

(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
24 janvier 2008 (24.01.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2008/009868 A2

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/051706

(22) Date de dépôt international : 20 juillet 2007 (20.07.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0606698 21 juillet 2006 (21.07.2006) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : EX-
ONHIT THERAPEUTICS SA [FR/FR]; 26 rue Brunel,
F-75017 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
SCHWEIGHOFFER, Fabien [FR/FR]; 36 avenue
Val de Beauté, F-94130 Nogent Sur Marne (FR). DE-
SIRE, Laurent [FR/FR]; 102 boulevard Kellerman,
F-75013 Paris (FR). BOURDIN, Jérôme [FR/FR]; 18E
rue de la Bajatière, F-38100 Grenoble (FR).

(74) Mandataires : BECKER, Philippe etc.; Cabinet Becker
& Associés, 25 rue Louis Le Grand, F-75002 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHODS AND TOOLS FOR THE THERAPY OF NEURODEGENERATIVE PATHOLOGIES

(54) Titre : PROCÉDES ET OUTILS POUR LA THÉRAPIE DE PATHOLOGIES NEURODEGENERATIVES

(57) Abstract: The present invention relates to compositions and methods for the treatment of neurodegenerative pathologies in which the cognitive functions are affected, as observed in Alzheimer's disease. More particularly, the invention presents a strategy for observing the activity and/or the efficacy of neuroprotective treatments in human clinical studies, which strategy is based on the biochemical dosage of certain platelet parameters and can consequently be realized by means of blood draws. The invention also relates to methods, tools, constructions and compositions which are suitable for the realization of said strategies.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des compositions et méthodes pour le traitement de pathologies neurodégénératives dans lesquelles les fonctions cognitives sont altérées, comme observé dans la maladie d'Alzheimer. Plus particulièrement, l'invention présente une stratégie pour suivre en clinique humaine l'activité et/ou l'efficacité de traitements neuro-protecteurs, basée sur le dosage biochimique de certains paramètres des plaquettes, et donc réalisable à partir de prélèvements sanguins. L'invention concerne également des méthodes, outils, constructions et compositions adaptées à la mise en oeuvre de ces stratégies.

WO 2008/009868 A2

PROCEDES ET OUTILS POUR LA THERAPIE DE PATHOLOGIES NEURODEGENERATIVES

La présente invention concerne des compositions et méthodes pour le traitement de pathologies neurodégénératives dans lesquelles les fonctions cognitives sont altérées, comme observé dans la maladie d'Alzheimer. Plus particulièrement, l'invention présente une stratégie pour suivre en clinique humaine l'activité et/ou l'efficacité de traitements neuro-protecteurs, basée sur le dosage biochimique de certains paramètres des plaquettes, et donc réalisable à partir de prélèvements sanguins. L'invention concerne également des méthodes, outils, constructions et compositions adaptées à la mise en œuvre de ces stratégies.

La maladie d'Alzheimer représente la principale cause de démence et la maladie neurodégénérative la plus fréquente. Cette maladie, d'évolution progressive, est caractérisée par la perte de mémoire et par une dégradation des aptitudes au langage, à l'orientation et au jugement. L'examen de cerveaux de patients atteints de cette maladie révèle une perte de neurones de l'hippocampe, centre important de la mémoire, et du cortex cérébral, impliqué dans le raisonnement, le langage et la mémoire. Les neurones cholinergiques sont particulièrement affectés par cette déplétion.

Une anomalie majeure observée dans les cerveaux des malades atteints de la maladie d'Alzheimer est l'accumulation d'agrégats intracellulaires et extracellulaires de protéines. Des plaques séniles formées par agrégation intra et extracellulaire de peptide beta-amyloïde (A β), résultant du clivage de l'APP (Amyloid Precursor Protein), caractérisent des régions d'altérations impliquant des neurones et des cellules gliales. D'autres agrégats intracellulaires, neurofibrillaires, de la protéine tau semblent bien corrélés avec la gravité de la démence.

Les études génétiques menées sur les formes familiales ont montré que 4 gènes sont associés au développement de la maladie. L'APP, les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2) et l'apolipoprotéine E (Apo E). Bien que des mutations ou polymorphismes dans chacun

de ces gènes aboutissent à une production accrue de peptide A β , les mécanismes qui président aux pertes synaptiques et neuronales restent mal connus. Plusieurs hypothèses et mécanismes semblent ainsi coexister, qui impliquent des phénomènes tels que le stress oxydatif, qui peut être induit notamment par le peptide A β , les phénomènes inflammatoires et immunitaires ou encore les défauts d'hormones sexuelles, les défauts d'insuline et l'hypothyroïdisme. D'autres hypothèses soulignent le rôle des modifications des influx de calcium et de l'excitotoxicité. Toutefois, aucun élément ne permet de rendre compte de la vulnérabilité particulière des neurones cholinergiques. Les traitements actuellement disponibles, basés sur l'utilisation d'inhibiteurs d'acétylcholinestérase, ne font qu'améliorer de façon transitoire les fonctions cognitives des patients et ne représentent pas une approche thérapeutique susceptible de ralentir la progression de la maladie d'Alzheimer et encore moins de la guérir.

Si de récentes observations soulignent la possibilité d'intervenir pharmacologiquement par des approches d'immunothérapie dirigée contre le peptide A β , il est encore plus pertinent de cibler directement les sécrétases qui sont les protéases impliquées dans le métabolisme de l'APP et la production du peptide A β .

Le peptide A β est un fragment de 40/42 résidus qui est produit, dans la voie amyloïdogénique, via un clivage séquentiel de la protéine APP par deux protéases appelées β -secretase (BACE) et γ -secretase (présénilines). La séquence du peptide A β est localisée à la jonction entre les domaines intramembranaire et extracellulaire de l'APP. Dans la voie non-amyloïdogénique, l'APP est clivé dans le domaine A β par une α -secretase entre les acides aminés 16(Lys) et 17(Leu) de la région A β , générant la partie APP soluble α (sAPP α , 105-125 kDa, résidus 1-688 de la forme APP770) relarguée dans le milieu extracellulaire et un fragment retenu à la membrane (contenant une partie du domaine transmembranaire et la partie intracellulaire C terminale) appelé C83 (10 kDa), lui-même clivé par la γ -sécrétase pour générer le peptide « APP IntraCellular Domain » (AICD) et le peptide P3 (3 kDa). L'action de l' α -secretase empêche donc non seulement la formation du peptide amyloïde, mais stimule aussi la génération du grand fragment extracellulaire N-terminal (ectodomaine) de l'APP. Les fragments solubles N-terminaux de l'APP générés par l' α -secretase, ou sAPP α sont

relargués de façon constitutive dans le lumen vésiculaire et à la surface de la cellule. De telles espèces de l'APP sont sécrétées, *in vitro*, dans le milieu de culture conditionné par les cellules exprimant l'APP, et sont retrouvées *in vivo* dans le plasma et le liquide céphalorachidien.

Les approches décrites pour stimuler l'activité α -secretase, et augmenter les niveaux de sAPP α mettent en jeu l'activation de récepteurs couplés aux protéines G tels que les récepteurs aux nucléotides P2Y2, le récepteur au PACAP PAC1, ou les récepteurs de divers neurotransmetteurs comme les récepteurs muscariniques, le récepteur métabotrope au glutamate ou encore les récepteurs de la sérotonine (ref iii pour revue). Les voies stimulées par les neurotransmetteurs mettent en jeu les systèmes protéine kinase C (PKC) et phospholipase C, ainsi que les MAP kinases, bien décrits dans la littérature comme modulateurs de la production de sAPP α , comme la stimulation de voies PKC-dépendantes par les esters de phorbol ou encore par des agonistes des récepteurs de la sérotonine 5-HT2a et 2c. D'autres voies mettent en jeu le récepteur de la sérotonine 5-HT(4), connu pour jouer un rôle dans la cognition et la mémoire, via la production d'AMPc et le recrutement de la GTPase Rac1 ou encore des inhibiteurs d'acétylcholine agissant via la PKC et ou les MAP-kinases, les oestrogènes tels le 17 β oestradiol ou encore la testostérone. Certaines hormones et facteurs de croissance tels l'EGF et l'insuline sont également connus pour stimuler la production de sAPP α via la PKC ou la PI3K, respectivement. D'autres agents pharmacologiques ont été récemment décrits comme stimulant la production de sAPP α , selon une voie cAMP-Protéine kinase A (PKA) comme la forskoline, ou selon une voie PKC/MAP-kinase, comme les agents anti-inflammatoires non stéroïdiens tels les inhibiteurs des cyclooxygénase COX (Ibuprofen), les statines inhibiteurs de la HMG-CoA réductase (lovastatine), les dérivés de la rasagiline ou encore les polyphénols tels le (-)-epigallocatechin-3-gallate. Mais toutes ces approches, si elles ont permis de valider la pertinence de la stratégie visant à stimuler la production de sAPP α à l'aide d'outils pharmacologiques, n'ont pas abouti à de nouveaux composés adaptés à la clinique humaine.

La présente invention fournit un rationnel à l'utilisation d'agents pharmacologiques comme des composés chimiques appartenant à la classe des pyrazolopyridines, dont l'étazolate, destinés à stimuler la production du fragment sAPP α .

La présente invention décrit également le lien entre l'augmentation de la production de sAPP α et la capacité de l'étazolate à inhiber les effets induits par les ROS ("Reactive Oxygen Species"), c'est-à-dire par le stress oxydatif.

Ce phénomène de stress oxydatif joue un rôle essentiel dans plusieurs aspects de la maladie d'Alzheimer : non seulement la dégénérescence neuronale et l'inflammation astrocytaire mais également l'activation et l'agrégation plaquettaire. Ces derniers phénomènes participent aux complications vasculaires de la maladie d'Alzheimer et sont à l'origine des démences vasculaires.

Il est par conséquent possible de suivre un effet inhibiteur de l'étazolate sur les voies initiées par le stress oxydatif au niveau de l'activation plaquettaire. Plus généralement, il est possible de suivre l'effet inhibiteur de composés neuroprotecteurs au niveau de l'activation plaquettaire.

Ainsi, la présente invention permet de proposer, pour la première fois, la mesure de tout phénomène biologique relié à l'activation ou à l'agrégation plaquettaire pour le suivi clinique ou thérapeutique de l'efficacité de composés neuroprotecteurs. La capacité de générer à partir de l'APP les peptides Abeta et sAPP α est partagée par le système nerveux et les plaquettes. Par conséquent, l'action inhibitrice de l'étazolate sur le stress oxydatif se traduisant par une augmentation de la production de sAPP α , la présente invention fournit un rationnel pour suivre l'action de l'étazolate sur la maturation de l'APP à partir d'échantillons plaquettaires ou plus généralement d'échantillons sanguins.

La présente invention revendique également la mesure de tout phénomène biologique relié à l'activation ou à l'agrégation plaquettaire pour le suivi clinique ou thérapeutique de l'efficacité de tout composé de la famille des pyrazolopyridines. De plus, la présente

invention permet de revendiquer la mesure de toute modification de la maturation de l'APP dans le sang, notamment le dosage de la sAPPalpha, à partir d'échantillons de sang ou de préparations de plaquettes afin d'assurer le suivi clinique et thérapeutique de l'efficacité de tout composé de la famille des pyrazolopyridines.

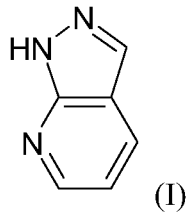
Ainsi, un objet de l'invention réside dans une méthode pour évaluer ou suivre l'efficacité d'un traitement neuroprotecteur chez un mammifère, comprenant une étape de mesure (de préférence in vitro ou ex vivo) de la production de sAPPalpha dans un échantillon biologique du mammifère ayant reçu ledit traitement, ledit échantillon contenant des plaquettes, la production de sAPPalpha étant une indication de l'efficacité du traitement.

Un autre objet de l'invention réside dans un procédé de dosage immunologique de la sAPPalpha dans un échantillon, comprenant une étape de traitement thermique de l'échantillon (pour démasquer la sAPPalpha), et une étape de dosage immunologique. Le procédé est adapté au dosage de la sAPPalpha à partir de tout échantillon, et notamment d'échantillons de sang ou dérivé de sang (sérum, plaquettes, etc.), d'autres fluides biologiques. L'échantillon peut être pré-traité, notamment par dilution, enrichissement, filtration, etc.

Traitement neuroprotecteur

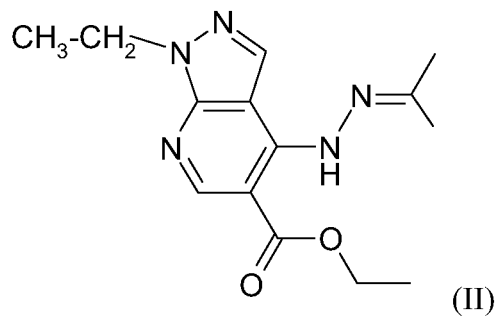
L'invention peut être utilisée pour évaluer ou suivre l'efficacité de tout traitement neuroprotecteur chez un mammifère. Au sens de l'invention, on entend par traitement neuroprotecteur tout traitement utilisable ou utilisé dans le traitement des maladies affectant le système nerveux, notamment de maladies neurodégénératives. Dans ce contexte, on peut citer notamment les composés choisis parmi les pyrazolopyridines et les agents modulateurs des récepteurs GABA(A).

Au sens de l'invention, un composé de la famille des pyrazolopyridines désigne avantageusement tout composé de formule (I) suivante, qui peut être substitué ou non, sur l'une quelconque des positions.



Les composés de la famille des pyrazolopyridines utilisés dans la présente invention sont en particulier choisis parmi les composés suivants :

- L'étazolate de formule (II) suivante :



l'étazolate constituant un mode de mise en œuvre préféré de l'invention,

- Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (tracazolate),
- Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 1-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-β-*D*-1-deoxy-ribofuranose
- Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-(*N'*-isopropylidene-hydrazino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (SQ 20009),
- 4-amino-6-méthyl-1-*n*-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine

- Ester éthylique de l'acide 4-Amino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (desbutyl tracacolate),
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-methyl-4-methylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- Ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-propyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-ethylamino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- Ester éthylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 5-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-2-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3-ol,
- ester allylique de l'acide 1-allyl-4-amino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-amino-1-ethyl-3,6-dimethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-diméthylamino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-methyl-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- ester éthylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-but-3-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-isopropylamide,
- 4-amino-1-pentyl-*N-n*-propyl-1*H*-pyrazolo-[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-(3-méthyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-*N*-(2-propenyl)carboxamide,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,

- ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-ynyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-enyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
- ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-(3-méthyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester isobutylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,
- ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-(3-méthyl-but-2-enyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylamide,
- ethyl 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-hydroxamate,
- ester prop-2-ynylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-ényl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-propylamide,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,
- ester 2-méthyl-allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-Amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide (ICI 190,622),
- 4-amino-1-pent-4-ynyl-*N*-2-propenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-but-2-ynylamide,
- ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-(2-cyclopropyl-éthyl)-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-hex-5-ynyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,
- ester but-3-énylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- ester cyclopropylméthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-butylamino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
- ester 2-cyclopropyl-éthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester cyclopropylméthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester cyclopropylméthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-amino-1-benzyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-benzylamide,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-phenylamide,
- ester benzylque de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-Azido-1-β-D-ribofuranosylpyrazolo[3,4-*b*]pyridine,
- 1-pent-3-ynyl-*N*-2-propenyl-4-propionamido-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- 2-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-5-hydroxyméthyl-tetrahydro-furan-3,4-diol,
- 2-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-éthanol,

- 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propan-1-ol,
- ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-acétique,
- ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propionique,
- ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,
- ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-benzoïque,
- ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,
- *N*-benzylidene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- *N*-furan-2-ylmethylene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- *N*-(4-fluoro-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- *N*-(3-furan-2-yl-allylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- *N*-(4-methoxy-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

- 4-[(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazonomethyl]-benzotrile,
- *N*-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-nitro-benzylidene)-hydrazine,
- *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-nitro-benzylidene)-hydrazine,
- *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-trifluoromethyl-benzylidene)-hydrazine,
- *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(5-nitro-furan-2-ylmethylene)-hydrazine,
- *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-trifluoromethyl-benzylidene)-hydrazine,
- *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(6-nitro-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene)-hydrazine,
- Acide 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5- (pyridin-4-ylmethyl)-amide,
- 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(tetrahydro-furan-2-ylmethyl)-amide,

- 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(5-hydroxy-pentyl)-amide,
- 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-[3-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-propyl]-amide,
- ester éthylique de l'acide 4-*tert*-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-cyclopropylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-(2-ethoxy-ethylamino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-benzylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenethylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique.

Ces composés peuvent être sous forme de sel, ester, racémique, isomère actif, etc. Dans un mode particulier de mise en œuvre, le composé neuroprotecteur est choisi parmi l'étazolate, le tracazolate ou le cartazolate, plus préférentiellement l'étazolate.

L'agent modulateur du GABA(A) peut être tout composé chimique, d'origine naturelle ou synthétique, notamment une molécule organique ou inorganique, d'origine végétale, bactérienne, virale, animale, eucaryote, synthétique ou semi-synthétique, capable de moduler l'expression ou l'activité des radicaux libres (ROS). A titre d'exemple particulier, on peut citer notamment les benzodiazépines.

Les composés ou traitements utilisés dans le cadre de la présente invention peuvent être formulés et administrés de différentes façons. L'administration peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, de préférence par voie orale ou par injection, systémique ou locale. L'injection est typiquement réalisée par voie intra-oculaire, intra-péritonéale, intra-cérébrale, intra-veineuse, intra-artérielle, sous-cutanée ou intra-musculaire. L'administration par voie orale ou systémique est préférée. Les doses administrées peuvent être adaptées par l'homme de l'art. Typiquement, de 0,01 mg à 100 mg / kg environ sont injectés, pour des composés de nature chimique. Des dosages unitaires particuliers sont par exemple de 0,5 à 40 mg par dose administrée. Il est entendu que des injections répétées peuvent être réalisées, éventuellement en combinaison avec d'autres agents actifs ou tout véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique (ex., tampons, solutions saline, isotonique, en présence d'agents stabilisants, etc.).

Le véhicule ou excipient acceptable sur le plan pharmaceutique peut être choisi parmi des solutés tampons, solvants, liants, stabilisants, émulsifiants, etc. Des solutés tampons ou diluant sont notamment le phosphate de calcium, sulfate de calcium, lactose, cellulose, kaolin, mannitol, chlorure de sodium, amidon, sucre en poudre et hydroxy propyl méthyl cellulose (HPMC) (pour libération retard). Des liants sont par exemple l'amidon, la gélatine et des solutés de remplissage comme le sucrose, glucose, dextrose, lactose, etc. Des gommes naturelles ou synthétiques peuvent aussi être utilisées, comme notamment l'alginate, la carboxyméthylcellulose, la méthylcellulose, la polyvinyl

pyrrolidone, etc. D'autres excipients sont par exemple la cellulose et du stéarate de magnésium. Des agents stabilisants peuvent être incorporés aux formulations, comme par exemple des polysaccharides (acacia, agar, acide alginique, gomme guar et tragacanth, la chitine ou ses dérivés et des éthers de cellulose). Des solvants ou solutés sont par exemple la solution Ringer, l'eau, l'eau distillée, des tampons phosphates, des solutions salines phosphatées, et autres fluides conventionnels.

Echantillon

Pour la mise en œuvre de la méthode décrite ci-dessus, il est possible d'utiliser tout échantillon contenant des plaquettes, provenant du sujet traité. L'invention montre en effet que des composés neuroprotecteurs sont capables d'induire la production de sAPPalpha dans les plaquettes. Ainsi, l'efficacité du traitement peut être évaluée et suivie par un dosage de sAPPalpha dans tout échantillon contenant des plaquettes.

Dans un mode particulier de mise en œuvre, l'échantillon biologique est un échantillon de sang ou dérivé de sang. On entend par échantillon "dérivé" de sang tout échantillon de sang traité, par exemple par dilution, filtration, purification, etc., afin par exemple d'enrichir l'échantillon en plaquettes, d'éliminer d'autres populations cellulaires, d'inactiver des pathogènes éventuels, de calibrer un dosage, etc.

La méthode ci-dessus est applicable chez tous mammifères, de préférence chez les humains, en particulier atteints de maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, la SLA, la maladie de Huntington, etc.

Dosage de la sAPPalpha

Différentes techniques connues en soi de l'homme du métier peuvent être utilisées pour doser la sAPPalpha. Ainsi notamment, on peut mentionner des techniques immunologiques, basées sur l'utilisation d'anticorps spécifiques de la sAPPalpha. De tels anticorps sont disponibles dans la littérature (Exp. Neurol. 2003 Sep;183(1):74-80), ou peuvent être produits par des techniques connues en soi de l'homme du métier. Ainsi,

il est possible de produire de tels anticorps par immunisation d'un mammifère non humain avec la sAPPalpha ou tout épitope ou fragment de celle-ci, puis isolement et/ou sélection des anticorps polyclonaux ou monoclonaux capables de lier la sAPPalpha in vitro. La spécificité des anticorps peut ensuite être confirmée par détermination des tests de liaison des anticorps à la protéine APP entière et/ou à d'autres peptides dérivés de la protéine APP, tels que le fragment C83, le peptide AICD et le peptide P3. De préférence, on utilise des anticorps capables de lier spécifiquement la sAPPalpha et incapables de lier de manière spécifique le fragment C83, le peptide AICD et le peptide P3. La "spécificité" de liaison indique que la liaison à la sAPPalpha peut être discriminée d'une liaison éventuelle à d'autres protéines ou peptides.

La méthode de mesure de la production de sAPPalpha peut impliquer une technique ELISA, RIA, l'emploi de substrats revêtus d'anticorps spécifiques, de billes magnétiques, de colonnes, de plusieurs anticorps (anticorps de capture et anticorps de révélation), etc. De manière préférée, on utilise un test de type ELISA.

Typiquement, la production de sAPPalpha mesurée est comparée à un niveau de référence ou à une valeur mesurée avant le traitement, ou à un stade antérieur de traitement, chez ledit mammifère. Ainsi, il est possible déterminer si le niveau de production de la sAPPalpha évolue chez le patient consécutivement au traitement, ou au cours du traitement. Un maintien ou une augmentation du niveau de sAPPalpha constitue une indication de l'efficacité du traitement.

Par ailleurs, les inventeurs ont mis au point un procédé amélioré de dosage immunologique de la sAPPalpha, applicable à tout échantillon. La méthode repose notamment sur une étape de traitement de l'échantillon, permettant de démasquer (et ainsi de rendre accessible) des épitopes spécifiques du fragment soluble sAPPalpha. En effet, les résultats présentés par les inventeurs montrent que, sans un protocole adapté, la sAPPalpha ne peut être détectée de manière quantifiable et spécifique en ELISA.

Ainsi, un autre objet de l'invention réside dans un procédé de dosage immunologique de la sAPPalpha dans un échantillon, comprenant une étape de traitement thermique de

l'échantillon (permettant de démasquer des épitopes de la sAPPalpha), et une étape de dosage immunologique. Le procédé est adapté au dosage de la sAPPalpha à partir de tout échantillon, et notamment d'échantillons de sang ou dérivé de sang (sérum, plaquettes, etc.), d'autres fluides biologiques, des surnageants de culture. L'échantillon peut être pré-traité, notamment par dilution, enrichissement, filtration, etc.

De préférence, l'étape de traitement thermique comprend un traitement de l'échantillon à une température comprise entre 60°C et 70°C environ, pendant une période de temps suffisante pour démasquer des épitopes de la sAPPalpha, typiquement pendant une période comprise entre 30 secondes et 10 minutes, environ. Comme le montrent les exemples, une telle méthode permet un dosage fiable, reproductif et spécifique de la sAPPalpha à partir d'échantillons sanguins humains.

Le dosage immunologique peut être réalisé par différentes techniques connues en soi, telles que notamment ELISA, avec tout réactif spécifique de la sAPPalpha, notamment tout anticorps spécifique comme décrit ci-dessus. Parmi ces anticorps, on peut citer notamment tout anticorps reconnaissant un épitope contenu dans les résidus d'acides aminés 1-17 de l'APP. Plus spécifiquement, de tels anticorps ou kits sont disponibles dans le commerce, comme le kit ELISA APP, vendu par Sigma ou Biosource, ou certains anticorps spécifiques de la sAPP α (au niveau de la coupure de l'APP) ou reconnaissant la sAPP α et l'APP :

- anticorps monoclonal 6E10 (spécifique de la sAPP α)
- anticorps monoclonal 2B3 (inclu dans le kit IBL de détection de la sAPP α), spécifique de la sAPP α
- anticorps monoclonal BAN50, produit par immunisation contre le peptide Abeta 1-16 (PMID: 10480887)
- anticorps monoclonal 22C11 (anti-APP reconnaissant la sAPP α)
- Polyclonal polyC11 (Upstate /Millipore, Cat # AB5368, produit par Chemicon)
- sAPP (poly) de OYC (Cat# APP-KPI- Antiserum)
- sAPP α (poly) de Signet Covance (Cat# SIG-39139)
- anticorps 3329 de lapin anti-sAPP, qui reconnaît spécifiquement la forme recombinante de la sAPP α (PMID: 9465092).

Applications thérapeutiques

La mise en évidence inattendue que les traitements neuroprotecteurs définis ci-dessus permettent d'induire ou de stimuler la production de sAPPalpha dans les plaquettes permet d'envisager de nouvelles utilisations thérapeutiques de ce type de composés.

Ainsi, un objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé choisi parmi les pyrazolopyridines et les agents modulateurs des récepteurs GABA (A) pour la préparation d'un médicament pour stimuler ou induire la production de sAPPalpha par les plaquettes chez un mammifère.

L'invention concerne également l'utilisation d'un composé choisi parmi les pyrazolopyridines et les agents modulateurs des récepteurs GABA (A) pour la préparation d'un médicament pour diminuer le risque de formation de thrombus chez un mammifère.

L'invention concerne également l'utilisation d'un composé choisi parmi les pyrazolopyridines et les agents modulateurs des récepteurs GABA (A) pour la préparation d'un médicament pour réduire les complications vasculaires chez les patients atteints de maladies neurodégénératives.

L'invention concerne encore l'utilisation d'un composé choisi parmi les pyrazolopyridines et les agents modulateurs des récepteurs GABA (A) pour la préparation d'un médicament pour inhiber l'agrégation plaquettaire chez un mammifère, en particulier chez les patients atteints de maladies neurodégénératives.

La présente invention sera décrite plus en détails à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des Figures

Figure 1 : Dosage de la sAPPalpha dans du sérum non-traité

Figure 2 : Effet d'un traitement thermique sur la détection de sAPPalpha en ELISA

Figure 3 : Détection de sAPPalpha dans du sérum humain

Figure 4 : Détection de sAPPalpha recombinant dans du sérum

Figure 5: L'étazolate stimule in vitro la production de sAPPalpha

Figure 6: L'étazolate stimule la production de sAPPalpha dans les neurones

Figure 7 : L'étazolate stimule in vivo la production de sAPPalpha

Figure 8 : Effet de l'étazolate sur la toxicité du peptide amyloïde et effet d'inhibiteurs du récepteur GABA_A sur la neuroprotection induite par l'étazolate. Statistiques : Test de Wilcoxon : ###, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

Figure 9: Effet d'inhibiteurs des alpha secretase sur la neuroprotection induite par l'étazolate. Statistiques : Test de Wilcoxon : *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$

Figure 10: Effet d'un anticorps neutralisant anti-sAPP α sur la neuroprotection induite par l'étazolate. Statistiques : Test de Wilcoxon : ##, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

Exemples

Exemple 1 : Procédé de dosage de la sAPP alpha

Le fragment soluble de l'APP (sAPP α) circulant dans le sang est issu des cellules plaquettaires et de l'activité α -secretase associée. Celui-ci a été montré diminuant avec l'âge et au cours du processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer (MA). Le sAPP α circulant dans le sang peut donc être considéré comme un bio marqueur pour

monitorer les changements dans le processing de l'APP qui apparaissent avec l'âge et au cours du processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer et qui pourront être corrigés suite la prise de traitements médicamenteux.

Il existe donc un véritable intérêt à quantifier de façon précise les niveaux de sAPP α dans le sang et plus particulièrement dans le sérum, après la coagulation sanguine et l'activation des plaquettes, afin d'évaluer l'efficacité de traitements ayant pour but de modifier le processing de l'APP pour un traitement de la maladie d'Alzheimer.

La méthode décrite ci-dessous a été développée afin de démasquer et de rendre accessible l'épitope spécifique du fragment soluble sAPP α pour une détection de type anticorps-antigène de haute affinité selon la technique double sandwich de type ELISA.

En effet, sans un protocole adapté aux traitements des échantillons de sérum, le sAPP α ne peut être détecté de manière quantifiable et spécifique en ELISA. Comme le montre la figure 1, le sérum seul sans traitement préalable montre une détection de sAPP α très nettement quantifiable (3.5 ng/mL), mais qui ne semble pas s'additionner au sAPP α recombinant rajouté (+10 ng/mL), alors que la même quantité de sAPP α rajouté montre une détection (8.7 ng/mL) aux alentours de la quantité attendue (10ng/mL). La détection ELISA dans le sérum pur sans aucun traitement particulier ne semble pas être spécifique au sAPP α soluble et circulant.

Pour avoir accès au sAPP α soluble dans le sérum et être capable de le quantifier de manière fiable, spécifique et reproductible, nous avons développé une méthode de préparation et de traitement des échantillons permettant à l'aide d'un traitement thermique de rendre accessible le sAPP α présent dans le sérum aux anticorps spécifiques de l'ELISA.

Les échantillons sériques sont initialement dilués dans du tampon Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 (Sigma # D8537), 5% BSA, 0.05% Tween-20. Les échantillons dilués sont ensuite traités par la chaleur à 66°C pendant 10 minutes, puis refroidis à 4°C. Les échantillons sont ensuite analysés par la technique ELISA à l'aide d'un kit spécifique du sAPP α .

Comme le montre la figure 2, la détection du sAPP α en ELISA à partir de sérum augmente de manière significative en fonction de la température de chauffage et de la durée du traitement thermique (gamme de température 60- 70°C ; X = 66°C).

Cette méthode de préparation des échantillons de sérum et le traitement thermique ont été évalués sur 7 sérums humains différents, dans 3 expériences distinctes. Comme la montre la figure 3, la détection de sAPP α en ELISA à partir de sérums humains semble reproductible avec cette méthode (X = 66°C).

Afin d'évaluer au mieux cette méthode de dosage du sAPP α dans le sérum, nous avons évalué la linéarité de la détection du sAPP α dans un sérum humain en utilisant trois quantités croissantes de sAPP α recombinant (5 ; 7,5 et 10 ng/mL). La figure 4, représente la moyenne de 3 expériences distinctes, réalisées à partir du même sérum sur 3 jours différents.

Comme le montre la figure 4, il existe une très bonne relation de proportionnalité entre les quantités de sAPP α rajouté/spikés et les quantités de sAPP α détectées en ELISA dans la matrice biologique (sérum) après la préparation et le traitement thermique. Ces résultats montrent que le sAPP α rajouté au sérum traité ne rentre pas en compétition avec le sAPP α libéré du sérum. Ces résultats présentent une bonne reproductibilité sur 3 expériences réalisées à 3 jours différents.

A partir de ces résultats, le recouvrement du sAPP α recombinant dans le sérum traité a pu être calculé en comparaison à des échantillons correspondant à la matrice biologique sans sAPP α endogène et auquel a été rajouté avec les mêmes quantités de sAPP α .

Comme le montre le tableau ci-dessous, le recouvrement (exprimé en % de la valeur attendue) du sAPP α recombinant dans le sérum à 3 quantités croissantes se situe dans des limites acceptables 100% \pm 25%.

Recouvrement du sAPPα recombinant dans le serum			
	concentrations attendues (ng/mL)		
Echantillons	5	7,5	10
1 / aliquot -1	106,0	95,2	100,7
1 / aliquot -2	122,2	113,1	114,2
1 / aliquot -3	118,9	103,5	101,1
1 / aliquot -4	113,4	109,9	111,3
1 / aliquot -5	119,2	104,1	101,2
Moyenne recouvrement	115,9	105,2	105,7
Ecart type	6,4	6,9	6,5
CV%	5,5	6,5	6,2

La FDA définit les critères de performances des dosages ELISA appliqués aux procédés diagnostiques dans le document US Food And Drug Administration Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001. Les documents suivants précisent les critères d'acceptance et de validation des immunoessais

- Findlay et al. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 21 (2000) 1249–1273
- Viswanathan et al. Workshop/Conference Report — Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays. The AAPS Journal 2007; 9 (1) Article 4 (<http://www.aapsj.org>)

Les données ci-dessous montrent que la performance de la méthode de dosage de l'invention, mise en oeuvre à l'aide du kit sAPP α vendu par IBL, est conforme aux critères recommandés par la FDA.

		Concentration (ng/ml)		
		5	7.5	10
Recouvrement	sAPPα			
	% Recouvrement	115.9	105.2	105.7
	CV%	5.5	6.5	6.2
Précision inter-série	CV%	4.6	6.4	5.5
	CV%	5.3	5.3	1.9
Précision intra-série	CV%	5.3	5.3	1.9
	CV%	5.3	5.3	1.9
Linéarité	r ²	0.99923		
	CV%	1.8	4.0	4.1
	Justesse %	98.1	96.6	96.0
LOQ (ng/ml)		1.0		
Effet matrice	% Recouvrement	95.8		
	CV%	13.1		
	Justesse %	90.0		
Spécificité	%	95.1		
	CV%	6.2		

LOQ : limite de quantification ; CV% coefficient de variation

Exemple 2 : L'étazolate stimule la production de sAPP α

Des cellules HEK293 transfectées de manière stable sur-exprimant l'APP humaine ont été maintenues dans du milieu Eagle Modifié contenant du sel Earle et supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (FBS), 2mM L-glutamine (Sigma, Lyon, France), 1X Acides Aminés Non Essentiels et des antibiotiques. Les cellules ont été traitées 48 heures après étalement sur plaques de 10cm avec des concentrations variables des molécules indiquées, ou avec du DMSO comme véhicule, pendant 24 heures. La sAPP α a été mesurée par ELISA et Western blot au moyen d'anticorps disponibles dans le commerce.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 5 et montrent que l'étazolate induit une sécrétion de sAPP α .

Exemple 3 : L'étazolate stimule la production de sAPP α par des neurones corticaux

La production de sAPP α a été mesurée sur des neurones corticaux isolés à partir d'embryons de rat Wistar âgés de 17 jours. Les cellules sont obtenues à partir des structures corticales qui sont disséquées dans une solution contenant 0.25% de trypsine. Les cellules dissociées sontensemencées à la densité de 500,000 par cm² dans du milieu Neurobasal contenant des additifs (1X B27, 2mM L-glutamine, 0.6% glucose, des antibiotiques et des antimycotiques ainsi que du sérum de cheval à 2%) dans des boites de culture coatées avec 6 μ g/ml de polyornithine. Les cellules sont maintenues à 37°C et 5% CO₂. 24 heures après ensemencement, les cellules sont traitées avec 5 μ M AraC (5 Cytosine arabinofuranoside) comme antimittotique. Après 4 jours in vitro, la moitié du milieu est changée avec du milieu sans sérum de cheval et la culture est maintenue pour maturation dans ce milieu pendant 7 à 10 jours.

La sAPP α a été mesurée par Western blot au moyen d'anticorps disponibles dans le commerce après un changement de milieu et une accumulation dans du milieu frais pendant 24 heures. Les quantifications ont été réalisées à partir d'analyses de densitométrie des images autoradiographiques scannées. Comme le montre la figure 6, l'étazolate (0,2 et 2 μ M pendant 24h) stimule le relargage de sAPP α à partir des neurones corticaux. Les résultats présentés sont la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat et sont exprimés sous la forme du pourcentage du contrôle (cultures non traitées).

Exemple 4 : L'étazolate stimule la production de sAPP α in vivo

La production de sAPP α a été étudiée in vivo chez le cochon d'Inde, un modèle physiologique de processing de l'APP dans le cerveau. L'étazolate ou du véhicule (solution saline physiologique) a été administré à des cochons d'Inde mâles albinos Hartley, pesant 250–270 g au début de l'expérience une fois par jour pendant 15 jours consécutifs, per os à la dose de 10mg/kg. 1 h après la dernière administration les cochons d'Inde ont été sacrifiés et les cerveaux immédiatement extraits, congelés dans de l'azote et stockés à -80 °C. Les cortex ont été homogénéisés à 4°C dans une solution de Tris base 20mM pH 7,5 contenant 0,2% Triton X-100, 50 μ g/mL gentamycine et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Le sAPP α soluble a été mesuré par un test

ELISA et les résultats normalisés par rapport à la quantité de protéines présentes dans les extraits.

La figure 7 présente l'augmentation de la quantité de sAPPalpha mesurée dans les cerveaux des animaux traités avec l'étazolate, comparé aux animaux contrôles traités avec le véhicule. L'augmentation d'un facteur trois induite par l'étazolate est statistiquement très significative (***) : $p < 1E-4$ selon le test de Wilcoxon).

Les résultats obtenus montrent que l'étazolate induit une sécrétion de sAPPalpha.

Exemple 5 : L'effet neuroprotecteur de l'étazolate requiert la production de sAPPalpha in vivo

Le peptide A β 25-35 contient le fragment neurotoxique du peptide amyloïde et est un outil classiquement utilisé pour étudier les effets neuroprotecteurs de composés. Au début de chaque expérience, les cultures neuronales âgées de 7-10 jours sont changées avec du milieu de culture frais et traitées avec le composé inhibiteur étazolate, six heures avant l'addition du peptide amyloïde A β 25-35 à la concentration de 33.5 μ M. De façon classique et reproductible, cette concentration génère 30 à 40% de toxicité dans les cultures neuronales.

Plusieurs expériences sont entreprises pour caractériser l'effet neuroprotecteur de l'étazolate. Afin de vérifier si la neuroprotection met en jeu le récepteur GABAA, les antagonistes du récepteur GABAA Picrotoxine (PTX), Gabazine/SR95531, Bicuculine (BIC) sont préincubés une heure avant l'étazolate à la concentration de 50 μ M, 20 μ M et 10 μ M, respectivement.

Récemment, plusieurs études ont démontré que la sAPP α présente des propriétés neurotrophiques et neuroprotectives, notamment contre le peptide amyloïde in vitro et in vivo, suggérant que l'étazolate pourrait médier ses effets neuroprotecteurs via la voie alpha secretase. Pour déterminer si l'inhibition du sAPPalpha, ou sa production, prévient l'effet neuroprotecteur de l'étazolate contre le peptide amyloïde, un anticorps neutralisant anti sAPP α (anticorps 3E9) et des inhibiteurs des alpha secretases sont respectivement utilisés. Pour la neutralisation du sAPP α , l'anticorps 3E9 (5 μ g/ml) est ajouté aux cellules corticales en même temps que l'étazolate. Deux inhibiteurs des alpha

secretases, le composé Furin Inhibitor I (Hwang EM, Kim SK, Sohn JH, Lee JY, Kim Y, Kim YS, Mook-Jung I. Furin is an endogenous regulator of alpha-secretase associated APP processing. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Oct 20;349(2):654-9.) et le TAPI (Slack BE, Ma LK, Seah CC. Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem J.* 2001 Aug 1;357(Pt 3):787-94) sont utilisés en pré-traitement une heure avant l'addition de l'étazolate.

Tous les traitements sont effectués au minimum en double et dans au moins deux cultures différentes. Après une incubation de 48 heures la toxicité est mesurée par un test MTT. Les résultats, normalisés à la moyenne du non-traité, sont statistiquement analysés par le test de Wilcoxon. La valeur significative est déterminée à p inférieur ou égal à 0.05.

MTT:

La toxicité est mesurée en utilisant le test MTT. Après l'incubation avec les composés, du MTT est ajouté à une concentration finale de 0,5 mg/ml par puits. Les plaques sont ensuite incubées pendant 30 minutes à 37 °C dans le noir. Le milieu est aspiré et les cristaux sont remis en suspension dans 500 µl de DMSO (diméthylsulfoxyde). L'absorbance à 550 nm est lue et le pourcentage de viabilité est calculé.

Résultats :

Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 8-10. Ces résultats illustrent l'effet protecteur du composé de l'invention sur la mort neuronale induite par le peptide amyloïde Aβ 25-35.

Lors du co-traitement des neurones par l'étazolate, un effet protecteur dose-dépendent est observé (Figure 8) avec en particulier 90% de viabilité cellulaire obtenue pour la dose de 0,2 µM. Cet effet est bloqué par l'utilisation des trois agents inhibiteurs du récepteur GABA_A et l'analyse statistique indique que cet effet est largement significatif (p<1e-4 avec le test Wilcoxon après comparaison 0,2 µM EHT 0202 versus 0,2 µM

EHT 0202 plus antagonistes). Les résultats correspondent aux moyennes \pm sem de sept expériences indépendantes.

Les figures 9 et 10 présentent des résultats obtenus à l'aide de l'étazolate sur les neurones corticaux en présence d'inhibiteurs de la production de sAPP α ou de son activité. Les résultats présentés montrent que l'étazolate permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur qui est inhibé par le traitement avec deux inhibiteurs des alpha secretases, le composé Furin Inhibitor I et le TAPI (Figure 9). Ces données indiquent que l'activité alpha secretase responsable de la production de sAPP α est nécessaire à la neuroprotection induite par l'étazolate.

La figure Figure 10 montre que la neuroprotection induite par l'étazolate requiert la production de sAPP α , car l'effet neuroprotecteur de l'étazolate est perdu lorsqu'un anticorps neutralisant anti-sAPP α est rajouté au milieu de culture.

La présente invention documente l'effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par le peptide amyloïde comme agissant via le récepteur GABA_A. Cet effet neuroprotecteur est associé à l'activation de la voie alpha sécrétase et à la production du sAPP α .

REVENDEICATIONS

1. Procédé de dosage immunologique de la sAPPalpha dans un échantillon, comprenant une étape de traitement thermique de l'échantillon et une étape de dosage immunologique.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'échantillon est un échantillon de sang ou dérivé de sang, ou d'autres fluides biologiques.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'étape de traitement thermique comprend un traitement de l'échantillon à une température comprise entre 60°C et 70°C environ, pendant une période de temps suffisante pour démasquer des épitopes de la sAPPalpha, typiquement pendant une période comprise entre 30 secondes et 10 minutes, environ.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'étape de dosage immunologique est réalisée au moyen d'un anticorps spécifique.
5. Utilisation d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 4, pour le dosage de la sAPPalpha dans un échantillon (dérivé) de sang humain.
6. Utilisation selon la revendication 5, pour le dosage de la sAPPalpha dans un échantillon (dérivé) de sang provenant d'un sujet humain atteint de la maladie d'Alzheimer.
7. Utilisation d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 4, pour évaluer l'efficacité d'un traitement chez un sujet humain atteint de la maladie d'Alzheimer.
8. Méthode pour évaluer ou suivre l'efficacité d'un traitement neuroprotecteur chez un mammifère, comprenant une étape de mesure in vitro ou ex vivo de la production de sAPPalpha dans un échantillon biologique du mammifère ayant reçu ledit traitement,

ledit échantillon contenant des plaquettes, la production de sAPPalpha étant une indication de l'efficacité du traitement.

9. Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce que le traitement neuroprotecteur est un composé choisi parmi les pyrazolopyridines et les agents modulateurs des récepteurs GABA (A).

10. Méthode selon la revendication 8 ou 9, caractérisée en ce que le mammifère est atteint d'une maladie neurodégénérative.

11. Méthode selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisée en ce que l'échantillon biologique est un échantillon de sang ou dérivé de sang.

12. Méthode selon l'une des revendications 8 à 11, caractérisée en ce que la production de sAPPalpha est mesurée par un test immunologique, de préférence de type ELISA.

13. Méthode selon l'une des revendications 8 à 12, caractérisée en ce que la production de sAPPalpha mesurée est comparée à un niveau de référence ou à une valeur mesurée avant le traitement, ou à un stade antérieur de traitement, chez ledit mammifère.

14. Utilisation d'un composé choisi parmi les pyrazolopyridines et les agents modulateurs des récepteurs GABA (A) pour la préparation d'un médicament pour stimuler ou induire la production de sAPPalpha par les plaquettes chez un mammifère.

15. Utilisation d'un composé choisi parmi les pyrazolopyridines et les agents modulateurs des récepteurs GABA (A) pour la préparation d'un médicament pour diminuer le risque de formation de thrombus chez un mammifère.

16. Utilisation d'un composé choisi parmi les pyrazolopyridines et les agents modulateurs des récepteurs GABA (A) pour la préparation d'un médicament pour réduire les complications vasculaires chez les patients atteints de maladies neurodégénératives.

17. Utilisation d'un composé choisi parmi les pyrazolopyridines et les agents modulateurs des récepteurs GABA (A) pour la préparation d'un médicament pour inhiber l'agrégation plaquettaire chez un mammifère, en particulier chez les patients atteints de maladies neurodégénératives.

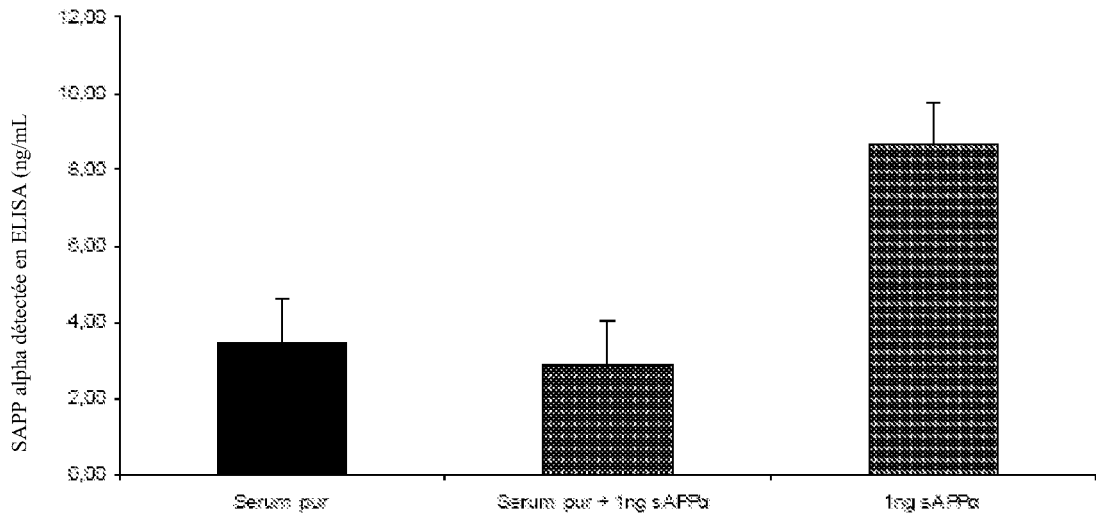


Figure 1

Effet d'un traitement thermique sur la détection du sAPPalpha en ELISA

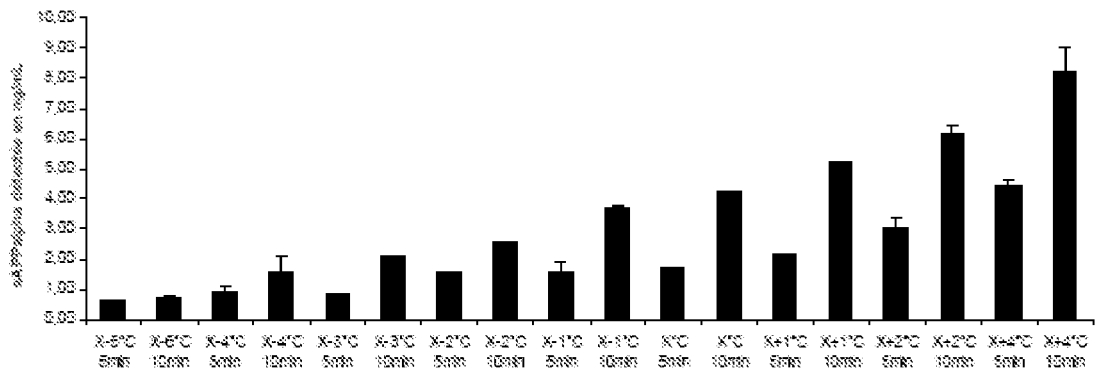


Figure 2

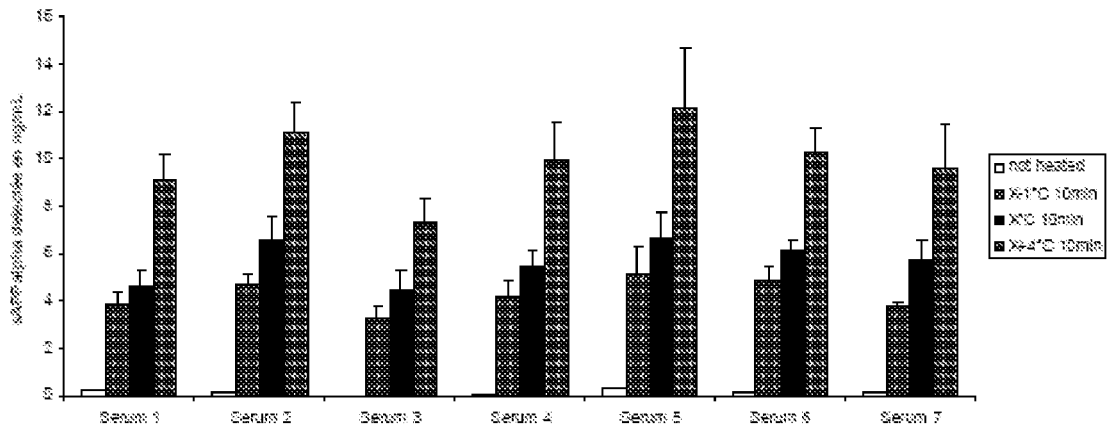


Figure 3

Détection du sAPPalpha recombinant dans du serum $y = 0,9606x + 4,069$
 $R^2 = 0,9999$

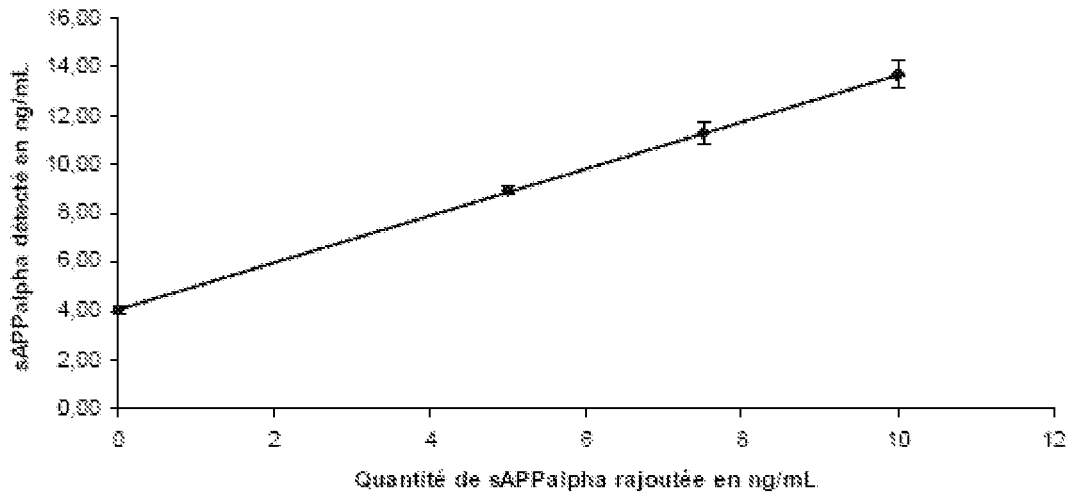


Figure 4

3/6

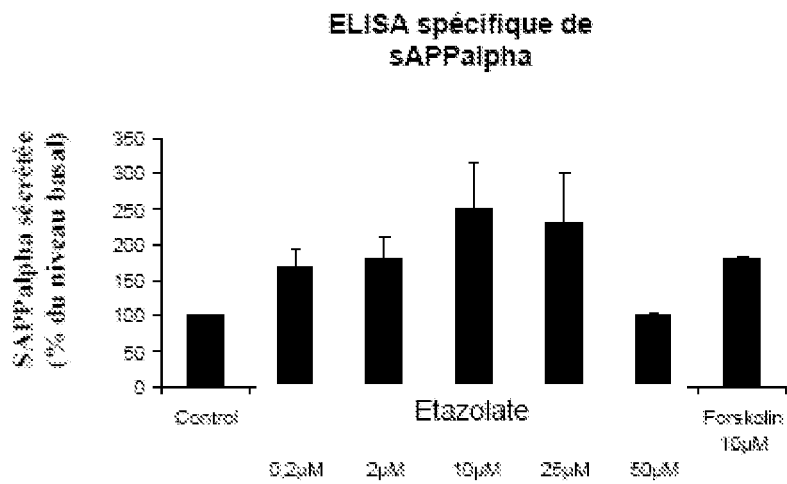


Figure 5

4/6

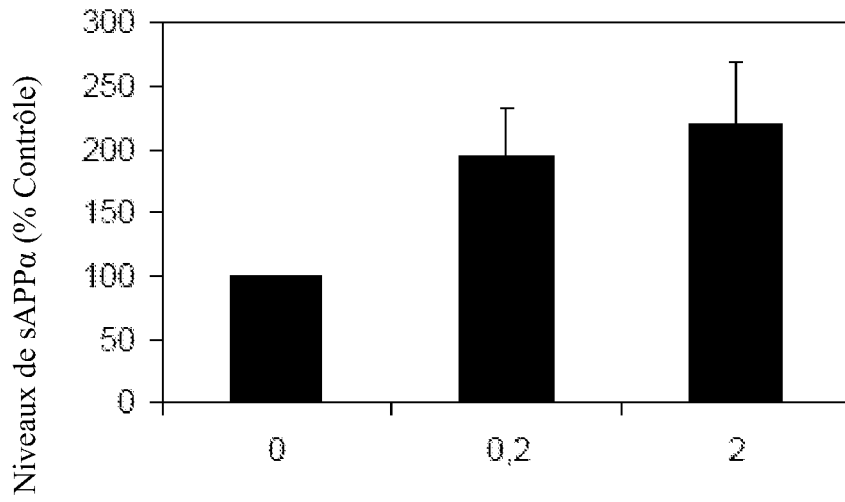


Figure 6

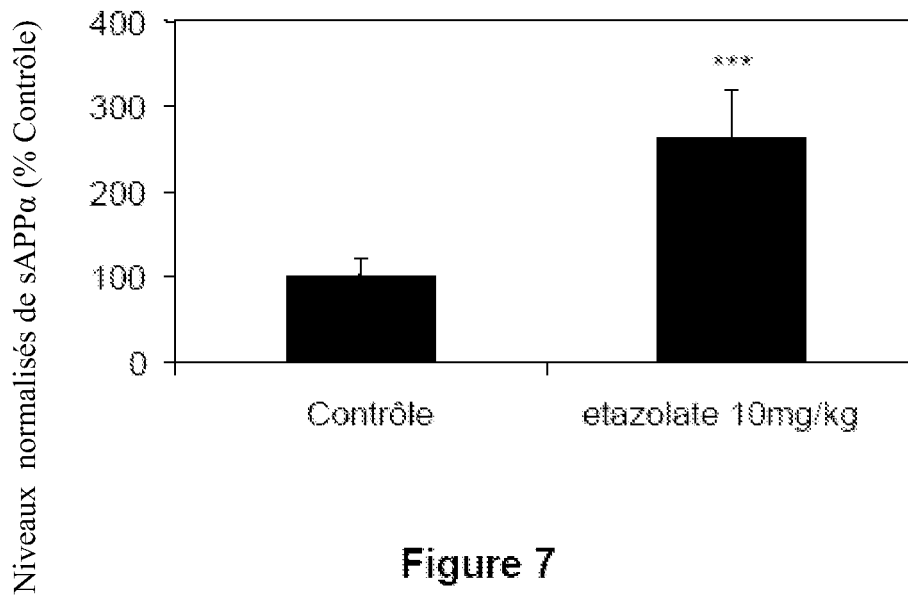


Figure 7

5/6

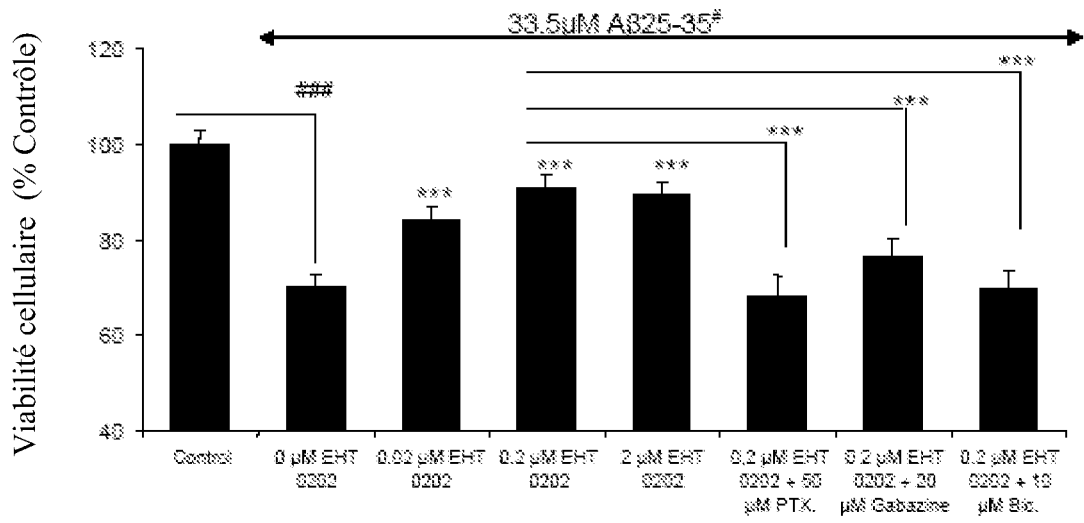


Figure 8

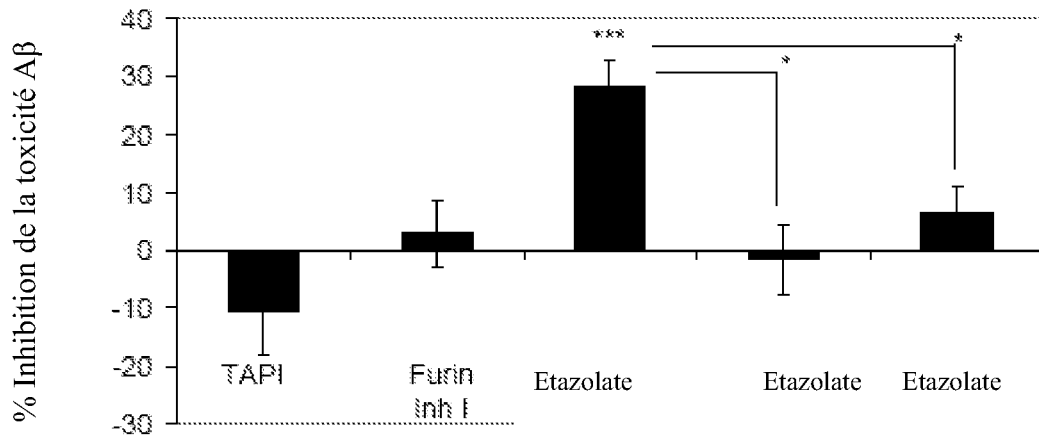


Figure 9

6/6

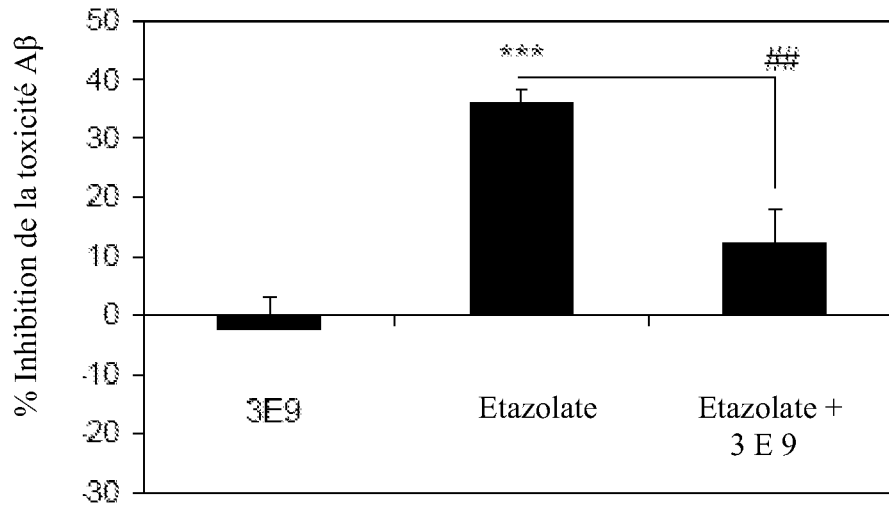


Figure 10