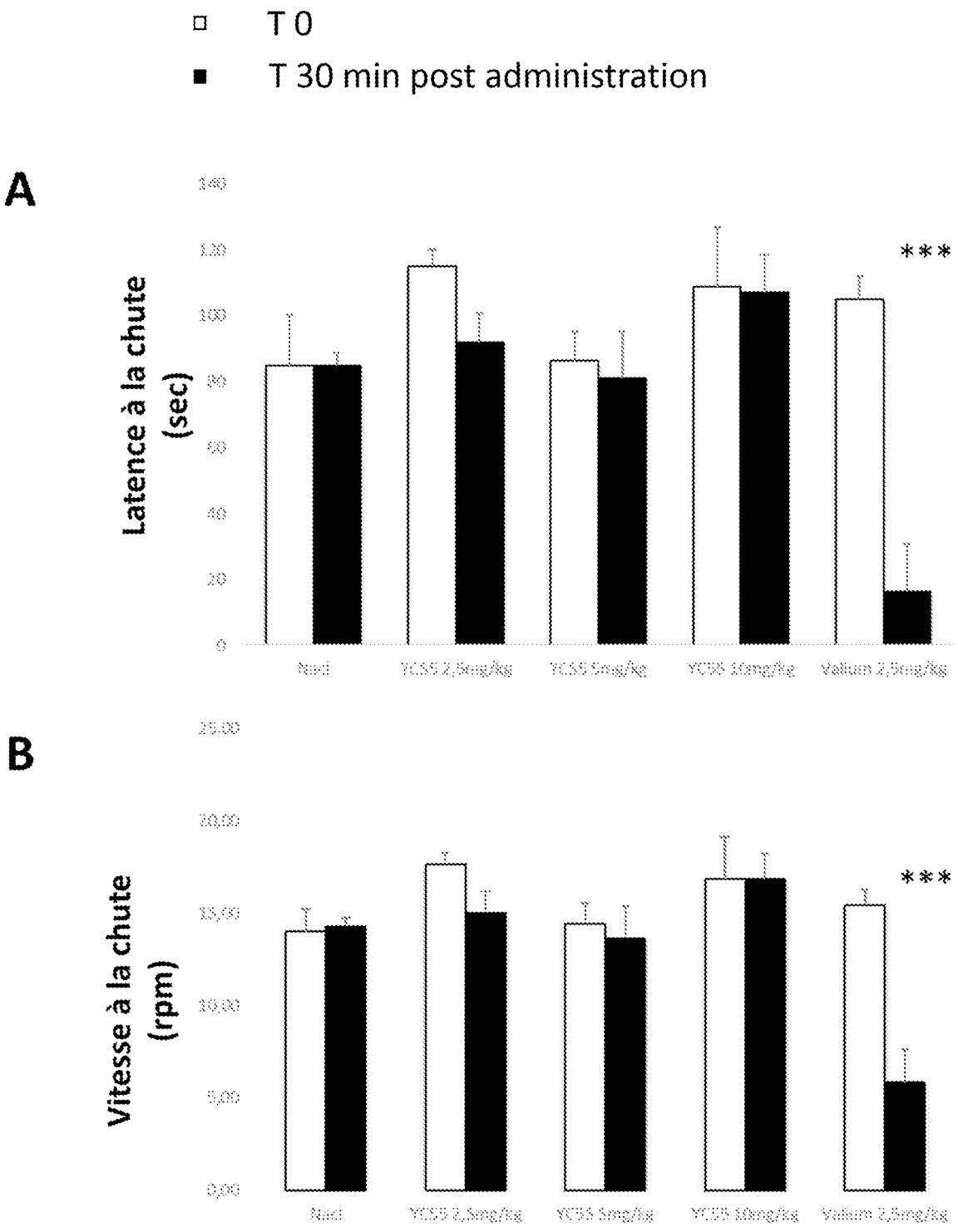

T 0
T 30 min post administration
A
Latence à la chute (sec)
***
B
Vitesse à la chute (rpm)
***

FIGURE 11

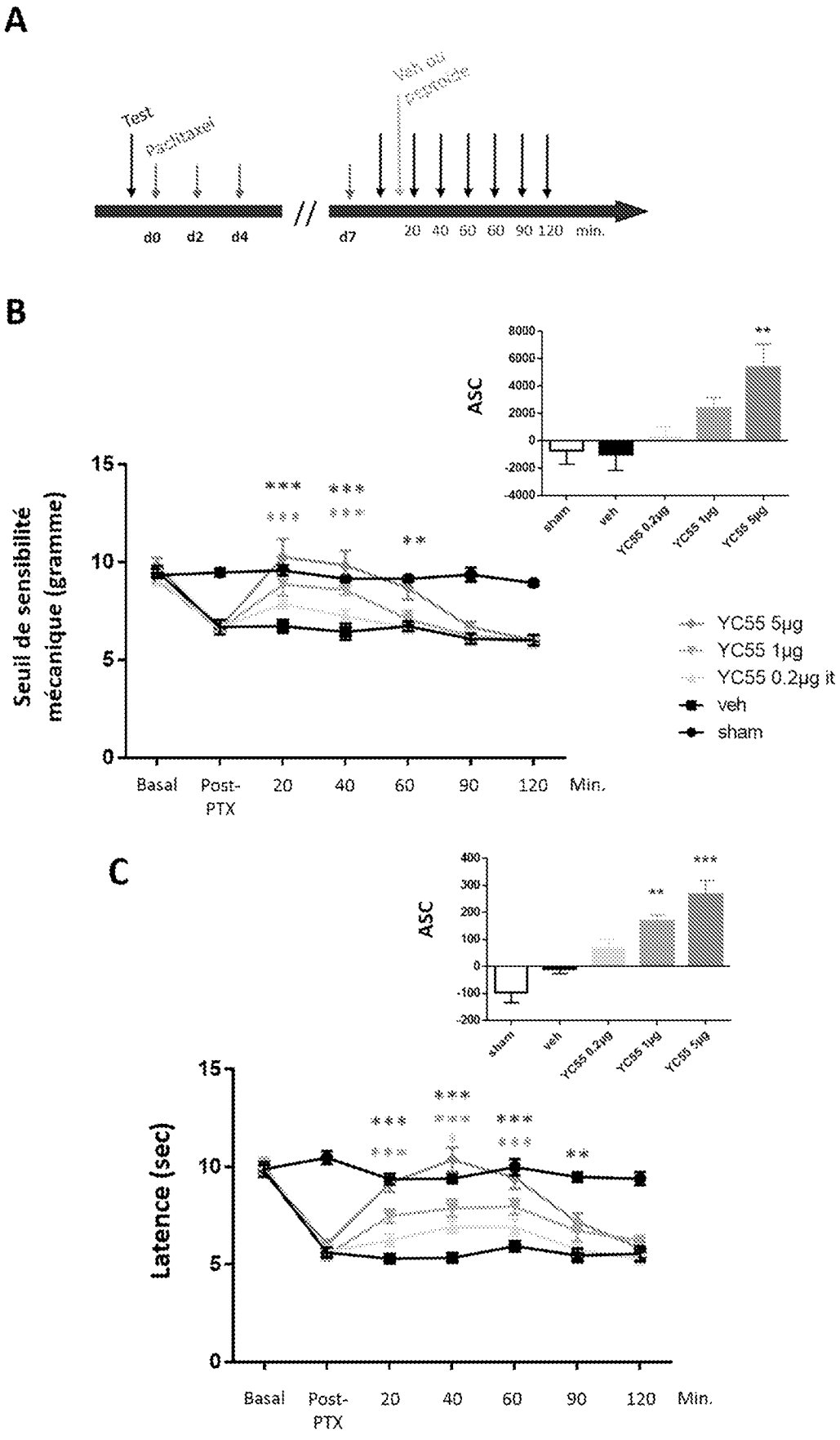
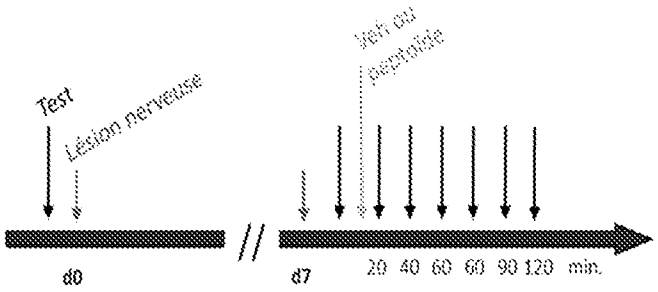

A
Test
Paclitaxel
Veh ou peptide
d0
d2
d4
d7
20 40 60 60 90 120 min.
B
Seuil de sensibilité mécanique (gramme)
ASC
sham
veh
YC55 0.2µg
YC55 1µg
YC55 5µg
YC55 5µg
YC55 1µg
YC55 0.2µg it
veh
sham
Basal
Post-PTX
20
40
60
90
120
Min.
C
ASC
Latence (sec)

FIGURE 12

A


Test
Lésion nerveuse
Veh ou peptoïde
d0
d7
20 40 60 60 90 120 min.

B

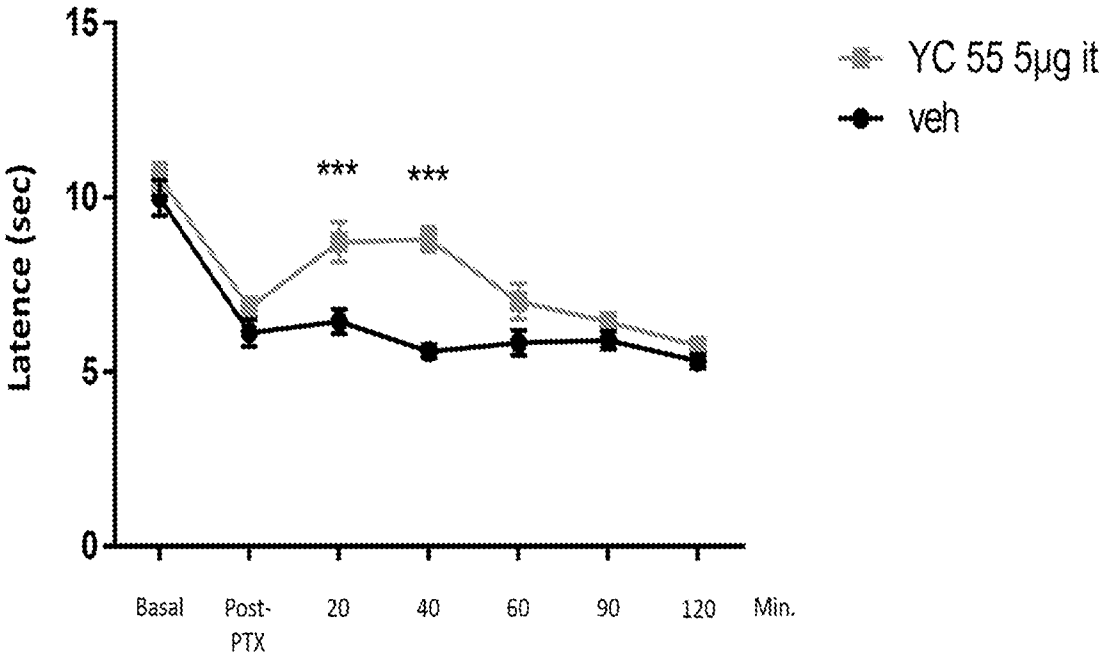

15
10
5
0
Latence (sec)
***
***
YC 55 5µg it
veh
Basal
Post-PTX
20
40
60
90
120
Min.

FIGURE 13

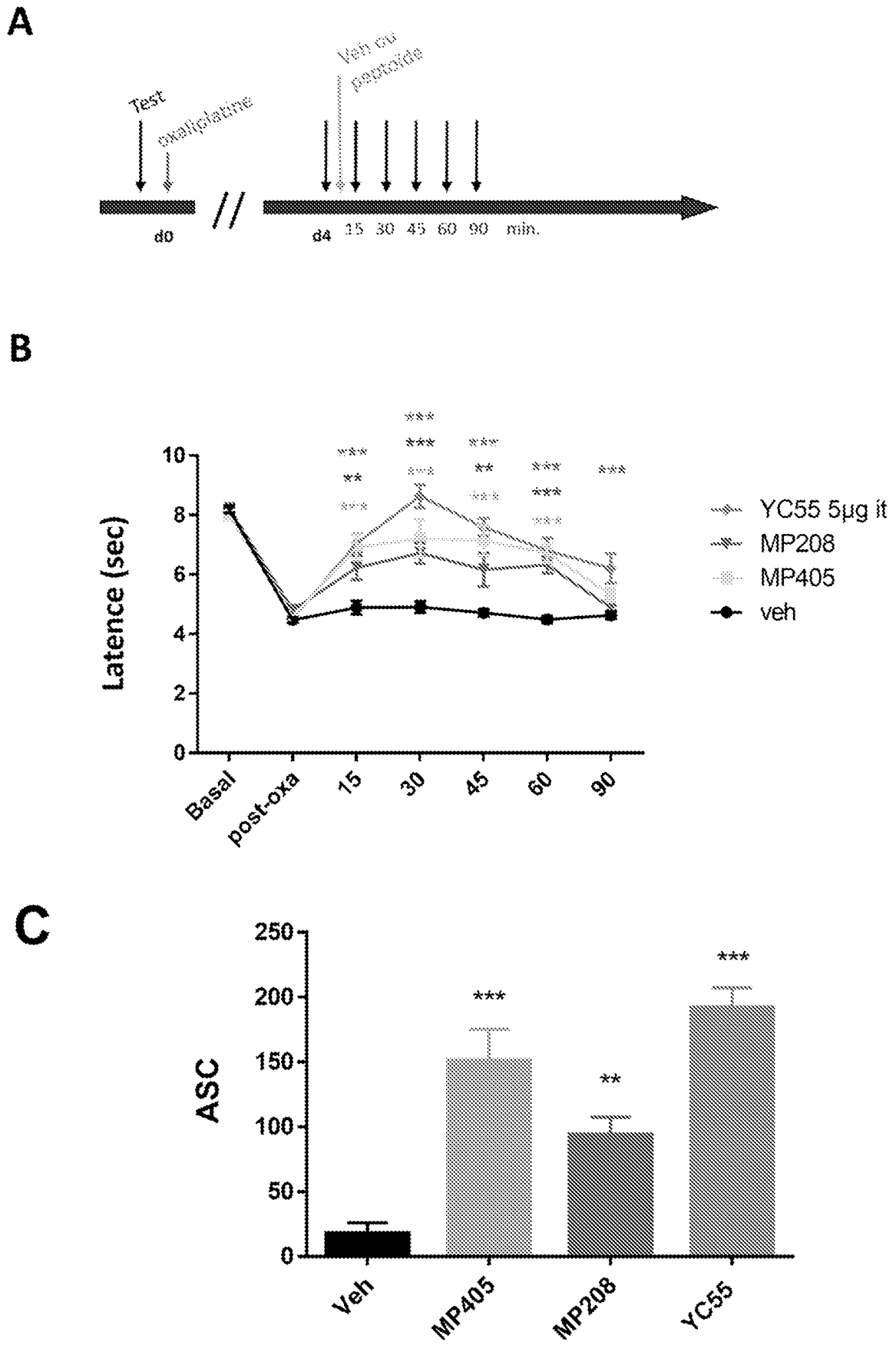
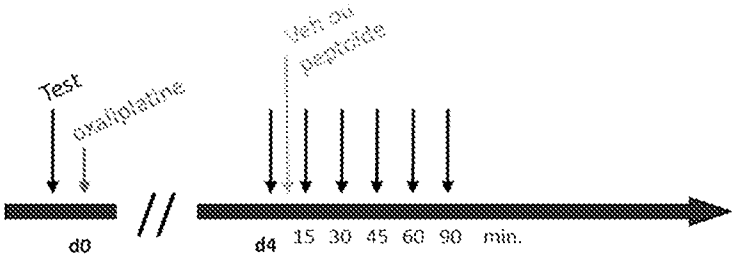
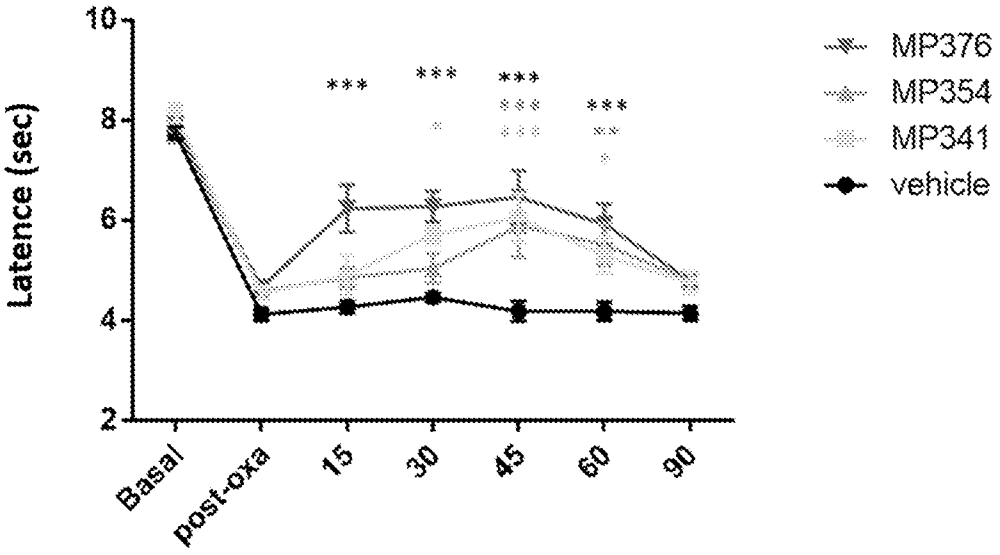

A
Test
oxaliplatine
Veh ou peptide
d0
d4 15 30 45 60 90 min.
B
Latence (sec)
Basal
post-oxa
15
30
45
60
90
YC55 5µg it
MP208
MP405
veh
C
ASC
Veh
MP405
MP208
YC55

FIGURE 14

A



B



C

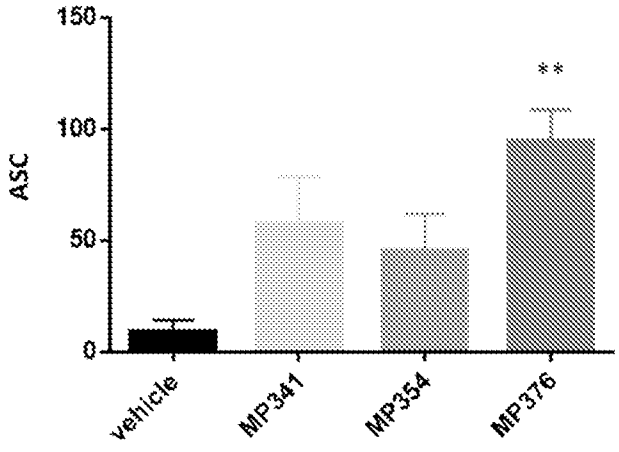
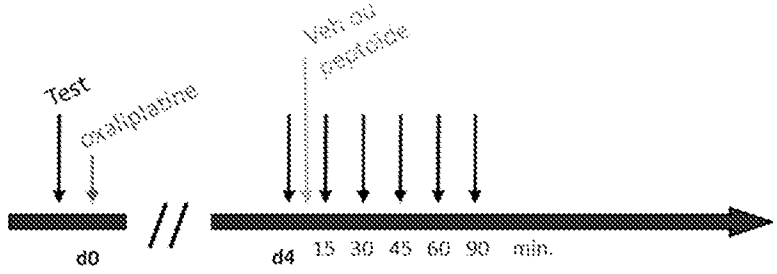
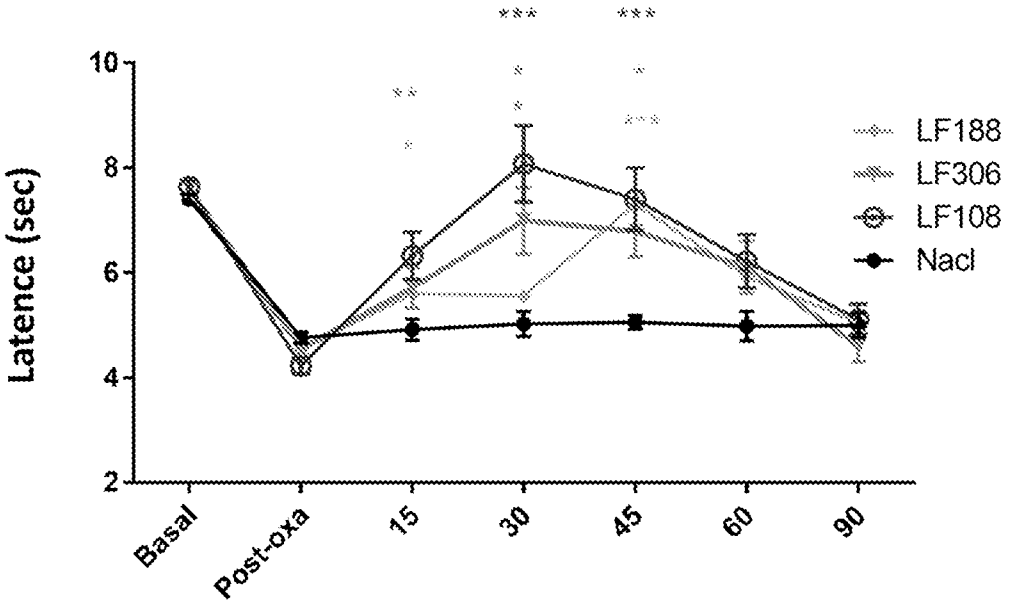


FIGURE 15

A



B



C

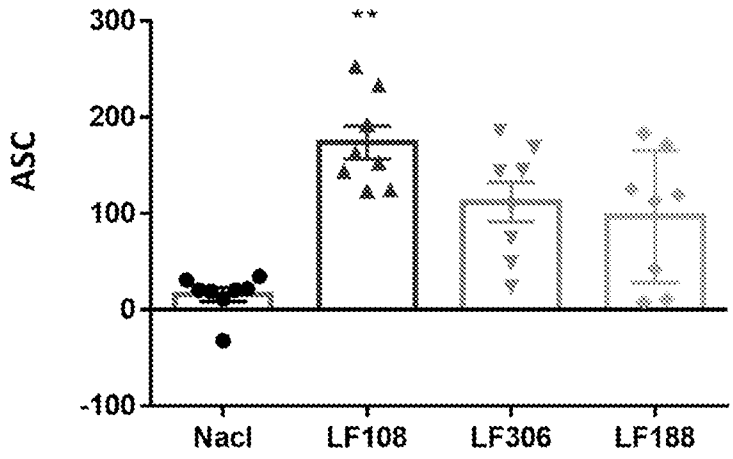
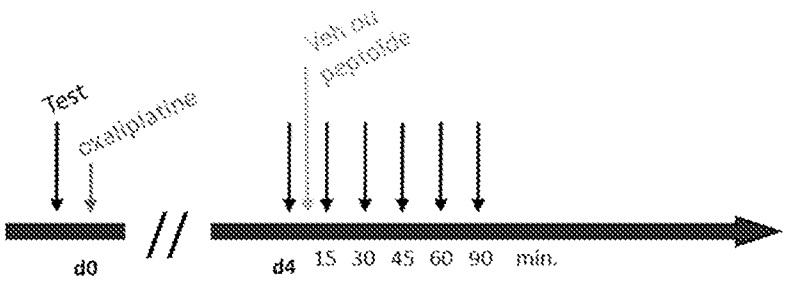
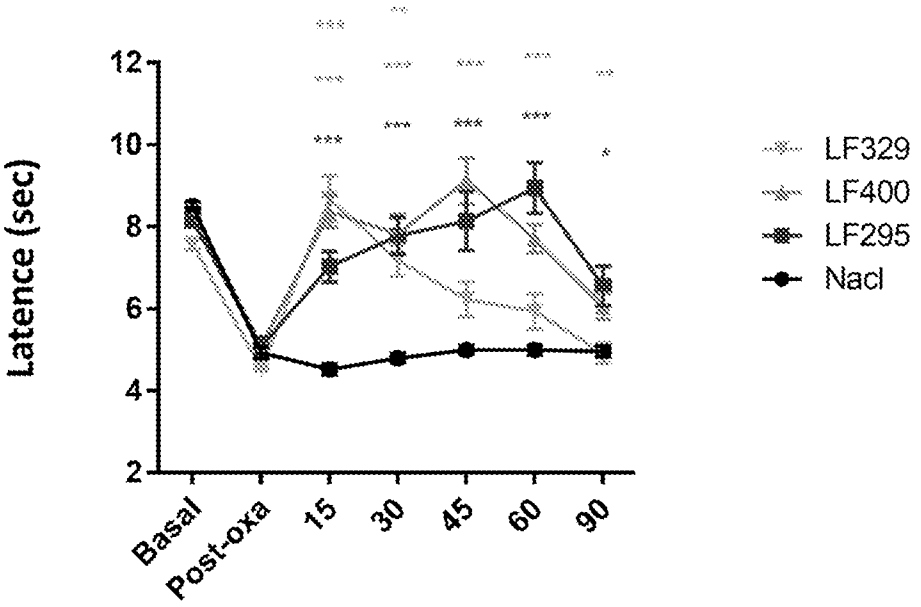


FIGURE 16

A



B



C

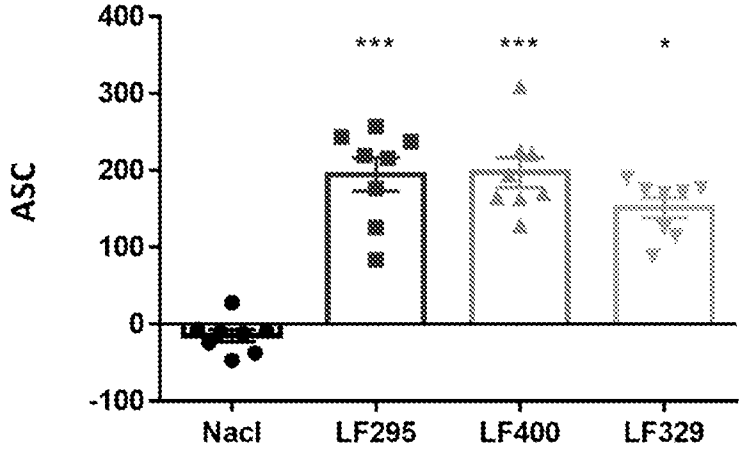
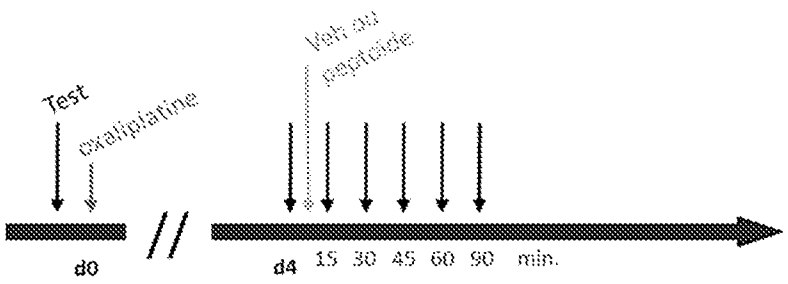
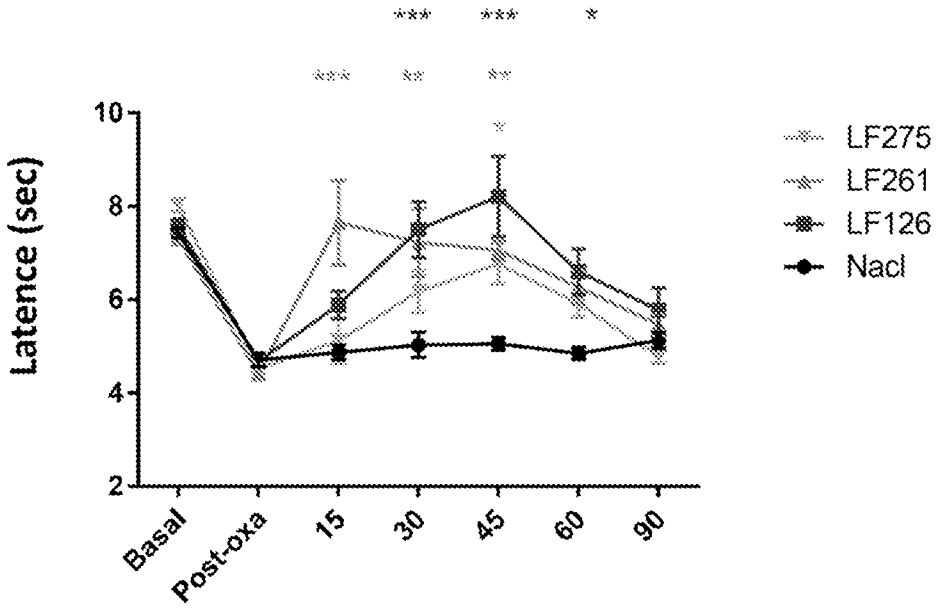


FIGURE 17

A



B



C

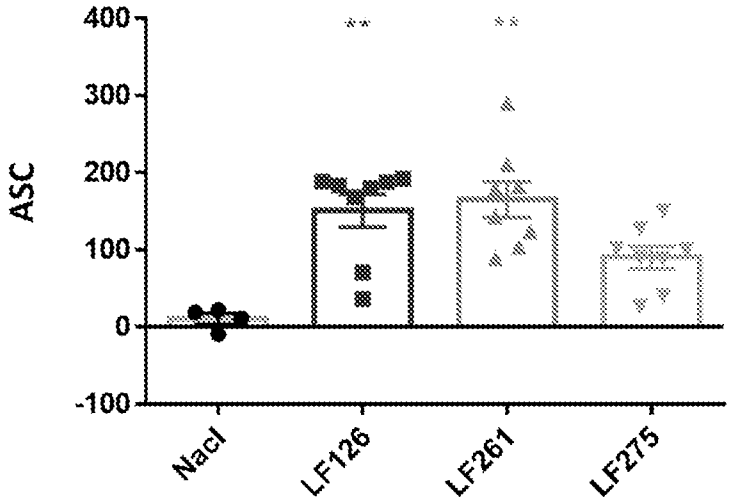
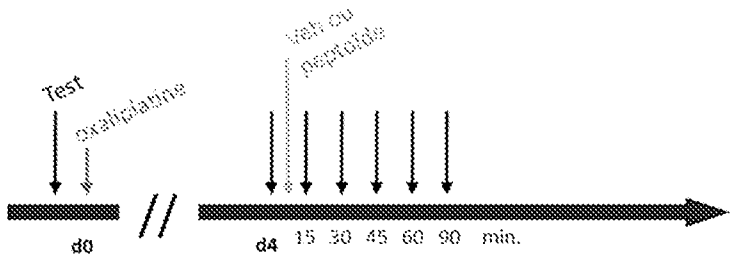
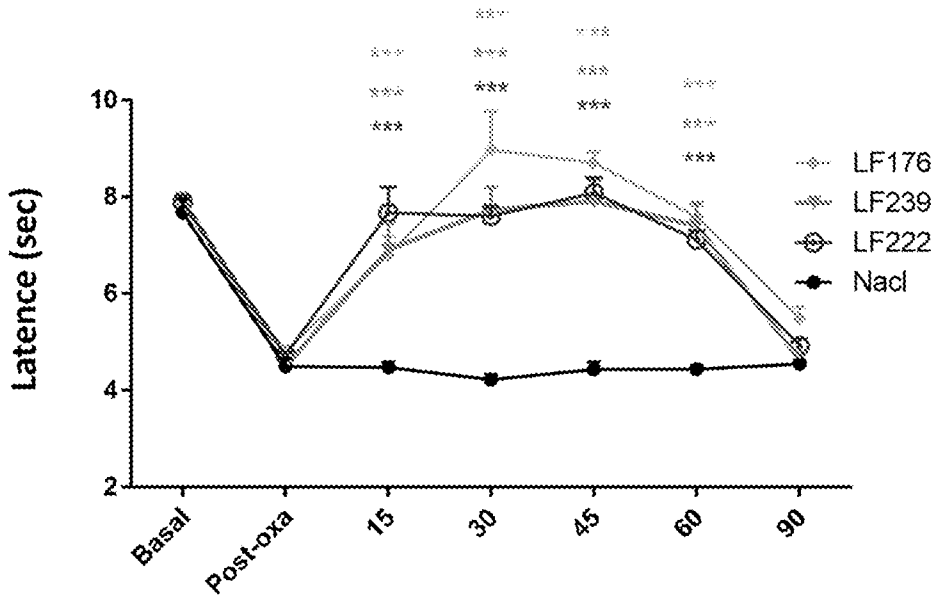


FIGURE 18

A



B



C

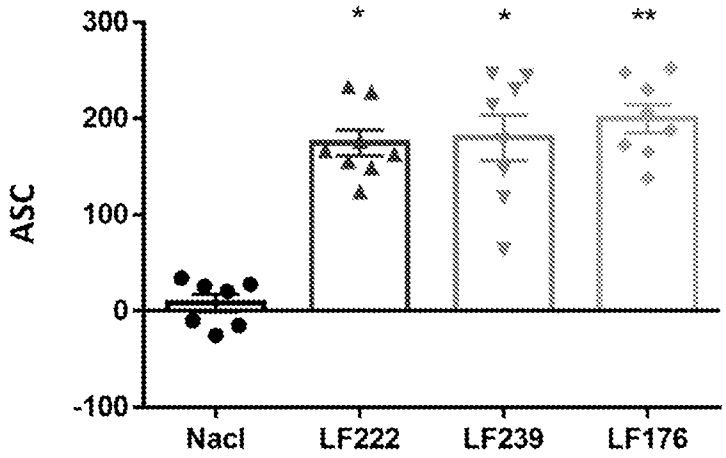
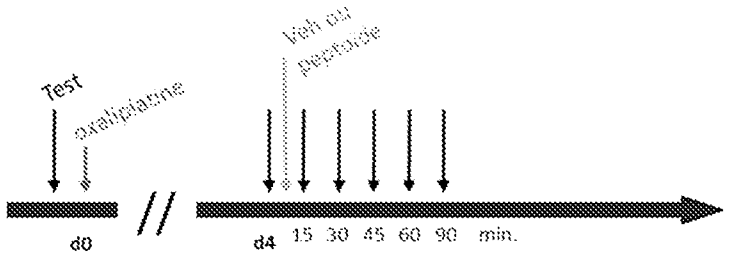
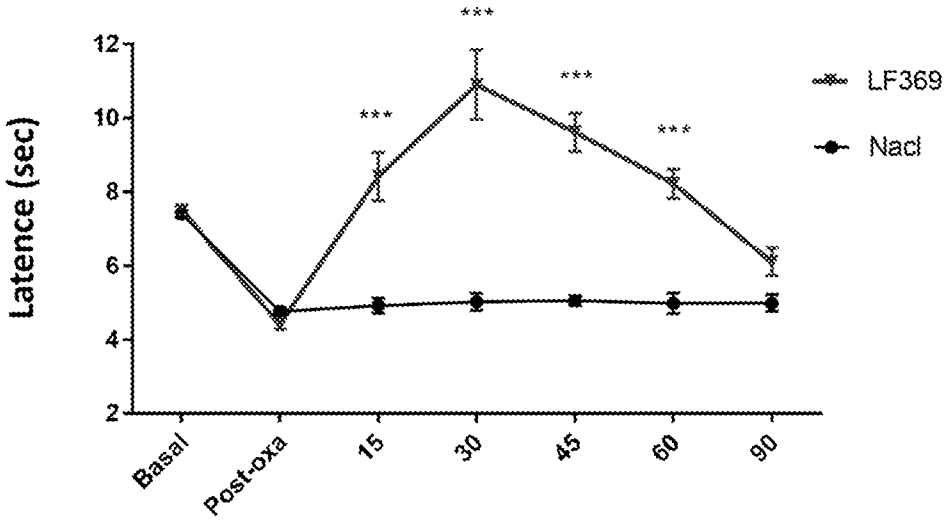


FIGURE 19

A



B



C

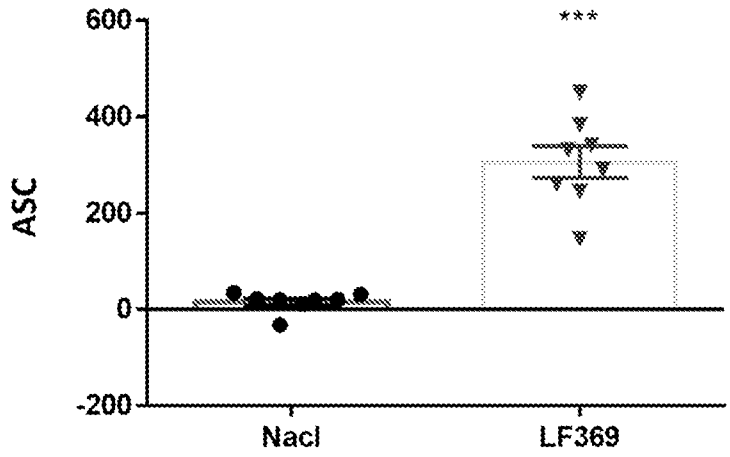


FIGURE 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR2021/051694

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/198(2006.01)i; ***A61K 38/02***(2006.01)i; ***A61P 29/02***(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HRUBY VICTOR J ED - MERCER JULIAN. "Multivalent peptide and peptidomimetic ligands for the treatment of pain without toxicities and addiction" *PEPTIDES*, Vol. 116, 2019, pages 63-67 DOI: 10.1016/J.PEPTIDES.2019.02.004 ISSN: 0196-9781, XP085693658 page 64; figure 1	1-7
A	EP 2289886 A1 (INST INVESTIGACIONS BIOMEDIQUES AUGUST PI I SUNYER [ES] ET AL.) 02 March 2011 (2011-03-02) claims 1,9	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 January 2022	**31 January 2022**

Name and mailing address of the ISA/EP	Authorized officer
European Patent Office **p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk** **Netherlands** Telephone No. **(+31-70)340-2040** Facsimile No. **(+31-70)340-3016**	**Trifilieff, Sylvie** Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/FR2021/051694

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
EP 2289886 A1	02 March 2011	EP 2289886 A1	02 March 2011
		US 2012237552 A1	20 September 2012
		WO 2011024079 A2	03 March 2011

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2021/051694

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. A61K31/198 A61K38/02 A61P29/02
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 cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HRUBY VICTOR J ED - MERCER JULIAN: "Multivalent peptide and peptidomimetic ligands for the treatment of pain without toxicities and addiction", PEPTIDES, vol. 116, 2019, pages 63-67, XP085693658, ISSN: 0196-9781, DOI: 10.1016/J.PEPTIDES.2019.02.004 page 64; figure 1	1-7

A	EP 2 289 886 A1 (INST INVESTIGACIONS BIOMEDIQUES AUGUST PI I SUNYER [ES] ET AL.) 2 mars 2011 (2011-03-02) revendications 1,9	1-7

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ 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 international 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 international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée
"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international 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 internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
19 janvier 2022	31/01/2022

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Trifilieff, Sylvie

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2021/051694

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 2289886 A1	02-03-2011	EP 2289886 A1	02-03-2011
		US 2012237552 A1	20-09-2012
		WO 2011024079 A2	03-03-2011