

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 12213

(54)

Peptides à activité biologique.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.³). A 61 K 37/02.

(22)

Date de dépôt..... 22 juin 1981.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée : *Allemagne, 25 juin 1980, n° 3 023 813.*

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 53 du 31-12-1981.

(71)

Déposant : Société dite : AKZO N. V., résidant aux Pays-Bas.

(72)

Invention de : David De Wied et Hendrik Marie Greven.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Robert Bloch, conseil en brevets d'invention,
39, av. de Friedland, 75008 Paris.

La présente invention concerne des peptides à activité biologique.

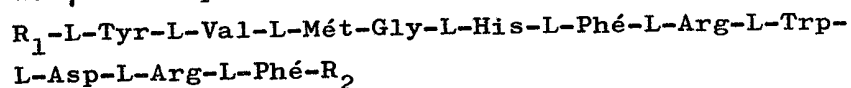
On a découvert depuis un certain temps que les hormones hypophysaires que sont la corticotrophine (ACTH) et la β -lipotropine (β -LPH), dérivent d'un précurseur commun qui est une grosse protéine. La structure primaire proposée de cette molécule comporte plusieurs paires de restes d'acides aminés basiques qui peuvent être attaqués par les enzymes protéolytiques pour produire divers peptides plus petits. On peut ainsi former l'ACTH et la β -LPH puis, entre autres, l' α -MSH, la γ -LPH, la β -MSH et la β -endorphine. A l'extérieur de la séquence de l'ACTH et de la β -LPH, dans cette molécule de précurseur, il se trouve un fragment ayant une séquence d'acides aminés qui est remarquablement semblable à celle de l' α -MSH et de la β -MSH. Par suite de cette relation structurale, cette portion de la molécule de précurseur a été appelée γ -MSH.

Ling et coll., Life Science 25, 1 773 (1979) ont synthétisé cette hormone hypothétique, la γ -MSH ainsi que certains de ses dérivés très apparentés. Ils ont constaté qu'aucun de ces peptides ne possède une activité notable de MSH (par comparaison avec l' α -MSH) et que ces peptides ne stimulent pas in vitro la libération d'autres hormones telles que la lutéinostimuline, la folliculostimuline, la prolactine, l'hormone somatotrope et la thyrostimuline.

Par suite de sa similitude structurale étroite avec les peptides de type ACTH/MSH, qui sont connus pour avoir aussi une action sur certaines fonctions cérébrales, on a examiné la γ -MSH selon certaines techniques comportementales dans lesquelles des neuropeptides apparentés de type ACTH/MSH se sont révélés efficaces.

Le nouveau peptide et ses dérivés n'ont pas présenté d'effets semblables dans ces systèmes d'essai.

De façon surprenante, il est apparu que des dérivés de γ -MSH répondant à la formule générale :



où

R_1 représente un atome d'hydrogène ou un radical acyle aliphatique inférieur (en C_{1-6}) et

R_2 représente -OH ou -Gly-OH,

- 5 ainsi que leurs sels, esters et amides, induisent des variations comportementales exactement opposées à celles observées par exemple avec l' α -MSH, l'ACTH (1-24) et la β -endorphine.

- 10 Il est bien connu que l' α -MSH, la β -endorphine et des fragments d'ACTH tels que l'ACTH (1-24), l'ACTH (1-10) et l'ACTH (4-10) agissent sur le comportement d'évitement comme on peut le mettre en évidence selon l'essai d'ascension au mât et l'essai à la boîte-navette. Ces peptides retardent de façon significative l'extinction du comporte-
- 15 ment d'ascension au mât tandis qu'au contraire la γ -endorphine, certains fragments d'ACTH modifiés chimiquement ainsi que des antagonistes, bien connus, des opiacés tels que la haloxone et la naltrexone, induisent un effet opposé, c'est-à-dire une facilitation de l'extinction du com-
- 20 portement d'évitement par ascension du mât. Les peptides de formule I facilitent également l'extinction de la réponse d'évitement.

- Un autre comportement d'évitement influencé par l'ACTH (1-24) est l'acquisition du comportement d'évitement en
- 25 boîte-navette. Selon cette technique d'essai, on observe que l'injection sous-cutanée d'un peptide de l'invention, réduit de façon significative la vitesse à laquelle les rats acquièrent la réponse d'évitement.

- A cet égard les résultats expérimentaux obtenus avec
- 30 les peptides de l'invention sont parallèles à ceux obtenus avec l'antagoniste des opiacés qu'est la naloxone.

- On sait de plus que l'ACTH (1-24) et certains peptides apparentés induisent une réponse de toilettage excessif chez le rat lorsqu'on les injecte par voie intracérébro-
- 35 ventriculaire (icv). L' α -MSH, la β -MSH et l'ACTH (1-24) sont à peu près aussi actifs à cet égard tandis que les peptides de l'invention se révèlent être pratiquement

inactifs. Cependant après traitement sous-cutané avec un peptide de formule I, le toilettage excessif induit par l'ACTH (1-24) est nettement atténué. On a donc suggéré qu'un système sensible aux opiacés intervient comme inter-
5 médiaire dans ce comportement de toilettage et il est possible que les peptides de formule I exercent leur action inhibitrice par interférence avec un système sensible aux opiacés.

L'hypothermie induite par la β -endorphine est atté-
10 nuée 0,5 et 1 heure après l'injection chez les rats ayant reçu une injection icv préalable d'un peptide de formule I, c'est-à-dire 50 μ g de γ -MSH.

Cette activité d'antagonisme de la β -endorphine a été de plus mise en évidence dans une étude après un traite-
15 ment prolongé par la β -endorphine et la γ -MSH.

En plus du développement d'une tolérance et d'une dépendance physique, l'effet le plus frappant de la β -endorphine à cet égard est le comportement de recherche du médicament que l'on peut analyser de façon fiable par des
20 expériences d'auto-administration.

La β -endorphine, ainsi qu'un grand nombre de narcotiques tels que l'héroïne, induisent un comportement d'auto-administration chez le rat. Bien que la γ -MSH n'interfère pas immédiatement avec ce comportement d'auto-administration,
25 le cinquième jour de l'essai on peut mettre en évidence une inhibition liée à la dose de ce comportement.

Les résultats ci-dessus, obtenus chez l'animal de laboratoire suggèrent clairement que les peptides de l'in-
vention puissent être actifs comme antagonistes de la β -en-
30 dorphine, ce qui indique qu'ils peuvent contrecarrer les effets du neuropeptide endogène bien connu qu'est la β -endorphine.

De plus, ces peptides sont actifs comme antagonistes s'opposant aux effets des enképhalines et des endorphines
35 qui agissent sur les récepteurs des opiacés du cerveau si bien qu'ils peuvent également s'opposer aux effets des peptides endogènes agissant comme des opiacés. Dans ce

contexte, les peptides de l'invention ont une activité pharmacologique qui ressemble à de nombreux égards à celle des antagonistes classiques des narcotiques tels que la naloxone et la naltrexone, ce qui indique qu'on peut les
5 utiliser par exemple pour obtenir un effet d'antagonisme contre l'analgésie produite par les narcotiques et plus particulièrement pour inverser la dépression respiratoire induite par les narcotiques.

Les résultats des essais portant sur le comportement
10 d'évitement montrent que les peptides de l'invention qui agissent sur les récepteurs propres ou par l'intermédiaire des récepteurs d'ACTH du cerveau, peuvent de plus avoir une activité psychopharmacologique en particulier une activité dépressive sur le système nerveux central.

15 On peut présenter les peptides de l'invention sous forme de préparations pharmaceutiques liquides ou solides courantes telles que par exemple des comprimés pour l'administration sublinguale ou orale, des suppositoires pour l'administration rectale ou des solutions, émulsions ou
20 suspensions pour l'administration orale, mais de préférence pour l'administration intranasale et/ou par injection. On peut utiliser à cet effet les excipients, diluants et autres auxiliaires courants.

On administre de préférence les peptides selon l'in-
25 vention par voie parentérale à une dose journalière de 0,5 μ g à 0,5 mg par kg de poids corporel. Pour l'administration intranasale, la posologie journalière préférée est comprise entre 10 μ g et 50 mg par kg de poids corporel, tandis que pour l'administration sublinguale les doses sont
30 environ 10 fois supérieures à celles convenant pour l'administration parentérale.

On obtient des préparations remarquablement utiles lorsqu'on présente les peptides de l'invention sous une forme leur donnant une activité prolongée, par exemple lors-
35 qu'on incorpore les peptides à de la gélatine ou qu'on les transforme en des complexes peptide-métal. On peut obtenir ces complexes métalliques de façon habituelle, par mise en

contact du peptide en question avec un sel métallique, hydroxyde métallique ou oxyde métallique, faiblement solubles. Le métal préféré à cet égard est le zinc.

Le radical acyle aliphatique inférieur utilisé dans la définition du symbole R_1 de la formule I est de préférence le radical acétyle, mais il peut également entre autres être un radical propionyle, butyryle ou méthyl-2 propionyle.

On entend de préférence par sels des peptides de formule I les sels d'addition d'acides convenant en pharmacie mais cette définition englobe également les sels de métal alcalin des peptides I.

Pour obtenir les sels d'addition d'acides, on fait réagir les peptides de l'invention avec un acide organique ou minéral approprié tel que l'acide chlorhydrique, l'acide phosphorique, l'acide acétique, l'acide maléique, l'acide tartrique ou l'acide citrique.

On entend par amides des peptides de formule I, les peptides de formule I dont le radical hydroxy carboxylique terminal a été remplacé par un radical amino ou un radical amino mono- ou dialkyl(C_{1-4})-substitué.

Les esters des peptides de l'invention dérivent d'alcools aliphatiques ou araliphatiques ayant 1 à 18 atomes de carbone; on préfère en particulier les alcools aliphatiques inférieurs (C_{1-6}) tels que le méthanol, l'éthanol ou le butanol.

On peut préparer les peptides de formule I selon Ling et coll., Life Science vol. 25, pages 1 773-1 780 (1979).

Dans les expériences suivantes, on entend par γ -MSH le peptide de formule I où R_1 représente un atome d'hydrogène et R_2 représente -Gly-OH.

Dans les exemples le symbole s_m désigne l'erreur-type de la moyenne.

EXEMPLE 1

Extinction du comportement d'évitement actif.

On entraîne des rats Wistar mâles pesant 120 à 140 g pendant 4 jours consécutifs pour qu'ils acquièrent une

réponse d'évitement par ascension au mât. Chaque jour on soumet les rats à une séance de 10 minutes dans laquelle on effectue dix essais. Le cinquième jour, on effectue trois séances d'extinction séparées par des intervalles de deux heures. Immédiatement après la première séance d'extinction, on injecte par voie sous-cutanée aux rats 3 μ g de γ -MSH ou un placebo (0,5 ml de soluté salé).

Nombre moyen (\pm s_m) d'évitements conditionnés pendant l'extinction

	0	2	4 h après l'injection
placébo	9,0 \pm 0,4	8,2 \pm 0,9	6,8 \pm 0,5
γ -MSH	8,3 \pm 0,4	4,5 \pm 1,3	2,3 \pm 1,6

Comportement d'évitement passif

On étudie les animaux dans une situation les amenant à se déplacer avec un apprentissage expérimental pendant lequel ils reçoivent un choc inévitable. Le temps de latence précédant la réentrée des rats dans le compartiment obscur pendant l'essai de mémoire après 24 heures sert de réponse comportementale. On injecte aux rats par voie sous-cutanée 1,5 μ g de γ -MSH ou du placebo (0,5 ml de soluté salé) 1 heure avant l'essai de mémoire.

latence médiane d'évitement (secondes)

soluté salé	112,5
γ -MSH	24,5

Acquisition du comportement d'évitement en boîte-navette

On entraîne les rats à acquérir une réponse d'évitement conditionnée dans une boîte-navette pendant une séance unique de 30 essais. Le stimulus conditionné (ronfleur) est suivi du stimulus non conditionné (choc plantaire : 0,15 mA) avec un délai de 3 secondes. L'intervalle moyen entre les essais est de 60 secondes. On traite les animaux par voie sous-cutanée avec 2,0 μ g de γ -MSH, 0,5 ml de placebo ou 80 μ g de naloxone, 60 minutes (γ -MSH) ou 10 minutes (naloxone) avant de commencer l'essai.

Réponses moyennes ($\pm s_m$) d'évitement conditionné

placébo $16,8 \pm 0,9$

γ -MSH $6,5 \pm 1,2$

5 placébo $19,7 \pm 1,3$

naloxone $10,8 \pm 2,6$

EXEMPLE 2

Influence de la γ -MSH sur la réponse de toilettage excessif
produite par l'ACTH₁₋₂₄

10

Traitement Note de toilettage (moyenne $\pm s_m$)

s.c. i.c.v.

placébo ACTH₁₋₂₄ 166 ± 10

γ -MSH ACTH₁₋₂₄ 99 ± 15

15 placébo placébo 22 ± 6

On place une canule de polyéthylène dans un des ventricules cérébraux latéraux à des rats Wistar mâles pesant 140-160 g une semaine avant l'expérience et on les traite par voie sous-cutanée avec 100 μ g de γ -MSH ou 0,5 ml de soluté salé comme placébo et après 15 minutes, on effectue une injection icv de 0,3 μ g d'ACTH₁₋₂₄ ou de placébo (3 μ l de soluté salé).

Immédiatement après on place les rats individuellement dans des boîtes de verre et après 15 minutes, on commence à analyser le comportement. Pendant une période de 50 minutes, l'observateur détermine toutes les 15 secondes si le rat procède ou non à un toilettage. Cette technique donne une note de toilettage maximale de 200.

EXEMPLE 3

30 L'influence de la γ -MSH sur les variations de température induites par la β -endorphine est illustrée graphiquement par la figure 1. Sur cette figure les variations de température ($\Delta^\circ\text{C}$) sont représentées en ordonnées et le temps (minutes) est représenté en abscisses.

35 Avant et à divers intervalles de temps après une injection icv, on mesure la température corporelle de rats Wistar

mâles pesant 150-170 g au moyen d'une sonde à thermistance insérée à environ 6 cm dans le rectum des rats et on l'évalue à 0,1°C près. On traite des groupes d'animaux soit avec 20 µg de β-endorphine soit avec 20 µg de β-endorphine et 50 µg de γ-MSH. Des rats recevant une injection de placebo ou de 50 µg de γ-MSH servent de témoins. On corrige les variations de température en fonction de la valeur moyenne des témoins de chaque expérience. Les résultats sont représentés par les variations moyennes de la température (°C) $\pm s_m$ en fonction du temps après le traitement. La zone ombrée représente la s_m des rats auxquels on a injecté le placebo. Dans le graphique on utilise le symbole "O" pour les résultats obtenus avec la β-endorphine et le symbole "●" pour les résultats obtenus avec le mélange de β-endorphine et de γ-MSH.

EXEMPLE 4

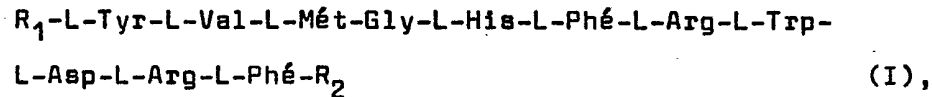
L'influence de la γ-MSH sur le comportement d'auto-administration d'héroïne par voie intraveineuse de rats Wistar mâles pesant 200-220 g est illustrée par la figure 2. Sur cette figure le nombre des auto-injections est représenté en ordonnées et le jour de l'essai est représenté en abscisses.

On laisse les animaux s'auto-administrer de l'héroïne (0,3 µg/injection) par voie intraveineuse selon un schéma de renforcement continu pendant une période d'essai de 5 jours à raison de 6 heures par jour.

Une heure avant chaque séance expérimentale quotidienne, on injecte aux animaux par voie sous-cutanée, 5 µg (x - x) de γ-MSH, ou 50 µg (■-■) de γ-MSH ou 0,5 ml de soluté salé (●-●) comme placebo. Les nombres moyens d'auto-injections ($\pm s_m$) le deuxième et le cinquième jour de l'essai sont représentés.

Revendications :

1.- Nouveaux médicaments à activité psychopharmacologique caractérisés par le fait qu'ils consistent en un peptide de formule :



où

- 5 R_1 représente un atome d'hydrogène ou un radical acyle aliphatique inférieur (C_{1-6}) et
- R_2 représente un radical hydroxy ou le radical -Gly-OH, ou un sel, ester ou amide correspondant.

10 2.- Nouveaux médicaments selon la revendication 1, caractérisés par le fait qu'ils consistent en un peptide de formule I où R_1 représente un atome d'hydrogène et R_2 représente -Gly-OH ou un sel, ester ou amide correspondant.

15 3.- Compositions thérapeutiques caractérisées par le fait qu'elles renferment comme ingrédient actif un médicament selon l'une des revendications 1 ou 2 en mélange avec des diluants ou véhicules convenant en pharmacie.

1/2

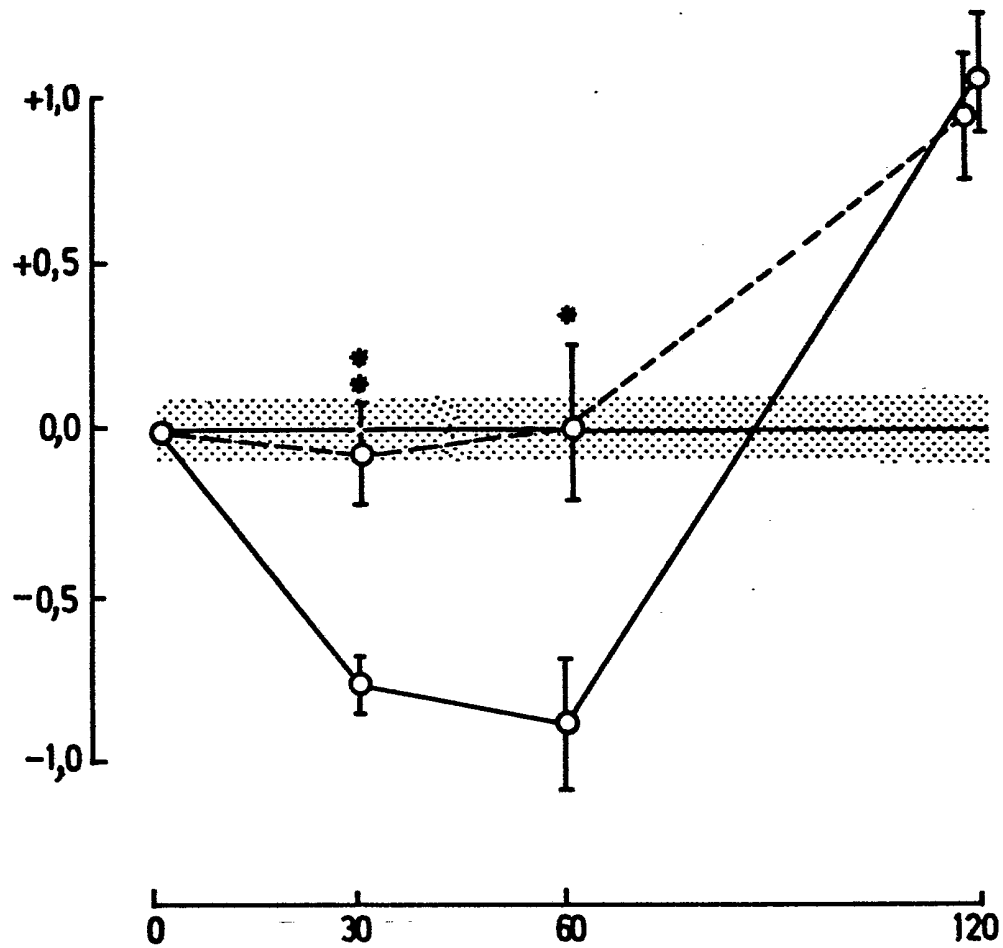


FIG.1

2/2

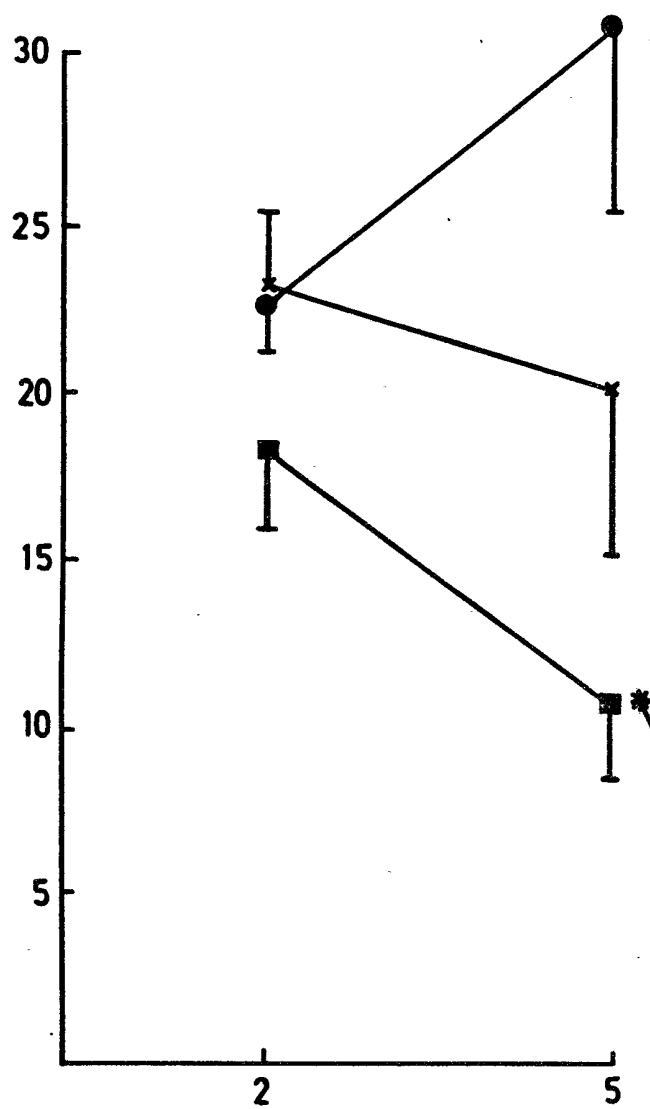


FIG.2