

(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
26 janvier 2012 (26.01.2012)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/010641 A2

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 31/155 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2011/062469

(22) Date de dépôt international :
20 juillet 2011 (20.07.2011)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1055910 20 juillet 2010 (20.07.2010) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
UNIVERSITE DE NICE SOPHIA ANTIPOLIS [FR/FR]; Grand Château Parc Valrose, 28 avenue Valrose, F-06000 Nice (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : FRELIN, Christian [FR/FR]; Les jardins de Gairaut 30 bis vieux chemin de Gairaut, F-06100 Nice (FR). VIGNE, Paul [FR/FR]; 185 chemin de la Costière, Les Terrasses, Bât. A, F-06000 Nice (FR). TAUC, Michel [FR/FR]; 14 avenue du Puits, F-06000 Nice (FR). RUBERA, Isabelle [FR/FR]; 19 boulevard Mantega-Righi, F-06100 Nice (FR). DURANTON, Christophe [FR/FR]; 6 impasse Clotilde, F-06100 Nice (FR). COUGNON, Marc [FR/FR]; 66 avenue Paul Cezanne, F-06700 Saint Laurent Du Var (FR). BLONDEAU, Nicolas [FR/FR]; 185 route de Saint Pierre de Féric, F-06000 Nice (FR).

(74) Mandataire : FAIVRE PETIT, Frédérique; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations 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 (règle 48.2.g))

— avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR INCREASING CELLULAR HYPOXIC TOLERANCE

(54) Titre : COMPOSITION PHARMACEUTIQUE POUR AUGMENTER LA TOLERANCE HYPOXIQUE CELLULAIRE

(57) Abstract : The present inventors have discovered a new class of cryoprotective therapeutic agents which make it possible for mammalian cells to survive for longer periods of time under hypoxic conditions, and to prevent problems linked to oxygen deprivation in a model of renal failure due to ischemic lesion in rats and of cardiac stroke. The present invention is therefore directed towards a pharmaceutical composition for preventing and/or treating pathological conditions resulting from hypoxic conditions and/or from ischemic lesions in a mammal, said composition comprising, as cytoprotective agent, an eIF5A-hypusination-inhibiting agent, such as, for example, N1-guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7).

(57) Abrégé : Les présents inventeurs ont découvert une nouvelle classe d'agents thérapeutiques cyto-protecteurs permettant aux cellules de mammifères de survivre plus longtemps dans des conditions hypoxiques, et de prévenir les troubles liés à la privation d'oxygène dans un modèle d'insuffisance rénale due à une lésion ischémique chez le rat et d'accident vasculaire cardiaque. La présente invention vise donc une composition pharmaceutique destinée à prévenir et/ou traiter les pathologies résultant de conditions hypoxiques et/ou de lésions ischémiques chez un mammifère, ladite composition comprenant en tant qu'agent cyto-protecteur un agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A, comme par exemple le N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7).

WO 2012/010641 A2

COMPOSITION PHARMACEUTIQUE POUR AUGMENTER LA
TOLERANCE HYPOXIQUE CELLULAIRE

La présente invention vise à améliorer les traitements existants pour soulager des patients ayant subi des lésions ischémiques et/ou des conditions d'hypoxie, en prévenant *in vivo* l'apparition des troubles résultant de la privation de l'apport d'oxygène.

L'hypoxie consiste en une oxygénation insuffisante des tissus. Elle peut survenir de plusieurs manières : d'une part lorsque l'on monte en altitude (hypoxie naturelle), d'autre part à cause d'une lésion ischémique (hypoxie pathologique).

L'hypoxie d'altitude (due au milieu naturel ambiant) est dite hypobare. C'est la diminution de pression de l'air atmosphérique (moins de 760mmHg) qui conduit à la diminution de la pression partielle de chacun des gaz qui le composent, dont le dioxygène.

Une ischémie est la diminution de l'apport sanguin artériel à un organe. Cette diminution entraîne une diminution de l'oxygénation des tissus et l'accumulation des produits du métabolisme anaérobique. Ces perturbations peuvent conduire à l'arrêt de la fonction tissulaire. L'ischémie peut avoir diverses causes :

- présence d'un caillot sanguin obstruant une artère (thrombose),
- formation d'une plaque d'athérome,
- hémorragie ou hypo perfusion empêchant certains tissus d'être correctement alimentés,
- compression d'une artère par un objet extérieur (écrasement d'un membre, garrot) ou par un phénomène interne (hématome, tumeur, ou épanchement d'un liquide).

L'ischémie peut être réversible et n'entraîner qu'une gêne limitée. Elle peut être irréversible et peut conduire à l'infarctus de l'organe, c'est-à-dire à la mort d'une partie ou de la totalité de celui-ci. Les deux cas les plus critiques sont évidemment les ischémies touchant le cerveau ou le muscle cardiaque.

L'ischémie aiguë d'un membre, consécutive à l'oblitération brutale de l'axe artériel de ce dernier, est une urgence vasculaire à pronostic vital engagé (mortalité d'environ 20 %). Elle survient le plus souvent après une thrombose ou une embolie. Il en résulte une souffrance tissulaire due à la privation d'oxygène.

5 Les mécanismes moléculaires responsables des dommages tissulaires sont bien connus. Ils comprennent en particulier :

- une acidose cellulaire et les conséquences de la dérégulation du pH intracellulaire sur l'homéostasie du sodium et du calcium intracellulaire,

- des perturbations métaboliques, dont la diminution des réserves d'ATP et
10 l'activation de l'AMP kinase,
 - la production de radicaux libres, et
 - l'apoptose selon la sévérité de l'attaque ischémique.

De nombreux développements pharmaceutiques et études cliniques ont eu pour objet la prévention des lésions ischémiques en elles-mêmes (prévention des infarctus du
15 myocarde et/ou des accidents vasculaires cérébraux), et la prise en charge par les services d'urgence des patients souffrant de ces pathologies a été nettement améliorée ces dernières années. Cependant, les affections pathologiques résultant de ces lésions, ainsi que les troubles liés au vieillissement (insuffisances cardiaques et rénales, microangiopathies cérébrales) ont peu été étudiés à ce jour, et l'industrie
20 pharmaceutique a besoin de nouvelles cibles moléculaires validées dans ce domaine. De telles cibles pourraient avantageusement augmenter la tolérance hypoxique des cellules, leur permettant de survivre plus longtemps dans des conditions hypoxiques, et ce afin de retarder les effets délétères de la privation d'oxygène dans les tissus ischémiés.

Une cible moléculaire connue pour augmenter la tolérance hypoxique des
25 cellules est la protéine induite par l'hypoxie HIF (Hypoxia Inducible Factor) et les enzymes associées HIF-prolyl hydroxylases. Des inhibiteurs de ces enzymes induisent un état de tolérance hypoxique *in vivo* et *in vitro*. L'utilisation de ces inhibiteurs chez l'homme est cependant exclue car ces molécules favorisent également le développement tumoral et la dissémination des métastases (Semenza GL et al, *Science* 2007).

30 Dans ce contexte, les présents inventeurs ont découvert une nouvelle classe d'agents thérapeutiques cyto-protecteurs permettant aux cellules de mammifères de survivre plus longtemps dans des conditions hypoxiques, et de prévenir les troubles liés

à la privation d'oxygène dans un modèle d'insuffisance rénale due à une lésion
ischémique chez le rat et dans un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris. Ces
nouveaux agents permettent de limiter les conséquences de l'hypoxie cellulaire, et de
diminuer les troubles liés à la privation d'oxygène *in vivo* chez les mammifères. Ces
5 troubles résultent le plus souvent de lésions ischémiques ou de conditions d'hypoxie. En
particulier, les agents identifiés dans la présente invention permettent de diminuer les
symptômes d'une insuffisance rénale provoquée par une ischémie rénale de 40 minutes,
et réduisent le volume de l'infarctus induit par un accident vasculaire cérébral focal.

Par ailleurs, ces agents induisent une diminution significative de la
10 consommation basale en oxygène d'un individu, sans en modifier le niveau d'activité.

RÉSUMÉ DE L'INVENTION

La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique pour son
utilisation pour prévenir et/ou traiter les pathologies résultant de conditions hypoxiques
15 et/ou ischémiques chez un mammifère, ladite composition comprenant en tant qu'agent
cyto-protecteur un agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A. Selon un aspect plus
spécifique de l'invention, lesdites pathologies sont choisies parmi : l'insuffisance rénale
due à une lésion ischémique, l'insuffisance cardiaque due à un infarctus, les séquelles
neurologiques dues à un accident vasculaire cérébral, les microangiopathies
20 périphériques et centrales, ou les dérèglements d'un organe tel que le foie, l'intestin, le
cœur, le poumon ou le rein suite à sa transplantation.

Les inventeurs ont montré en particulier que la composition pharmaceutique de
l'invention peut être utilisée pour augmenter la tolérance hypoxique des cellules de
mammifère soumises à une lésion ischémique ou à des conditions hypoxiques.

25 De préférence, ledit agent inhibiteur de l'hypusinylation selon l'invention inhibe
la synthèse de l'hypusine. En particulier, ledit agent inhibiteur de l'hypusinylation
inhibe la désoxyhypusine synthase (DHS) ou la désoxyhypusine hydroxylase (DHH).
Encore plus particulièrement, ledit agent inhibiteur de l'hypusinylation est choisi parmi
les dérivés du 1,7-diaminoheptane (DAH) tels que le N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane
30 (GC7), ou choisi parmi le 1,3 diazacyclohexane et le 1,3 diazacyclo-1-hexene, et est de
préférence le N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7).

De façon encore plus préférée, ladite invention a pour objet une composition pharmaceutique qui peut être utilisée pour prévenir et/ou traiter l'insuffisance rénale due à une lésion ischémique et diminuer les conséquences d'un accident vasculaire cérébral, ladite composition comprenant, en tant qu'agent cyto-protecteur, un agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A, de préférence le N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7).

La composition de l'invention peut également être utilisée pour diminuer la consommation en oxygène d'un individu.

LÉGENDES DES FIGURES

La **figure 1** décrit le modèle d'ischémie rénale par arrêt momentané du flot artériel et utilisé pour démontrer les effets du GC7 sur l'hypoxie/ischémie. L'artère rénale gauche de rats anesthésiés est maintenue ligaturée pendant 40 minutes avant d'être relâchée. Préalablement à l'acte chirurgical les rats ont été traités par voie intrapéritonéale soit avec du placebo (NaCl 0,9 %) soit avec du GC7 (1 injection IP par jour pendant 3 jours à 3 mg/kg). Les paramètres de la fonction rénale ont été analysés 24 heures après la restauration du flux artériel.

La **figure 2** représente le dosage du marqueur d'atteinte tissulaire NGAL (Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin) dans les urines totales avant et 24 heures après l'application du protocole d'ischémie / reperfusion (figure 1) sur l'artère rénale gauche, chez des rats contrôles (barres blanches) ou traités par du GC7 3 mg/kg en intra péritonéal, pendant 3 jours, (barres grises). Les valeurs de NGAL sont classiquement rapportées à la créatinine urinaire. Les moyennes sont représentées ($\pm$ sem) et le nombre d'animaux utilisés est indiqué (entre parenthèses). ** = $P < 0.01$ avec le test « t » de Student. Le GC7 protège l'intégrité tissulaire rénale altérée par l'ischémie reperfusion.

La **figure 3** représente le NGAL plasmatique (Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin) dosé 24 heures après l'application du protocole d'ischémie / reperfusion (figure 1) sur l'artère rénale gauche chez des rats contrôles (barre blanche) ou traités par du GC7 3 mg/kg en intra péritonéal, pendant 3 jours avant la ligature, (barre grise). Les moyennes sont représentées ($\pm$ sem) et le nombre d'animaux utilisés est indiqué (entre parenthèses). * = $P < 0.05$ avec le test « t » de Student.

La **figure 4** représente les excrétions fractionnelles (en % du glucose filtré) urinaires de glucose des reins droit (barres blanches) et gauche (barres grises) mesurées 24 heures après l'application du protocole d'ischémie / reperfusion (figure 1) sur l'artère rénale gauche chez des rats contrôles ou traités par du GC7 (3 mg/kg en intra-péritonéal, pendant 3 jours). Les moyennes sont représentées ($\pm$ sem) et le nombre d'animaux utilisés est indiqué (n). * = $P < 0.05$ avec le test « t » de Student. Le GC7 protège la fonction de réabsorption rénale du glucose altérée par l'hypoxie/ischémie.

La **figure 5** est un graphique représentant les excrétions fractionnelles (en % de la quantité de sodium et de phosphate filtré) urinaires de sodium (A) et de phosphate (B) des reins droit (barres blanches) et gauche (barres grises) mesurées 24 heures après l'application du protocole d'ischémie / reperfusion (figure 1) sur l'artère rénale gauche chez des rats contrôles ou traités par du GC7 (3 mg/kg intra péritonéal, pendant 3 jours avant la ligature). Les moyennes sont représentées ($\pm$ sem) et le nombre d'animaux utilisés est indiqué (entre parenthèses). * = $P < 0.05$ avec le test « t » de Student. Le GC7 protège les fonctions de réabsorption rénale de sodium et de phosphate altérée par l'hypoxie/ischémie.

La **figure 6** décrit le taux d'eIF5A hypusinylé (en % par rapport à eIF5a total) est déterminé sur des extraits de reins, provenant d'animaux traités ou non avec le GC7, par western blot (6A) à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés respectivement contre les formes hypusinylées (eIF5a hyp) ou totales (eIF5a tot) de eIF5A. L'analyse densitométrique en unité arbitraire des gels (6B) est réalisée avant (barre blanche) et après traitement par le GC7 (barre grise). Afin de vérifier la quantité totale de protéines déposées par piste (80 μ g), un anticorps dirigé contre la β -actine a été utilisé (actine). Les moyennes et déviations standards provenant de 4 animaux dans chaque catégorie, sont indiquées (**: $p < 0.01$, test « t » de Student). Le GC7 induit bien *in vivo* une inhibition de l'hypusinylation de eIF5a.

La **figure 7** est un graphique représentant le rapport phosphate / créatinine dans les urines de souris ayant subi des conditions de normoxie ou d'hypoxie avec (barres grises) ou sans (barres blanches) prétraitement avec du GC7. Les souris prétraitées quotidiennement (3 jours) ou non avec du GC7 à 3 mg/kg sont maintenues en normoxie (21 % d'oxygène) ou en en hypoxie (8 % d'oxygène) pendant 24 heures. Les urines

recueillies à t=24 heures sont analysées pour leur contenu en phosphate et en créatinine. Le GC7 protège de la perte de phosphate induite par l'hypoxie

La **figure 8** est un graphique représentant la consommation d'oxygène (8A), le contenu en ATP intracellulaire (8B) la consommation de glucose (8C) et et la
5 production de lactate (8D) de cellules épithéliales d'origine rénale (tubule proximal) traitées (barres grises) ou non (barres blanches) avec du GC-7 à 30 μ M. Les mesures sont réalisées 24 heures après le début du traitement au GC7. Le GC7 induit un "shift" métabolique vers la glycolyse anaérobie permettant aux cellules de s'affranchir de l'oxygène tout en conservant ses capacités de synthèse d'ATP.

10 La **figure 9** est un graphique représentant la consommation basale en oxygène de souris mâles (A) ou femelles (B) injectées avec le placebo (NaCl 0,9 %, barres blanches) ou avec du GC-7 (barres grises) à 3 mg/kg en IP (1 injection par jour pendant les 3 jours précédant la mesure). Les souris sont maintenues dans une enceinte fermée d'un volume de 500 cm³ et contenant un système de captage du CO₂ expiré à base
15 d'hydroxyde de baryum. La teneur en O₂ est mesurée toutes les 5 minutes avec un oxymètre oxybaby® (Witt). Les valeurs sont exprimées en ml d'oxygène consommés par heure et par gramme de poids corporel. Les moyennes sont représentées ($\pm$ sem) et le nombre d'animaux utilisés est indiqué (n). * = P < 0.05 avec le test « t » de Student.

La **figure 10** représente la quantification des neurones viables dans des cultures
20 primaires de neurone corticaux de souris traitées ou non avec du GC-7, ayant subi (ou non) une privation d'oxygène et de glucose (OGD) pendant 60 minutes. Ce modèle *in vitro* de privation concomitante d'oxygène et de glucose est décrit comme reproduisant au mieux les effets de l'ischémie observés pendant l'AVC. La privation de glucose est totale et hypoxie de l'ordre de 75 % (passage de 5 % oxygène dans le milieu de culture
25 à 1,2 %).

La **figure 11** représente le volume de l'infarctus cérébrale (en mm³) de souris ayant subi un AVC avec ou sans prétraitement avec le GC-7. La lésion ischémique est quantifiée par une analyse histomorphométrique sur coupes coronales selon 12 niveaux stéréotaxiques définis. Le volume de l'infarctus est calculé par une intégration
30 mathématique des surfaces des lésions mesurées par imagerie informatique, avec introduction d'un facteur correctif de l'œdème cérébral.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

Les agents thérapeutiques identifiés par les inventeurs sont des molécules connues pour inhiber une modification post-traductionnelle appelée l'hypusinylation. En particulier, ces molécules d'intérêt inhibent l'hypusinylation du facteur d'initiation de la traduction eIF5A (SEQ ID NOs : 1, 3 et 4, isoformes A1 chez l'homme, la souris et le rat, respectivement ; SEQ ID NOs : 5, 6 et 7, isoformes A2 chez l'homme, la souris et le rat ; SEQ ID NO : 2, isoforme B chez l'homme).

L'hypusinylation est une modification post-traductionnelle qui résulte de l'addition d'un résidu 4 aminobutyl (provenant de la spermidine) sur un résidu Lys. La protéine eIF5A est la seule protéine connue à ce jour pour être hypusinylée (Park M.H. et al, *J. Biochem.* 2006). Cette protéine est un facteur d'initiation de la traduction eucaryote dont la structure est très conservée entre la levure et l'homme. La formation d'hypusine est généralement connue pour rendre la protéine eIF5A fonctionnelle, et contribue à la prolifération cellulaire, de sorte qu'elle est associée à différentes formes de cancers. L'inhibition de l'hypusinylation d'eIF5A est donc connue pour ses propriétés antiapoptotiques et cytostatiques, favorisant un état quiescent des cellules en bloquant les cellules en phase G1/S (Balabanov S et al, *Blood* 2007 ; Jasiulionis M.G. et al, *Cell Biochem. Funct.* 2007).

Plusieurs isoformes de eIF5A ont été découvertes : parmi elles, eIF5A1 (SEQ ID NO 1 à 4 chez l'homme, la souris et le rat) serait exprimée spécifiquement en réponse à l'induction d'une apoptose, induite par un inhibiteur du protéasome, le MG132, une autre (appelée eIF5A2, SEQ ID NO 5 à 7 pour l'homme, la souris et le rat) serait vraisemblablement impliquée dans la traduction et la prolifération cellulaire (Park M.H. et al, *Amino Acids* 2010).

La protéine eIF5A1 est présentée comme une protéine spécifique de l'apoptose, ayant des propriétés pro-apoptotiques que l'on peut utiliser pour induire l'apoptose cellulaire, notamment celle des cellules tumorales (voir EP1959010 par exemple). La forme non-hypusinylée d'eIF5A1 est active dans l'apoptose. L'inhibition de l'hypusinylation d'eIF5A1 est donc généralement associée à un effet pro-apoptotique (Sun Z, *J. Cell Physiol* 2010).

Par ailleurs, WO 2009/144933 propose d'utiliser des inhibiteurs de la forme sécrétée d'eIF5A pour diagnostiquer ou traiter l'athérosclérose induite par le stress oxydatif ou par une lésion ischémique.

Par ailleurs, à l'inverse, il est généralement admis que c'est la forme hypusinylée
5 des isoformes d'eIF5A qui est impliquée dans la prolifération cellulaire. Dans ce cas, l'inhibition de l'hypusinylation bloque le cycle cellulaire et induit l'apoptose dans de nombreuses cellules tumorales (d'où son utilisation comme agent cytostatique) (Taylor CA, *Exp Cell Res* 2007 ; Li AL, *J. Biol. Chem.* 2004). De la même façon, Huang Y et al ont démontré que l'inhibition de l'hypusinylation d'eIF5A bloque la croissance des
10 neurites et réduit de façon significative la survie des neurones de mammifère.

Si eIF5A a été initialement décrite comme étant un facteur d'initiation de la traduction, son inactivation n'est pas réellement associée à une diminution de la synthèse protéique, et un rôle plus complexe de transport nucléocytoplasmique des ARN messagers a également été suggéré (Park et al, *Amino Acids*, 2010).

15 Deux enzymes, la désoxyhypusine synthase DHS (EC n° 2.5.1.46 ; SEQ ID NO : 8 à 10 pour l'homme (isoformes A, B, et C), SEQ ID NO : 11 chez la souris, et SEQ ID NO : 12 chez le rat) et la désoxyhypusine hydroxylase DHH (EC N° 1.14.99.29 ; SEQ ID NO : 13 pour l'homme, SEQ ID NO : 14 chez la souris, et SEQ ID NO : 15 chez le rat) sont nécessaires à l'hypusinylation d'eIF5A. D'autres enzymes y contribuent par
20 ailleurs : ce sont les enzymes responsables de la synthèse des polyamines, dont en particulier la spermidine, qui est transformée en hypusine par la DHS et la DHH. Ces enzymes sont : l'ornithine décarboxylase (ODC), la spermine synthase, la spermidine synthase, la spermidine/spermine acétyltransférase (SSAT) et la polyamine oxydase, et la S-adénosyl-L-méthionine décarboxylase.

25 Des inhibiteurs de l'hypusinylation d'eIF5A ont été identifiés. Les plus connus sont le DFMO (R,S)-2-(difluorométhyl)ornithine) ou α -difluorométhylornithine (CAS 70052-12-9), un inhibiteur spécifique de l'ornithine décarboxylase et le GC7 (N1-guanyl-1,7 diaminoheptane), un inhibiteur de la désoxyhypusine synthase DHS (CAS 150333-69-0). De nombreux inhibiteurs de l'enzyme DHS ont par ailleurs été testés et
30 caractérisés (Lee Y.B. et Folk J.E., 1998). Ces inhibiteurs sont utilisés comme de puissants agents cytostatiques, et ont été proposés pour inhiber les pathologies cancéreuses ainsi que d'autres indications infectieuses (VIH, malaria, leishmaniose)

(Jasiulionis M.G. et al, *Cell Biochem. Funct.* 2007, Kersher B et al, *Amino Acids* 2010). Certaines études suggèrent un effet pro-apoptotique propre du GC7 et d'autres inhibiteurs de DHS (cf. EP1959010, Sun Z, *J. Cell Physiol* 2010). Ainsi, l'hypusinylation d'eIF5A est considérée comme une cible potentielle dans le traitement de cancers et d'autres
5 maladies infectieuses (VIH, malaria, leishmaniose).

Par ailleurs, WO 2003/106433 propose d'inhiber l'hypusinylation d'eIF5A afin de limiter les réactions immunitaires qui sont souvent induites lors de la transplantation d'organes. D'autre part, WO 2010/118224 mentionne que l'administration d'agents inhibant l'hypusinylation d'eIF5A permet de prévenir la dégradation des ilots
10 pancréatiques, de diminuer le taux de glucose dans le sang et d'éviter la résistance à l'insuline chez des patients diabétiques.

Cependant, le lien entre cette hypusinylation et la tolérance hypoxique n'a jamais été identifié chez un mammifère.

Des études récentes sur les mécanismes impliqués dans les mécanismes de
15 tolérance à l'hypoxie ont été réalisées sur des mouches de l'espèce *Drosophila* (Vigne P, et al, *Mech Ageing Dev* 2007 et Vigne P. et al, *BMC Physiology* 2008). Ces études démontrent que le sucrose augmente la survie des Drosophiles placées en conditions d'hypoxie chronique (5% d'O₂). A l'inverse, les acides aminés naturels (notamment L-proline, L-arginine, L-glutamine, et L-asparagine), les acides aminés du cycle de l'urée
20 (L-citrulline, L-ornithine) et les polyamines (putrescine, spermine, et spermidine) réduisent la survie des mouches hypoxiées et nourries par une solution de sucrose. Les acides aminés du régime alimentaire sont bénéfiques dans des conditions normales d'oxygénation (21% d'O₂). Vigne et al. ont démontré en 2008 que l'inhibiteur spécifique de l'hypusinylation d'eIF5A, GC7, est capable de diminuer l'effet toxique
25 des acides aminés et des polyamines cités ci-dessus. En l'absence d'acides aminés, le traitement des mouches avec du GC7 diminue leur longévité dans des conditions d'hypoxie, suggérant que le GC7 a un effet délétère sur les cellules hypoxiées. En d'autres termes, selon cette étude, en l'absence d'acides aminés ou de polyamines, le traitement au GC7 induit une diminution de la tolérance hypoxique chez la Drosophile.
30 En revanche, dans des conditions hypoxiques et en présence d'acides aminés, le GC7 augmente la tolérance hypoxique des drosophiles.

Dans un premier aspect, la présente invention concerne une composition pharmaceutique pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter les troubles liés à des conditions hypoxiques et/ou à des lésions ischémiques chez un mammifère, ladite composition comprenant, en tant qu'agent cyto-protecteur, un agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A.

En d'autres termes, la présente invention vise l'utilisation d'une composition pharmaceutique comprenant, en tant qu'agent cyto-protecteur, un agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A, pour la fabrication d'un médicament destiné à prévenir et/ou traiter les troubles liés à des conditions hypoxiques et/ou à des lésions ischémiques chez le mammifère.

La composition pharmaceutique de l'invention comprend, outre l'agent cyto-protecteur, au moins un excipient acceptable sur le plan pharmaceutique.

Plus précisément, la présente invention vise un agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter les troubles liés à des conditions hypoxiques et/ou à des lésions ischémiques chez un mammifère, ou encore l'utilisation d'un agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A, pour la fabrication d'un médicament destiné à prévenir et/ou traiter les troubles liés à des conditions hypoxiques et/ou à des lésions ischémiques chez un mammifère.

Enfin, la présente invention vise aussi une méthode de prévention et/ou de traitement de troubles liés à des conditions hypoxiques et/ou à des lésions ischémiques chez un individu qui en souffre, comprenant l'étape d'administrer une composition pharmaceutique comprenant, en tant qu'agent cyto-protecteur, un agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A, et un excipient acceptable sur le plan pharmaceutique.

De préférence, dans le cadre de la présente invention, ledit agent inhibiteur de l'hypusinylation inhibe la synthèse de l'hypusine.

L'hypusine (N^ε-(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine) est un acide aminé unique qui n'intervient que pour la modification d'eIF5A, que ce soit chez les mammifères ou chez la Drosophile. Il est formé en deux temps. D'abord, l'enzyme DHS transfère le groupe 4-aminobutyl de la spermidine sur le groupe ε du résidu lysine de la protéine eIF5A inactive. Puis DHH effectue l'hydroxylation de la protéine eIF5A-désoxyhypusine en eIF5A-hypusine qui est la forme active d'eIF5A (Park MH et al, *Amino Acids* 2010).

Ainsi, dans un mode de réalisation préféré, l'agent inhibiteur de l'hypusinylation inhibe la désoxyhypusine synthase (DHS) ou la désoxyhypusine hydroxylase (DHH).

Dans le cadre de la présente invention, cet agent inhibiteur de l'hypusinylation peut être choisi parmi les dérivés du 1,7-diaminoheptane (DAH ; CAS 646-19-5) tels que le N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7) (CAS 150333-69-0), le 1,3 diazacyclohexane (CAS 505-21-5) et le 1,3 diazacyclo-1-hexene (CAS 25377-66-6), le (R,S)-2-(difluorométhyl)ornithine (DFMO ; CAS 70052-12-9), la trans-4-methylcyclohexylamine (CAS 2523-55-9), la N-(3-aminopropyl)cyclohexylamine (CAS 3312-60-5), et est de préférence le N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7).

Plus généralement, l'agent inhibiteur de l'hypusinylation est choisi parmi les dérivés du 1,7-diaminoheptane, les dérivés du 1,3 diazacyclohexane (CAS 505-21-5) et les dérivés du 1,3 diazacyclo-1-hexene (CAS 25377-66-6).

De manière préférée, l'agent inhibiteur de l'hypusinylation est choisi parmi les dérivés du 1,7-diaminoheptane, le 1,3 diazacyclohexane et le 1,3 diazacyclo-1-hexene.

Les dérivés du 1,7 diaminoheptane (C_7) sont avantageusement des dérivés branchés comme le N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7), le GC7G, le GC6, le GC8, le GC6G, le GC8G, le CN1-1493 (ou semapimod, N,N'-bis[3,5-bis[N-(diaminomethylideneamino)-C-methylcarbonimidoyl]phenyl]decanediamide tetrahydrochloride) ou encore les composés 25b (1,7-diaminooctane, $C_8H_{20}N_2$), 26b (1,7-diguanidinooctane, $C_{10}H_{24}N_6$), 26c (1,7-diguanidinononane, $C_{11}H_{26}N_6$) et le 7-amino-1-guanidino-octane (composé 39, $C_9H_{22}N_4$) décrits dans Lee et Folk (1998).

Les dérivés du 1,7 diaminoheptane (C_7) peuvent être également des dérivés insaturés comme les composés décrits dans Lee et Folk (1998): 19a (1,7-diguanidinohept-3-yne, $C_7H_{14}N_2$), 22a (1,7-diaminohept-3-yne, $C_9H_{18}N_6$), 1,7-diamino-trans-hept-3-ene (composé 20a, $C_7H_{16}N_2$), ou 23 (1,7-diguanidinohept-3-ène, $C_9H_{20}N_6$).

De manière préférée entre toutes, l'agent inhibiteur de l'hypusinylation est le N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7).

Dans le cadre de la présente invention, les conditions « hypoxiques » résultent soit d'une lésion ischémique (hypoxie pathologique), soit lorsque l'on monte en altitude ou lorsqu'on pratique la plongée sous-marine (hypoxie naturelle).

De préférence, la composition pharmaceutique est utilisée pour prévenir l'apparition de troubles liés à l'occurrence d'une lésion ischémique ou d'une hypoxie, plus précisément des troubles résultant de la survenue d'une lésion ischémique ou d'une hypoxie affectant un organe, un tissu ou des cellules. Ces troubles sont, par exemple, l'insuffisance rénale ou la nécrose corticale (due à une lésion ischémique ou à des conditions hypoxiques), l'insuffisance cardiaque (due à un infarctus), les séquelles neurologiques résultant de la mort de neurones ou de la réduction de leur fonctionnement (dus à un accident vasculaire cérébral ou à un traumatisme), ou les dérèglements d'organes ou les dommages tissulaires affectant le foie, l'intestin, le cœur, le poumon ou le rein ou tout autre organe suite à leur transplantation, à l'alpinisme, aux activités aéronautiques ou à la plongée sous-marine.

Ainsi, de manière préférée, la composition de l'invention – ou l'agent inhibiteur de l'hypusinylation de l'invention - est utilisé(e) pour prévenir et/ou traiter les pathologies résultant de conditions hypoxiques et/ou de lésions ischémiques, par exemple choisies parmi : l'insuffisance rénale due à une lésion ischémique ou à des conditions hypoxiques, l'insuffisance cardiaque due à un infarctus, les séquelles neurologiques dues à un accident vasculaire cérébral ou à un traumatisme, ou les dérèglements d'un organe tel que le foie, l'intestin, le cœur, le poumon ou le rein suite à sa transplantation.

Les présents inventeurs ont démontré que les agents inhibiteurs de l'hypusinylation décrits précédemment permettent d'augmenter la tolérance hypoxique de différents types cellulaires, i.e. d'augmenter leur résistance à une privation d'oxygène. En d'autres termes, les cellules (ou tissus) qui subissent une privation d'oxygène (due à une lésion ischémique ou à la survenue de conditions hypoxiques) sont moins affectées (donc plus fonctionnelles) lorsqu'elles ont été traitées au préalable avec ces inhibiteurs.

La composition pharmaceutique de l'invention – ou l'agent inhibiteur de l'hypusinylation de l'invention - peut donc être utilisé(e) pour améliorer la rémission des patients ayant subi une lésion ischémique, ou ayant été en conditions hypoxiques (plongée, alpinisme) pendant un certain temps. Elle est ainsi parfaitement indiquée dans le traitement de toute pathologie susceptible d'induire des lésions ischémiques afin d'en réduire les conséquences néfastes. Elle est également parfaitement indiquée lors

d'activités physiques susceptibles d'induire des conditions hypoxiques telles que l'aéronautisme, l'alpinisme ou la plongée, afin d'en réduire les conséquences néfastes.

Plus particulièrement, la composition pharmaceutique de l'invention peut être utilisée pour prévenir et/ou traiter les dérèglements d'un organe ayant subi une hypoxie, de préférence pendant une durée d'au moins 2 minutes, et de manière encore plus préférée d'au moins 5 minutes.

Au sens de la présente invention, « les conditions d'hypoxie » susceptibles d'affecter une cellule, un tissu, un organe ou un individu sont telles que le taux d'oxygène apporté auxdits cellule, tissu, ou organe (notamment par voie sanguine) est diminué de 30 %, de préférence de 50 %, de manière encore plus préférée de 80 % voire de 100 % par rapport à une situation normale *in vivo*. La diminution de ce taux d'oxygène peut être mesurée facilement en déterminant le taux d'oxygène présent dans le sang de l'individu (et en le comparant à des valeurs standards), ou le nombre de vaisseaux sanguins fonctionnels irriguant l'organe visé (en le comparant à des données standards).

De manière préférée entre toutes, une « hypoxie » désigne une situation dans laquelle une cellule, un tissu, un organe ou un individu est complètement privé d'oxygène (par exemple lors d'une coupure de la circulation sanguine ou en milieu non aéré, par exemple en milieu sous-marin ou supra-atmosphérique), et ce pendant au moins 5 minutes, de préférence au moins 10 minutes, de manière préférée entre toutes au moins 15 minutes.

On entend par « dérèglements d'un organe ayant subi une hypoxie ou ischémie » les mécanismes moléculaires induit par l'hypoxie et l'ischémie connus de l'homme du métier ainsi que les conséquences, ou séquelles, de ces mécanismes moléculaires sur l'état général de l'organe (dommages tissulaires, dysfonctionnements). A titre d'exemples de séquelles/dérèglements, on peut citer encore une fois l'insuffisance rénale ou la nécrose corticale, l'insuffisance cardiaque, les séquelles neurologiques résultant de la nécrose des neurones ou de la réduction de leur fonctionnement, ou les dérèglements d'organes ou les dommages tissulaires affectant le foie, l'intestin, le cœur, le poumon ou le rein ou tout autre organe suite à leur transplantation, à l'alpinisme, aux activités aéronautiques ou à la plongée sous-marine. Ainsi, de manière préférée, la composition de l'invention – ou l'agent inhibiteur de l'hypusinylation de l'invention -

est utilisé(e) pour traiter les pathologies induisant des conditions hypoxiques et/ou des lésions ischémiques, par exemple choisies parmi : l'accident vasculaire cérébral, trauma, l'arrêt cardiaque, la fibrillation auriculaire, les angiopathies, les microangiopathies périphériques et centrales, les thromboses, les infarctus ou encore les embolies pulmonaires.

Les résultats fournis dans la présente demande démontrent la protection induite par le GC7 contre les séquelles d'une hypoxie/ischémie sur le rein et contre les séquelles d'un accident vasculaire cérébral. Ces résultats peuvent être raisonnablement étendus à d'autres organes susceptibles de subir une lésion ischémique ou hypoxique ou susceptible d'être transplanté, puisque tout organe est en souffrance dès que l'apport en oxygène diminue avec des conséquences fonctionnelles plus ou moins graves. Les organes tels que le cœur, le cerveau et le rein sont les plus sensibles en raison de leur incapacité à se régénérer en cas de stress hypoxique/ischémique. L'administration de GC7 ou plus largement de l'inhibiteur de la déoxyhypusine synthase (DHS), permet à l'organe de mieux résister à la privation d'oxygène, et celui-ci verra donc ses fonctions physiologiques préservées, améliorant son fonctionnement ultérieur.

En effet, lors de la transplantation d'organes comme le foie, les intestins, le cœur ou les poumons, ces organes sont transportés parfois sur une certaine distance et pendant un temps plus ou moins long. Classiquement, les greffons sont conservés 4°C dans des solutions appropriées à chaque organe.

La durée d'ischémie froide (DIF) des organes prélevés est le délai pendant lequel le greffon est réfrigéré. Il a été montré que le risque d'échec de la greffe augmente avec l'augmentation de la DIF.

La lésion ischémique ne doit généralement pas dépasser quelques heures, sous peine de séquelles irréversibles.

Dans un mode de réalisation particulier, la composition pharmaceutique de l'invention peut donc être utilisée pour augmenter la tolérance hypoxique des cellules de mammifère soumises à une lésion ischémique ou à des conditions hypoxiques.

Notamment, en ce qui concerne le don d'organe, la composition pharmaceutique de l'invention permet d'augmenter le temps limite d'attente de l'organe avant sa réoxygénation dans les tissus de l'individu transplanté (le DIF), avant que des séquelles n'apparaissent.

Dans un mode de réalisation particulier, la composition pharmaceutique de l'invention est donc utilisée pour prévenir et/ou traiter les dérèglements des organes suite à leur transplantation. Plus précisément, la composition pharmaceutique de l'invention est utilisée pour améliorer la résistance de l'organe et pour limiter les dommages cellulaires et tissulaires dans l'organe pendant les différentes étapes de sa transplantation. Elle permet donc d'améliorer les fonctions de l'organe une fois après sa transplantation et la rémission du patient qui a subi la greffe. Elle peut donc également être utilisée pour traiter des patients ayant subi une greffe d'organe.

Dans un mode de réalisation préféré, l'agent inhibiteur de l'hypusinylation est présent dans le liquide de conservation des organes avant la transplantation dans l'individu hôte. Ainsi, les cellules sont protégées pendant le temps où l'oxygène leur fait défaut. La présente invention vise donc également l'utilisation de l'agent inhibiteur de l'hypusinylation décrit précédemment comme agent cytoprotecteur utilisé dans un liquide de conservation des organes, ainsi qu'un liquide pour la conservation des organes *ex vivo* contenant l'agent inhibiteur de l'hypusinylation décrit précédemment.

Les liquides de conservation d'organes sont bien connus de l'homme du métier, et l'agent cyto-protecteur de l'invention pourra donc être ajouté à n'importe lequel d'entre eux.

Il est également possible d'administrer l'agent inhibiteur de l'hypusinylation ou la composition pharmaceutique de l'invention chez l'individu à qui l'organe va être prélevé, afin d'en imprégner l'organe avant qu'il ne soit coupé de la circulation sanguine.

De manière préférée entre toutes, dans ce mode de réalisation particulier, la composition de l'invention comprend, en tant qu'agent cyto-protecteur, le N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7).

Les résultats présentés dans la présente demande démontrent également que le prétraitement de neurones *in vitro* au GC7 entraîne une augmentation de leur survie de plus de 30% dans des conditions hypoxiques. Cet effet protecteur du GC7 sur les neurones a été confirmé *in vivo* sur des animaux ayant subi un AVC : le volume de l'infarctus chez les animaux traités au GC7 est bien moindre par rapport aux animaux contrôles. Ces expériences démontrent clairement un effet protecteur du GC7 sur les neurones contre les phénomènes hypoxiques et ischémiques.

La composition de l'invention permet donc également de prévenir les séquelles neurologiques dues à une lésion ischémique ou hypoxique, par exemple dues à un accident vasculaire cérébral ou à un traumatisme. Par « séquelles », on entend à la fois les dommages faits aux neurones de manière directe et/ou indirecte (par exemple, 5 nécrose des neurones, réduction de leur fonctionnement) et leurs conséquences sur l'individu et sa physiologie, à court, moyen et long terme (par exemple la survenue de la maladie d'Alzheimer, d'une dépression post-AVC, ou encore la réduction des facultés mentales et motrices). La composition de l'invention permet donc de prévenir la formation de lésions cellulaires et/ou tissulaires au niveau du cerveau, et donc de 10 diminuer voir d'empêcher l'apparition de séquelles fonctionnelles, motrices et mentales (dépression post-AVC ou maladie d'Alzheimer par exemple) dues à la privation en oxygène des neurones du patient.

La composition de l'invention est également utile pour traiter toute pathologie susceptible d'induire une réduction et/ou une privation d'oxygène sur les cellules 15 neuronales, notamment pour traiter les pathologies d'origine purement neurologique (neuropathologies), ou neuro- ou cérébro-vasculaire (type AVC et angiopathie).

Dans un mode de réalisation particulier, la composition pharmaceutique de l'invention est utilisée pour prévenir et/ou traiter l'insuffisance cardiaque due à un infarctus chez un animal. Plus précisément, la composition pharmaceutique de 20 l'invention est utilisée pour prévenir l'insuffisance cardiaque ou tout autre trouble ou dommage dus à un infarctus. Elle peut donc également être utilisée pour traiter des patients ayant subi un infarctus.

De préférence, dans ce mode de réalisation particulier, la composition comprend alors, en tant qu'agent cyto-protecteur, le N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7).

25 Enfin, la composition de l'invention permet de diminuer de façon significative la consommation basale en oxygène des animaux traités. De façon surprenante, cette diminution de consommation en oxygène ne s'accompagne pas d'une diminution du niveau d'activité des animaux traités.

La composition de l'invention peut donc être utilisée dans toute activité où 30 l'apport en oxygène est limitant, par exemple pour les activités en altitude (secourisme, alpinisme, activités aériennes, etc.), ou encore pour les activités sous-marines (plongée).

Cette découverte est importante puisqu'il n'existe aucun autre moyen à ce jour de limiter la consommation d'oxygène d'un mammifère sans en diminuer l'activité physique.

La présente invention vise donc également plus particulièrement l'utilisation de la composition pharmaceutique de l'invention pour diminuer la consommation en
5 oxygène d'un individu.

Dans un second aspect, la présente invention vise donc la composition pharmaceutique (ou l'agent inhibiteur de l'hypusinylation) de l'invention pour son utilisation pour diminuer la consommation en oxygène d'un individu qui en a besoin.

Sont également visées l'utilisation de la composition pharmaceutique (ou de
10 l'agent inhibiteur de l'hypusinylation) de l'invention pour la fabrication d'un médicament destiné à diminuer la consommation en oxygène d'un individu qui en a besoin, ainsi qu'une méthode pour diminuer la consommation en oxygène d'un individu qui en a besoin, ladite méthode comprenant l'administration audit individu de la composition pharmaceutique (ou de l'agent inhibiteur de l'hypusinylation) de
15 l'invention.

Dans cet aspect de l'invention, ledit individu est de préférence un mammifère, de manière encore plus préférée un être humain.

Les présents inventeurs ont démontré que le GC7 permettait de protéger un mammifère des conséquences néfastes d'une insuffisance rénale causée par une lésion
20 ischémique (voir exemples).

La présente invention concerne donc en outre une composition pharmaceutique pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter l'insuffisance rénale due à une lésion ischémique, ladite composition comprenant, en tant qu'agent cyto-protecteur, un agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A, de préférence le N1-Guanyl-1,7-
25 diaminoheptane (GC7).

En d'autres termes, la présente invention vise l'utilisation d'une composition pharmaceutique comprenant, en tant qu'agent cyto-protecteur, un agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A, pour la fabrication d'un médicament destiné à prévenir et/ou traiter l'insuffisance rénale due à une lésion ischémique chez un animal, en particulier
30 chez un mammifère.

De préférence, la composition pharmaceutique est utilisée pour prévenir l'apparition de troubles liés à l'insuffisance rénale.

Par ailleurs, la présente invention vise l'agent inhibiteur de l'hypusinylation de l'invention, pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter l'insuffisance rénale due à une lésion ischémique chez un animal, ou encore l'utilisation de cet agent inhibiteur pour la fabrication d'un médicament destiné à prévenir et/ou traiter l'insuffisance rénale

5 due à une lésion ischémique chez un animal.

De préférence ledit animal est un mammifère, en particulier l'homme.

De préférence, ledit agent inhibiteur de l'hypusinylation de l'invention est le N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7).

La présente invention vise enfin une méthode de prévention et/ou de traitement

10 de l'insuffisance rénale due à une lésion ischémique chez un individu qui en souffre, comprenant l'étape d'administrer l'agent inhibiteur de l'hypusinylation de l'invention, ou une composition pharmaceutique comprenant, en tant qu'agent cyto-protecteur, l'agent inhibiteur de l'hypusinylation de l'invention, et un excipient acceptable sur le plan pharmaceutique.

15 La présente invention vise également la composition pharmaceutique de l'invention, pour son utilisation pour - ou pour la fabrication d'un médicament destiné à - prévenir et/ou traiter les séquelles neurologiques dues à un accident vasculaire cérébral ou à un traumatisme chez un animal.

Plus précisément, la présente invention vise l'agent inhibiteur de

20 l'hypusinylation de l'invention, pour son utilisation pour - ou pour la fabrication d'un médicament destiné à - prévenir et/ou traiter les séquelles neurologiques dues à un accident vasculaire cérébral ou à un traumatisme chez un animal.

Ledit animal est de préférence un mammifère, et en particulier l'homme.

La présente invention vise enfin une méthode de prévention et/ou de traitement

25 des séquelles neurologiques dues à un accident vasculaire cérébral ou à un traumatisme chez un animal, comprenant l'étape d'administrer l'agent inhibiteur de l'hypusinylation de l'invention, ou une composition pharmaceutique le comprenant.

De préférence, ladite composition comprend, en tant qu'agent cyto-protecteur, le N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7).

30 Ledit animal est de préférence un mammifère, et en particulier l'homme.

EXEMPLES

Les inventeurs ont évalué si et dans quelle mesure la désoxyhypusine synthase (DHS) pouvait être utilisée comme cible pharmacologique potentielle dans les indications d'hypoxie/ischémie chez une espèce mammifère, par exemple le rat.

- 5 Pour ce faire, un modèle d'ischémie rénale par arrêt momentané du flot artériel (Wenzel et al., 1992, Basile et al., 2005) a été mis en place (figure 1). L'ischémie a été réalisée chirurgicalement par ligature de l'artère rénale gauche chez des rats femelles adultes anesthésiés à l'isoflurane. Après 40 minutes d'ischémie, le flux sanguin a été restauré. L'atteinte rénale a été évaluée par la mesure d'un marqueur de la souffrance
- 10 rénale (NGAL, Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, par test ELISA) dans l'urine des rats. La fonction rénale a été évaluée par la méthode des clairances (Dworkin LD and Brenner BM 2000): des échantillons de plasma et d'urine ont été collectés et analysés pour déterminer l'excrétion fractionnelle de glucose, de sodium et de phosphate.

15 *Synthèse du GC 7*

- Le GC7 (N1-guanyl-1,7 diaminoheptane), un inhibiteur de la désoxyhypusine synthase DHS, a été synthétisé selon la méthode décrite par Jalusionis et al. *Cell Biochem Funct* (2007). La structure du produit et sa pureté ont été évaluées par des méthodes d'analyse connues de l'homme du métier (RMN, spectrométrie de masse). La
- 20 pureté obtenue est supérieure à 99 %. Le GC7 est soluble dans l'eau. Une solution 3 mg/ml a été préparée dans une solution saline physiologique.

Production d'anticorps anti hypusine

- La L-hypusine a été synthétisée selon la technique décrite par Bergeron et al. (*J Med Chem* 1998) et incorporée dans le peptide : Cys-Thr-Gly-Hpu-His-Gly (Hpu =
- 25 hypusine). Un anticorps polyclonal a été produit chez le lapin après couplage du peptide à l'ovalbumine. Il reconnaît dans des expériences de Western blot, une seule protéine au poids moléculaire attendu (17 kDa). Le sérum pré-immun est inactif. La dilution utilisée est 1/1000.

I. Mesure du NGAL, un marqueur de l'atteinte rénale

Le NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) est considéré comme un marqueur fiable d'un état d'hypoxie tissulaire au niveau rénal (Mishra et al., 2003, 2004, Haase et al., 2009). Les taux urinaires de NGAL sont déterminés par un test ELISA commercial (Bioporto) et rapportés aux concentrations urinaires de créatinine.

Les rats ont été répartis en deux groupes, l'un traité au GC7 (3 mg/kg intra péritonéal), l'autre avec le véhicule contrôle (même quantité de solution saline) pendant 4 jours avant que soit réalisée la lésion ischémique.

Pour réaliser la lésion ischémique, les rats ont été anesthésiés avec de l'isoflurane, et l'artère rénale gauche a été ligaturée. Après 40 minutes d'ischémie, le flux sanguin est restauré. Les urines et un échantillon sanguin sont récoltés au temps zero (avant l'ischémie) et après 24 heures de récupération.

a) dosage du NGAL urinaire

Le marqueur NGAL a été dosé dans les urines totales avant et 24 heures après le clampage (ligature temporaire) de 40 minutes de l'artère rénale gauche. Les résultats sont présentés sur la figure 2. Ces résultats démontrent que l'ischémie induit une production urinaire de NGAL chez les animaux contrôles (confirmant l'existence d'un état ischémique), et que cette production est inhibée par le GC7, indiquant un effet protecteur du GC7.

La figure 2 montre également que l'administration de GC7 ne modifie pas l'excrétion urinaire de NGAL au temps 0 avant l'ischémie.

b) dosage du NGAL plasmatique

Le NGAL plasmatique (provenant du rein ischémié) a été dosé 24 heures après le clampage (ligature temporaire) de 40 minutes de l'artère rénale gauche chez des rats contrôles ou traités par du GC7. Les résultats sont présentés sur la figure 3. Ces résultats démontrent que l'augmentation de NGAL plasmatique est plus significativement réduite chez les animaux traités au GC7, ce qui indique un effet protecteur.

c) Fonction rénale

La fonction rénale a été évaluée par une mesure de l'excrétion fractionnelle de glucose, de sodium et de phosphate. Tous les rats ont été soumis à une ischémie de 40 minutes de l'artère rénale gauche puis reperfusés. Après 24 heures de récupération les expériences de clearance (Dworkin LD and BM Brenner, 2000) ont été réalisées

indépendamment sur les reins droits (contrôle) et gauche (ischémiés) des rats anesthésiés. Le glucose sanguin et urinaire a été dosé par une technique spectrométrique (Randox, Kit Gluc HK). La figure 4 montre une altération de la réabsorption de glucose par les reins ischémiés. Le GC7 corrige significativement ce défaut.

5 Le sodium plasmatique (Na) et urinaire a été mesuré par spectrométrie de flamme. Le phosphate plasmatique et urinaire a été dosé par chromatographie ionique (Dionex IonPac AS11). La figure 5 montre une altération de de l'excrétion fractionnelle de sodium (A) et de phosphates (B) sur les reins gauches ischémiés. Ici encore les animaux traités par le GC7 sont protégés des conséquences néfastes induites par
10 l'ischémie.

d) Hypusinylation de eIF5A

Le GC7 est un inhibiteur spécifique de la desoxyhypusine synthase, l'enzyme qui permet l'hypusinylation (et la fonctionalisation de eIF5A). Il était important de vérifier que le traitement des rats par le GC7 réduisait effectivement l'hypusinylation de
15 eIF5A. L'hypusinylation de eIF5A a été analysée par des expériences de « Western blot » en utilisant deux anticorps primaires :

1. un anticorps commercial (AbCam, Ref : ab32443) qui reconnaît toutes les formes (hypusinyllées ou non de eIF5A), et
2. un anticorps polyclonal dirigé contre les formes hypusinyllées de
20 eIF5A qui a été produit chez le lapin à partir d'un peptide synthétique (Cys-Thr-Gly-Hpu-His-Gly) reproduisant la séquence de eIF5A autour du site d'hypusinylation.

Les reins d'animaux contrôle ou traités au GC7 (3 mg/kg intra péritonéal pendant 3 jours) ont été homogénéisés dans un tampon de solubilisation (10 mM
25 Phosphate, 3 % SDS, 3 % glycerol). Les expressions des formes totale et hypusynilée de eIF5A sont analysées par Western blot. Après numérisation des gels (figure 6A), le rapport des deux signaux obtenu après mesure densitométrique des bandes protéiques spécifiques est calculé. La Figure 6B montre que l'administration de GC7 diminue de manière significative la fraction hypusinyllée d'eIF5A au niveau rénal.

e) Conclusion

Les résultats présentés ci-dessus indiquent que le GC7 inhibe bien l'hypusinylation d'eIF5A au niveau rénal. Par ailleurs, les présents inventeurs ont pu montrer que le GC7 protège l'atteinte rénale induite par une ischémie/reperfusion. Le GC7 protège donc en grande partie les animaux contre les conséquences rénales d'une ischémie.

II. Protection par le GC7 de la perte de phosphate urinaire induite par l'hypoxie

Le rein est l'organe responsable du maintien de l'homéostasie ionique de l'organisme et notamment de l'équilibre phospho-calcique. Cet équilibre est essentiel et il est décrit dans la littérature comme sensible à l'hypoxie (Baines AD et al 1998; Mimura Y and Knox FG. 1994; Brazy PC et al. 1984). Cette dernière induit une perte rapide des ions phosphates dans l'urine qui peut devenir problématique.

La perte urinaire de phosphate a été étudiée chez des souris traitées au GC-7 :

Des souris mâles et femelles ont été injectées (3 fois à 1 jour d'intervalle) soit avec un placebo soit avec du GC7 à 3 mg/kg en IP. Le 3^{ème} jour, ces animaux ont été maintenus soit en normoxie (21 % O₂) soit en hypoxie (6-8 % O₂) dans des conditions normobariques pendant 24 heures. Des échantillons d'urine ont été alors recueillis sur chaque animal et analysés pour leur contenu en phosphate inorganique (PO₄) et en créatinine. La figure 7 donne pour chaque catégorie d'animaux la moyenne des rapports PO₄/créatinine sur (n) souris. Le rapport à la créatinine permet de s'affranchir du taux de dilution des urines propre à chaque animal et sa condition physiologique à l'instant de la mesure.

Il a été démontré que :

- l'hypoxie induit une perte urinaire massive de phosphate,
- le GC7 ne modifie pas l'excrétion urinaire de phosphates dans des conditions normoxiques, et
- le GC7 atténue très significativement la perte urinaire de phosphate induite par l'hypoxie.

La réabsorption du phosphate chez les mammifères étant localisée essentiellement au niveau du segment proximal du néphron, ces résultats prouvent que le GC7 protège cette fonction essentielle du rein en cas d'hypoxie.

III. Le GC7 diminue la consommation d'oxygène basale d'un mammifère.

III.1. Résultats *in vitro*

Dans des conditions physiologiques *in vitro*, la consommation en glucose de cellules rénales issues du tubule proximal de souris exposées au GC7 est fortement accrue (Figure 8C). Parallèlement la production de lactate par ces mêmes cellules augmentent (figure 8D). La consommation en oxygène des mêmes cellules est très significativement diminuée (Figure 8A). Malgré la modification drastique de ces paramètres le taux intracellulaire d'ATP reste constant (Figure 8B).

Ces données suggèrent que le GC7 induit un "shift" des cellules vers un métabolisme glycolytique anaérobie, expliquant pourquoi les cellules rénales traitées au GC7 souffrent moins de l'absence d'oxygène durant l'ischémie.

III.2. Résultats *in vivo*

Ces données ont été validées sur un modèle *in vivo*.

La consommation basale en oxygène de souris injectées en IP avec le placebo (NaCl 0,9 %) ou avec du GC-7 à 3 mg/kg a été étudiée :

Des souris mâles (figure 9A) et femelles (figure 9B) ont été traitées par une injection IP de placebo NaCl 0,9 % (contrôle, n = 5) ou de GC7 à 3 mg/kg (GC7, n = 4) dans du NaCl à 0,9 % la veille et le jour de la mesure. Pour la mesure les animaux ont été placés individuellement dans une enceinte de 500 cm³ contenant un dispositif (solution d'hydroxyde de baryum) capable de piéger le CO₂ expiré par les animaux. La consommation d'oxygène a été enregistrée pendant environ 30 minutes (1 point toutes les 5 minutes) à l'aide d'un oxymètre oxybaby® (Witt). Les consommations indiquées ont été exprimées en ml d'O₂ par heure et par gramme de poids corporel. Les expériences ont été stoppées quand le taux d'oxygène du container atteignait 10 % d'O₂.

La synthèse des résultats est illustrée par la figure 9.

Ils démontrent que :

- le GC7 induit une diminution significative de la consommation basale en oxygène d'un mammifère male ou femelle ; cet effet du GC7 sur la consommation d'oxygène *in vitro* et *in vivo* s'explique par un shift métabolique rendant le mammifère moins dépendant de l'oxygène ; cette moindre dépendance vis à vis de l'oxygène explique la résistance du rein à un épisode hypoxique/ischémique ; et

- cette diminution de la consommation d'oxygène ne modifie pas le niveau de veille des animaux qui gardent un comportement normal.

IV. Le GC7 protège les neurones contre l'ischémie

IV.1. In vitro : le GC7 augmente la résistance neuronale contre l'ischémie

5 reperfusion

Des cultures primaires dites « mixtes » ont été réalisées : elles contiennent 55 % de neurones, cultivés sur un tapis astrocytaire représentant 45 % du nombre total de cellules. Dans ces conditions, les neurones qui sont matures et différenciés présentent les mêmes fonctionnalités que les neurones cérébraux *in vivo* (Gouix et al., 2009). Sur ces cultures, l'AVC a été mimé par une privation en oxygène et en glucose (modèle dit « OGD » pour « oxygen glucose deprivation ») de 60 min (Goldberg et al., 1993). Les cultures ont ensuite été replacées en milieu normalement glucosé et oxygéné pour reproduire la reperfusion pendant 24 heures et le nombre de cellules neuronales a été quantifié. Pour la quantification, quatre champs microscopiques par puits (un champ = 1,6 mm²) ont sélectionnés de manière aléatoire par un expérimentateur ignorant les conditions expérimentales. Les résultats présentés sur la figure 10 proviennent de 3 expériences distinctes (cultures primaires totalement indépendantes) pour un total de 24 puits par conditions analysées. Au préalable à l'OGD, les cultures ont été prétraitées ou non pendant 12 heures avec 30 µM de GC7.

20 ***, différent du contrôle ($p < 0,001$) et \$\$\$, différent de la condition OGD non traité au GC7, ($p < 0,001$).

La figure 10 montre que la privation d'oxygène et de glucose pendant 60 minutes entraîne la mort de 32 % des neurones. (Condition contrôle : $90,28 \pm 2,48$ *versus* condition OGD : $61,40 \pm 1,35$ neurones par champs). L'OGD n'entraîne que 11% de perte neuronale lorsque les cellules ont été prétraité au GC7 (Condition contrôle + GC7 : $86,74 \pm 1,58$ *versus* condition OGD + prétraitement GC7 : $77,27 \pm 1,7$).

Le prétraitement au GC7 entraîne donc une augmentation de la survie neuronale de plus de 30 %. Ces expériences démontrent clairement un effet protecteur du GC7 sur les neurones contre les phénomènes ischémiques. Elles montrent aussi qu'en condition physiologique, un prétraitement avec le GC7 n'a pas d'effet délétère sur les neurones en culture (Condition contrôle : $90,28 \pm 2,48$ *versus* Condition contrôle + GC7 : $86,74 \pm 1,58$, NS - pas de différence significative).

IV.2. *In vivo* : le GC7 protège de l'AVC ischémique transitoire

Les résultats présentés sur la figure 11 ont été obtenus avec des souris mâles C57Bl/6 d'un poids minimal de 20 g. Les animaux ont eu libre accès à la nourriture et à l'eau et été maintenus en cycle circadien (12 h de lumière/12 h d'obscurité) dans notre animalerie agréée. Pour reproduire l'accident ischémique cérébral focal, le modèle d'ischémie focale transitoire (modèle dit « MCAO ») a été utilisé. Il consiste en l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCA) par l'introduction intraluminale d'un filament en nylon. L'artère cérébrale moyenne correspond à l'artère sylvienne chez l'homme, dont l'occlusion serait responsable d'environ 80 % des accidents vasculaires cérébraux. Le temps d'occlusion a été de 60 min (Blondeau et al., 2009 ; Nguemeni et al., 2010). La taille de l'infarctus, le taux de mortalité, le pourcentage de cas de reperfusion spontanée ont été caractérisés selon une méthode publiée (Nguemeni et al., 2010). L'approche préventive a consisté en 3 injections répétées de GC7 (3 mg/kg de poids corporel) espacées de 24 h, la dernière injection a été réalisée 30 minutes avant l'induction de l'AVC. Le même protocole a été réalisé pour le placebo.

Tableau 1 :

Traitement	Nombre d'animaux analysés	Mortalité induite par l'AVC (%)	Reperfusion spontanée post-occlusion	
			Avec	San
Placebo	17	41,2	41,2	17,6
GC7	17	17,6	64,7	17,6

Ces résultats ont montré que le prétraitement au GC7 diminue clairement le taux de mortalité des animaux 24 heures après l'occlusion de la carotide en doublant le taux de survie des animaux le premier jour post-AVC. De même, le traitement au GC7 augmente le taux de reperfusion spontanée post-AVC. Ces deux facteurs sont les premières indications d'une augmentation par le GC7 de la résistance à un AVC ischémique transitoire. En effet, la mortalité est la première conséquence de l'AVC et la non-reperfusion est le pronostic le plus défavorable de l'AVC. La mortalité est la conséquence d'une lésion cérébrale/infarctus/perte neuronale trop importante et l'absence de reperfusion entraîne une expansion du volume lésionnel.

Les présents résultats suggèrent que le prétraitement au GC7 réduit la taille de l'infarctus d'environ 30 %. Les différentes régions cérébrales présentent des sensibilités différentes à l'AVC et la sévérité de la lésion tissulaire est liée à sa proximité de l'occlusion vasculaire. Aussi, il est admis dans l'ischémie de l'artère cérébrale moyenne que le cœur ischémique affecte principalement les régions sous-corticales, alors que la pénombre ischémique cible des thérapeutiques serait corticale. L'analyse plus fine de la protection induite par le GC7 suggère que la protection du GC7 s'effectue aussi au niveau cortical (Figure 11). L'effet du GC7 sur la reperfusion pouvant influencer sur la protection, nous avons analysé les effets du GC7 uniquement chez les animaux ayant reperfusé. Le prétraitement avec le GC7 réduit aussi de 30 % l'infarctus cérébral des animaux reperfusés (contrôle : $26,4 \pm 4,2 \text{ mm}^3$ versus GC7 : $18,3 \pm 2,6$, $p < 0,05$).

En conclusion, le prétraitement au GC7 augmente la survie neuronale d'environ 30 % dans des modèles *in vivo* et *in vitro* reproduisant l'AVC ischémique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Baines AD et al. *Am.J.Physiol.* 1998; (274)
- Balabanov S et al, *Blood*, 2007, **109**(4): 1701-11.
- Basile et al, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2005, **289**(6): R1770-6.
- 5 Bergeron RJ, et al., *J Med Chem.*, 1998, **41** : 3888-3900.
- Blondeau N et al, *Neuropsychopharmacology*. 2009 Nov;34(12):2548-59.
- Brazy PC et al. *Am.J.Physiol* 1984; (247)
- Dworkin LD and Brenner BM. *The Kidney, physiology and physiopathology*, 2000, 3rd edition Vol1, 749-769
- 10 Goldberg et al. *J Neurosci*. 1993 Aug;13(8):3510-24.
- Gouix E et al. *Mol Cell Neurosci*. 2009 Apr;40(4):463-73.
- Haase M, et al., *Am J Kidney Dis.*, 2009, **54** : 1012-1024.
- Huang Y et al., *PNAS* 2007 Mar 6;104(10):4194-9
- Jasiulionis MG. et al. *Cell Biochem Funct.*, 2007, 25:109-14.
- 15 Kersher B et al, *Amino Acids* 2010
- Lee Y.B. et Folk J.E., *Bioorganic & medicinal chemistry* 1998, 253-270
- Li AL, *J. Biol. Chem.* 2004, **279**(47) : 49251-8
- Mimura Y and Knox FG *Am.J.Physiol.* 1994; (266)
- Mishra J. et al., *J Am Soc Nephrol.*, 2003, **14** : 2534-2543.
- 20 Mishra, J., et al., *J Am Soc Nephrol*, 2004, **15** : 3073–3082
- Nguemeni C et al. *Pharmacol Res.* 2010 Mar;61(3):226-33

Park M.H. et al, *J. Biochem.* , 2006, **139**(2) : 161-9

Park MH et al, *Amino Acids*, 2010, **38**(2) :491-500

Semenza GL, *Science*, 2007 ; **318**(5847) : 62-4

Sun Z, *J. Cell Physiol*, 2010, **223**(3) :798-809

5 Taylor CA, *Exp Cell Res*, 2007, **313**(3) :437-49

Vigne P, et al, *Mech Ageing Dev*, 2007, **128**(5-6) : 401-6

Vigne P. et al, *BMC Physiology*, 2008, **8** : 22

Wenzel et al., *Hypertension*, 1992 Aug; **20**(2) : 233-41

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter les troubles liés à des conditions hypoxiques et/ou à des lésions ischémiques chez un mammifère, ladite composition comprenant en tant qu'agent cyto-protecteur un agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A capable d'inhiber la synthèse de l'hypusine.
5
2. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A inhibe la désoxyhypusine synthase (DHS) ou la désoxyhypusine hydrolase (DHH).
- 10 3. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A est choisi parmi les dérivés du 1,7-diaminoheptane (DAH), les dérivés du 1,3 diazacyclohexane et les dérivés du 1,3 diazacyclo-1-hexene.
- 15 4. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A est choisi parmi les dérivés du 1,7-diaminoheptane (DAH), le 1,3 diazacyclohexane et le 1,3 diazacyclo-1-hexene.
- 20 5. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle ledit agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A est un dérivé du 1,7-diaminoheptane (DAH) choisi parmi le N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7), le 1,7-diguanidinoheptane (GC7G), le 1,7 diaminoheptane (C7), le 7-amino-1-guanidinooctane, le 1,7-diamino-*trans*-hept-3-ene, le GC6, le GC8, le GC6G, le GC8G, le CNI-1493.
- 25 6. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans laquelle ledit agent inhibiteur de l'hypusinylation d'eIF5A est le N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7).

7. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que lesdits troubles résultent de conditions hypoxiques et/ou de lésions ischémiques.
- 5 8. Composition pharmaceutique selon la revendication 7, caractérisée en ce que lesdits troubles sont choisis parmi : l'insuffisance rénale, l'insuffisance cardiaque, les séquelles neurologiques, ou les dérèglements d'un organe tel que le foie, l'intestin, le cœur, le poumon ou le rein suite à sa transplantation.
- 10 9. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits troubles induisent des conditions hypoxiques et/ou des lésions ischémiques et sont choisis parmi l'accident vasculaire cérébral, le trauma cérébral, l'arrêt cardiaque, la fibrillation auriculaire, les angiopathies, les microangiopathies périphériques et centrales, les thromboses, les infarctus ou encore les embolies pulmonaires.
- 15 10. Composition pharmaceutique telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour son utilisation pour augmenter la tolérance hypoxique des cellules de mammifère soumises à une lésion ischémique ou à des conditions hypoxiques.
- 20 11. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter l'insuffisance rénale due à une lésion ischémique chez un animal.
12. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter les séquelles neurologiques dues à un accident vasculaire cérébral ou à un traumatisme chez un animal.
- 25 13. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter l'insuffisance cardiaque due à un infarctus chez un animal.

14. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter les dérèglements d'un organe suite à sa transplantation.
- 5 15. Utilisation de l'agent inhibiteur de l'hypusinylation décrit dans les revendications 1 à 6, comme agent cytoprotecteur dans un liquide de conservation des organes.
16. Liquide pour la conservation des organes *ex vivo*, contenant l'agent inhibiteur de l'hypusinylation décrit dans les revendications 1 à 6.
- 10 17. Utilisation de la composition telle que définie dans les revendications 1 à 6, pour diminuer la consommation en oxygène d'un individu.
18. Utilisation selon la revendication 17, dans laquelle ledit individu est un être humain.
- 15 19. Composition pharmaceutique telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter les dérèglements d'un organe ayant subi une hypoxie.

Figure 1

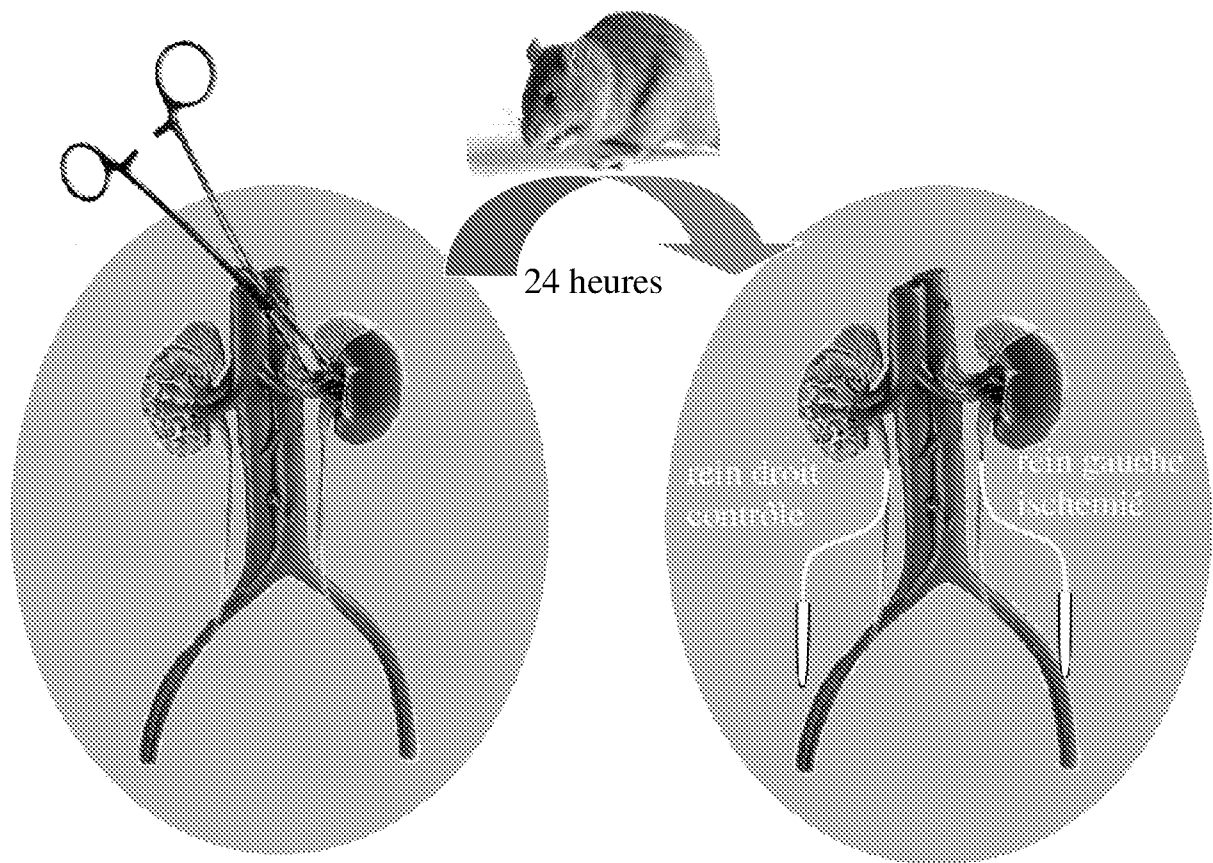


Figure 2

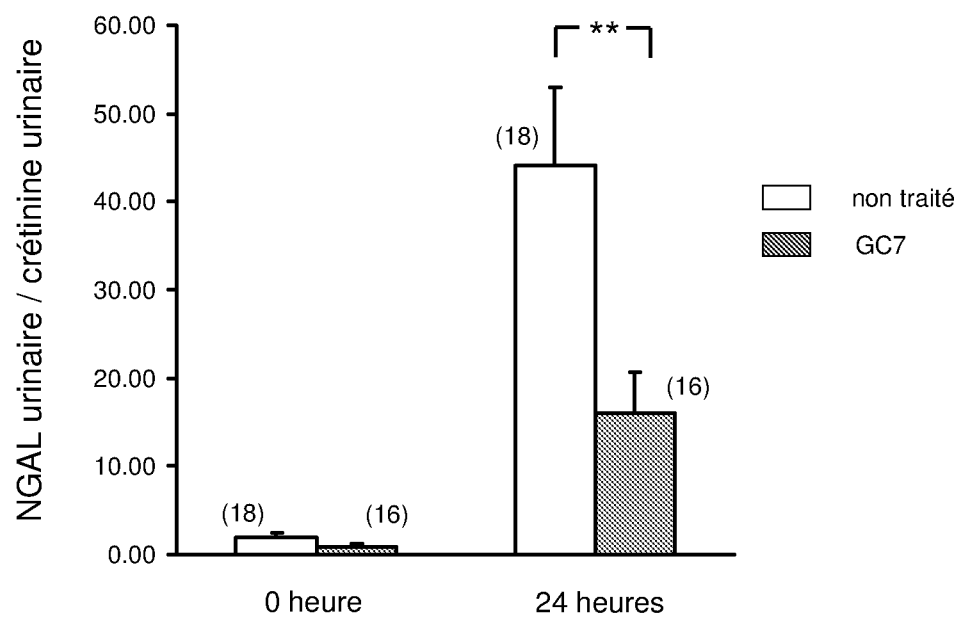


Figure 3

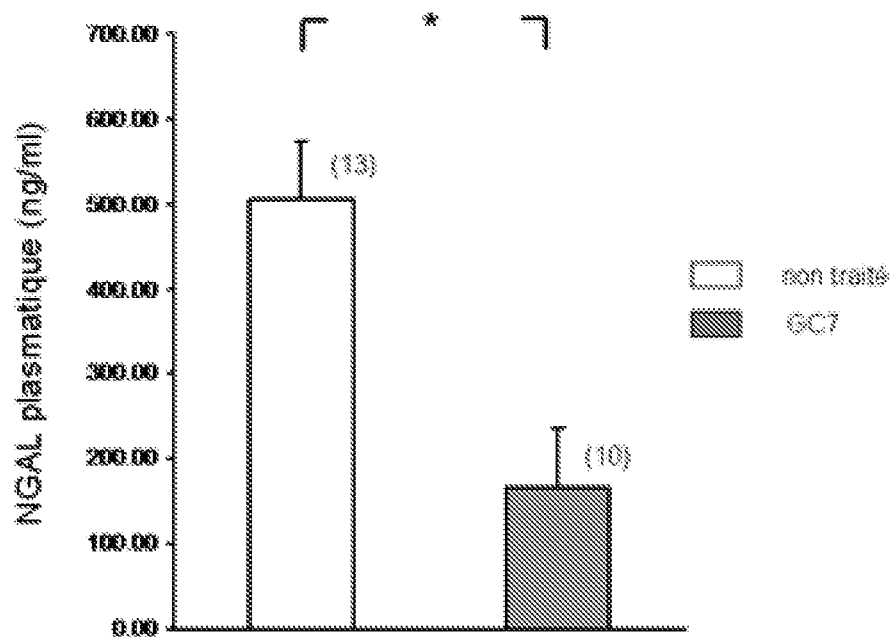


Figure 4

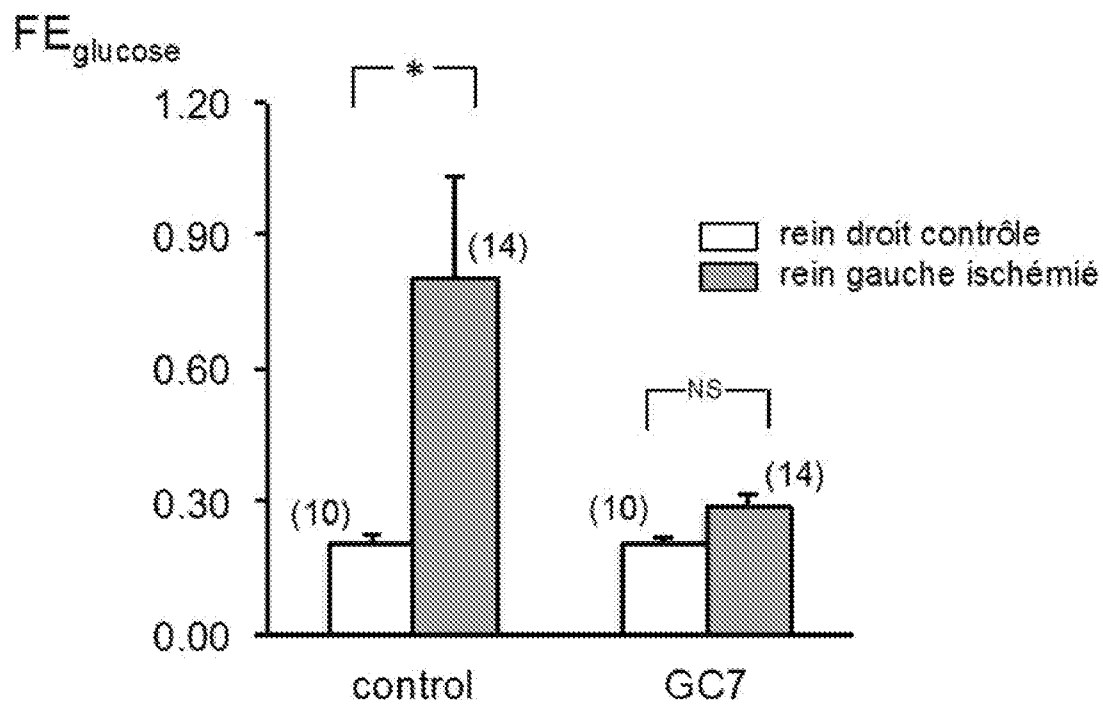


Figure 5

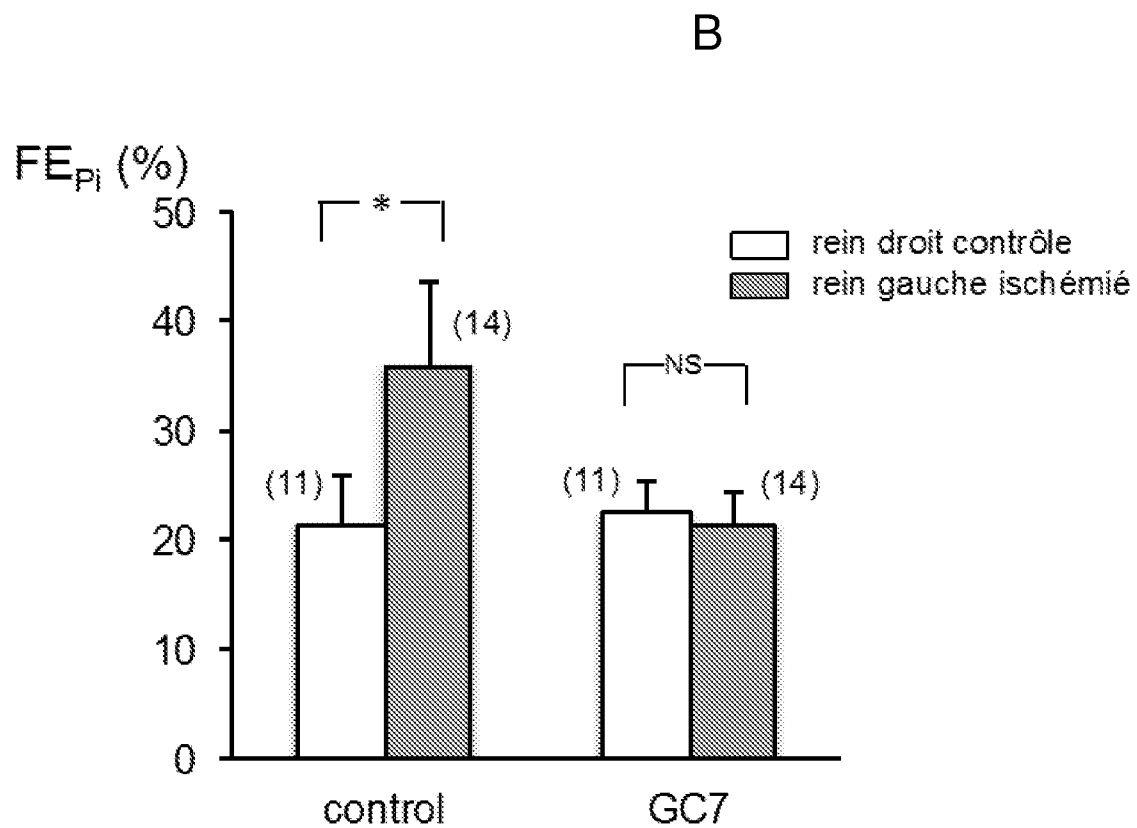
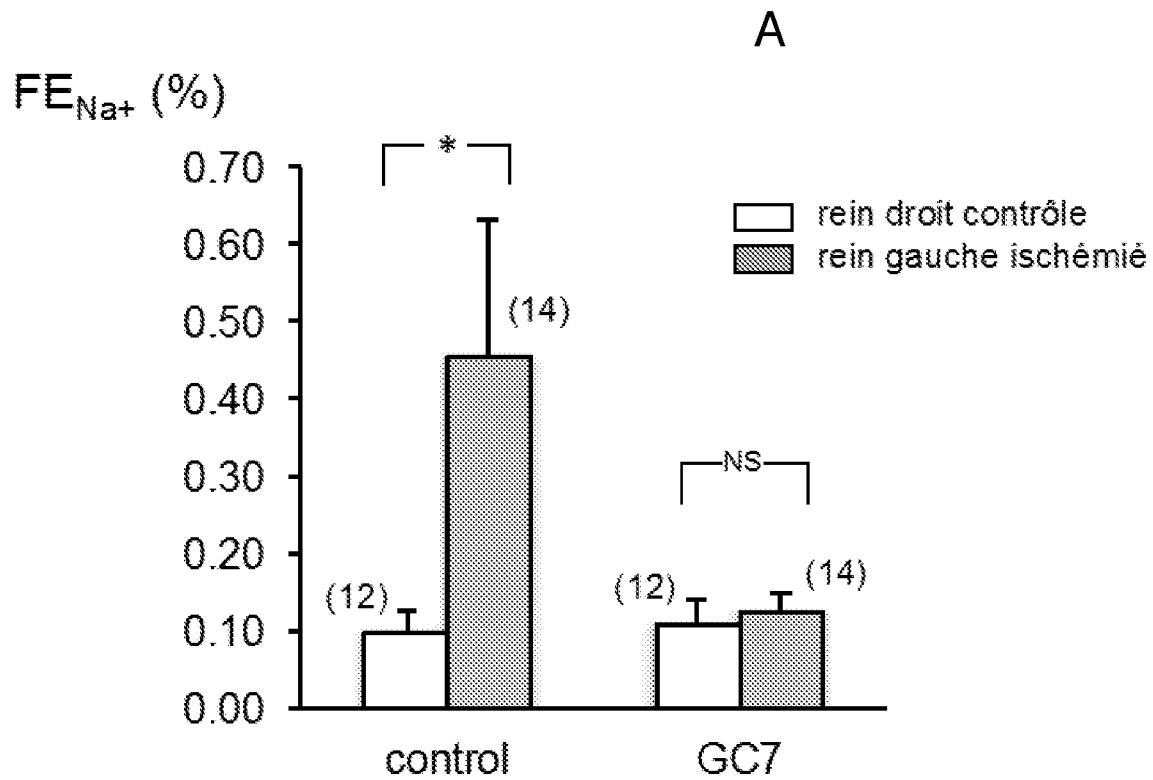


Figure 6

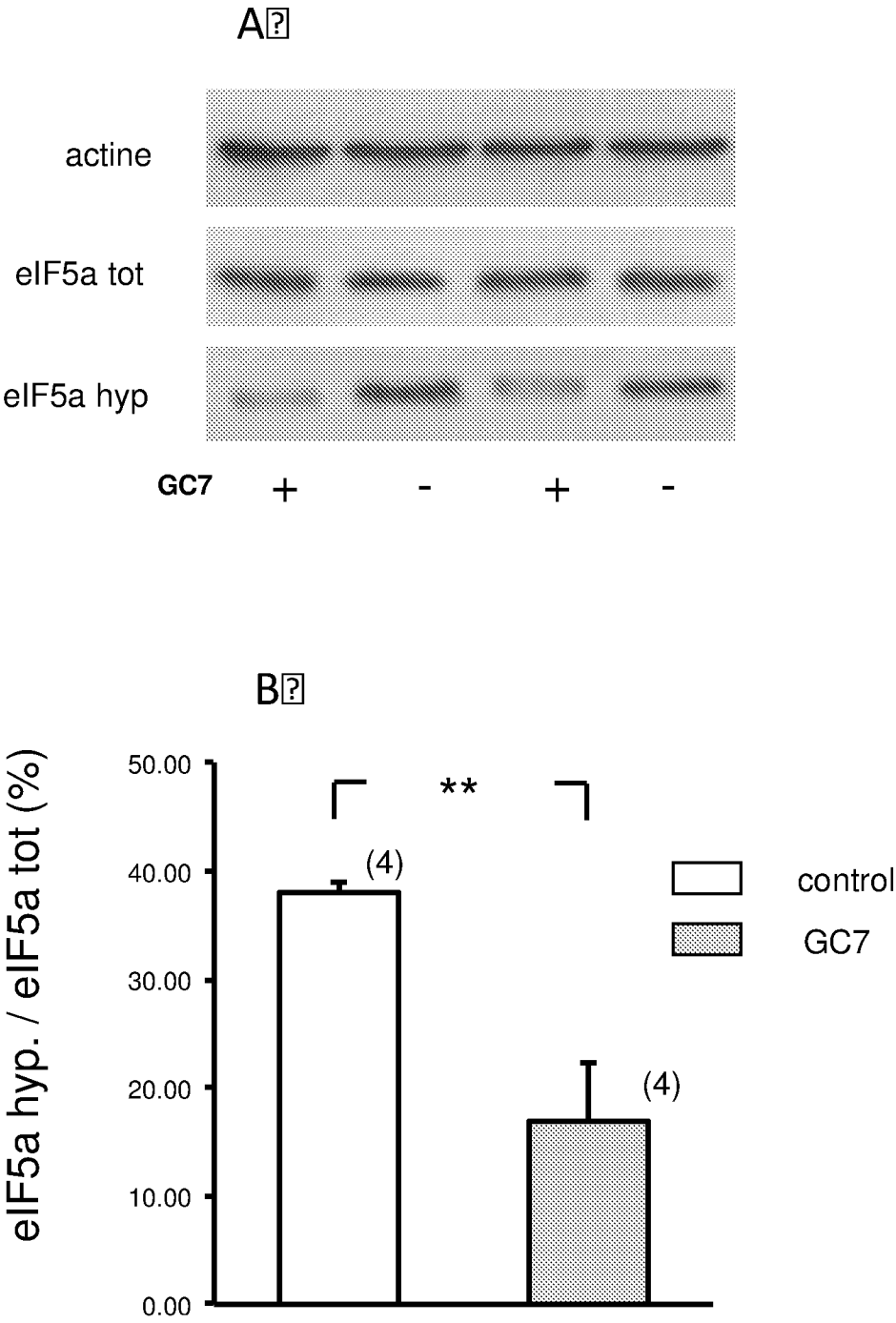


Figure 7

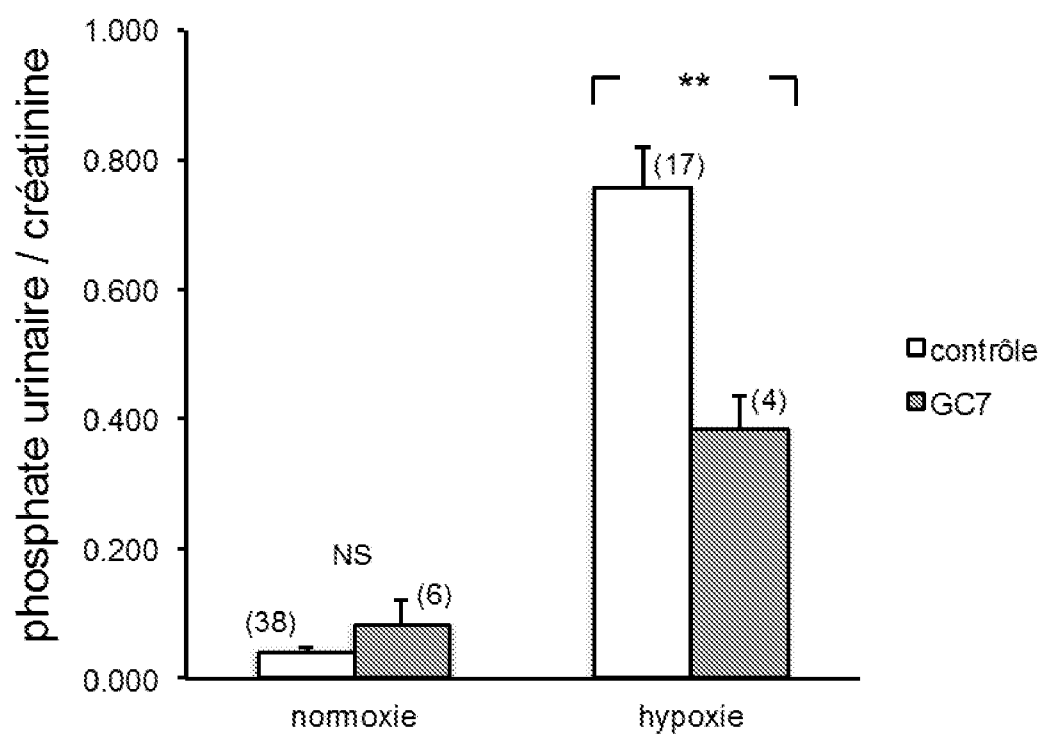


Figure 8

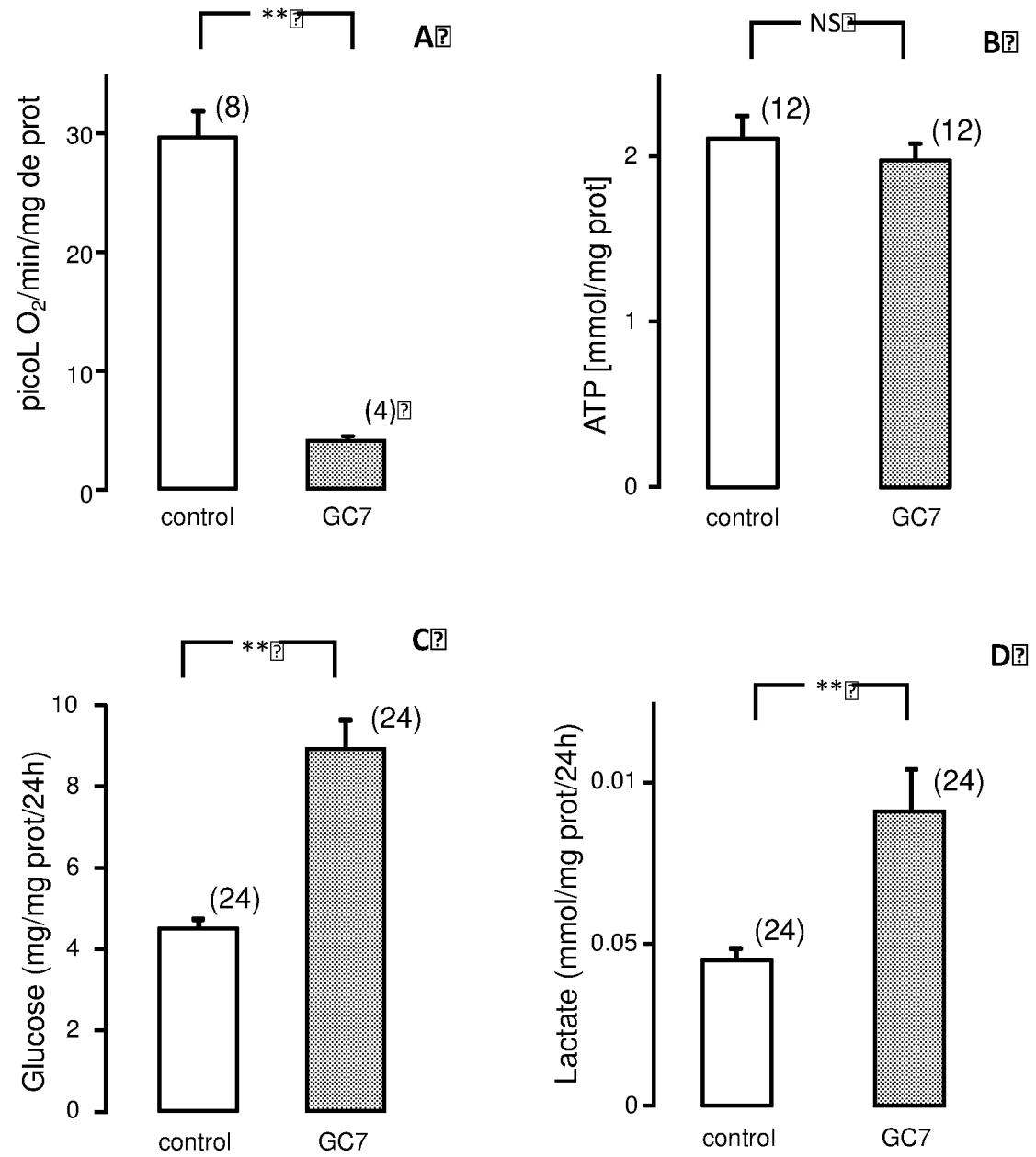


Figure 9

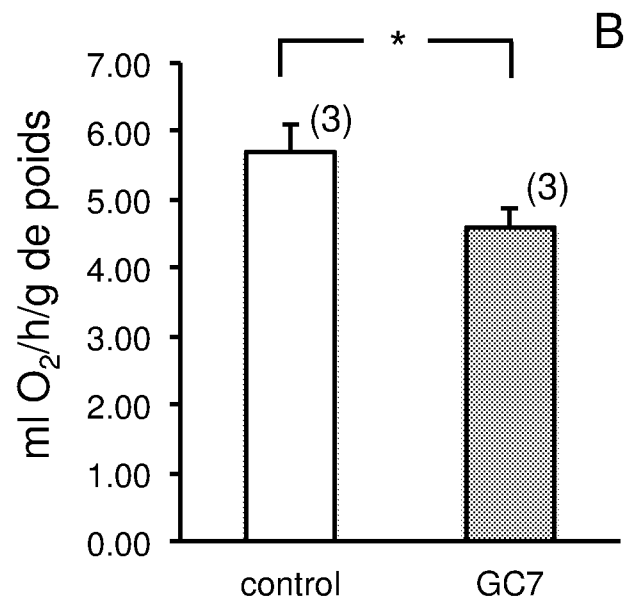
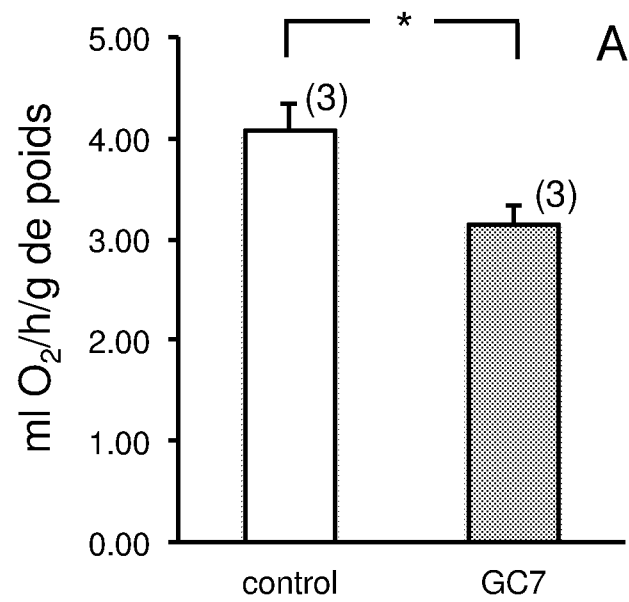


Figure 10

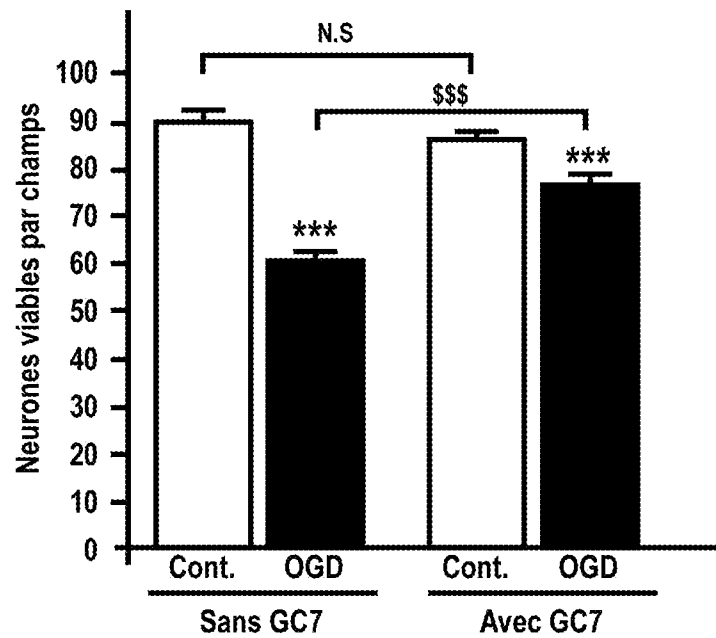


Figure 11

