



## (12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 31026 B1** (51) Cl. internationale : **A61K 31/5415; A61P 13/00**
- (43) Date de publication : **01.12.2009**
- 
- (21) N° Dépôt : **32046**
- (22) Date de Dépôt : **26.06.2009**
- (30) Données de Priorité : **28.12.2006 FR 0656002**
- (86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/EP2007/064553 26.12.2007**
- (71) Demandeur(s) : **PIERRE FABRE MEDICAMENT, 45 place Abel Gance -92100 Boulogne-billancourt (FR)**
- (72) Inventeur(s) : **CLERC, Thierry ; TISNE-VERSAILLES, Jacky ; PRZYBYLSKI, Christophe**
- (74) Mandataire : **CABINET PATENTMARK**
- 
- (54) Titre : **UTILISATION DU 10-[(3R)-1-AZABICYCLO[2.2.2]OCT-3-YLMÉTHYL]-10H-PHÉNOThIAZINE POUR LA PRÉPARATION D'UN MÉDICAMENT EXERÇANT UNE INHIBITION SÉLECTIVE DES RÉCEPTEURS MUSCARINIQUES M1, M2 ET M3**
- (57) Abrégé : LA PRÉSENTE INVENTION CONCERNE L'UTILISATION DU 10-[(3R)-1-AZABICYCLO[2.2.2]OCT-3-YLMÉTHYL]-10H-PHÉNOThIAZINE AINSI QUE DE SES SELS PHARMACEUTIQUEMENT ACCEPTABLES POUR LA PRÉPARATION D'UN MÉDICAMENT PERMETTANT EN PARTICULIER DE PRÉVENIR OU DE TRAITER L'INCONTINENCE URINAIRE, ET CE PAR VOIE LOCALE ET/OU PAR VOIE ORALE.

**UTILISATION DU 10-[(3R)-1-AZABICYCLO[2.2.2]OCT-3-YLMÉTHYL]-10H-PHÉNOTHIAZINE POUR LA PRÉPARATION D'UN MÉDICAMENT EXERÇANT UNE INHIBITION SÉLECTIVE DES RÉCEPTEURS MUSCARINIQUES M1, M2 ET M3**

La présente invention concerne l'utilisation du 10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine ainsi que de ses sels pharmaceutiquement acceptables pour la préparation d'un médicament permettant en particulier de prévenir ou de traiter l'incontinence urinaire, et ce par voie locale et/ou par voie orale.

Utilisation du 10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10*H*-phénothiazine pour la préparation d'un médicament exerçant une inhibition sélective des récepteurs muscariniques M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> et M<sub>3</sub>

5 La présente invention concerne l'utilisation du 10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10*H*-phénothiazine ainsi que de ses sels pharmaceutiquement acceptables pour la préparation d'un médicament permettant en particulier de prévenir ou de traiter l'incontinence urinaire, et ce par voie locale et/ou par voie orale. Le 10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10*H*-phénothiazine  
10 dont la synthèse est décrite dans le brevet dérive d'un racémate : la d,l-méquitazine. A l'origine la méquitazine est un médicament, efficace dans le traitement des affections allergiques comme les rhinites allergiques saisonnières ou permanentes, les allergies médicamenteuses, ainsi que les manifestations dermatologiques d'origine allergiques ou virales (prurit). La méquitazine est un anti-histaminique de  
15 type anti-H<sub>1</sub>. Elle possède un carbone asymétrique conduisant à deux configurations spatiales distinctes : lévogyre et dextrogyre (configuration R). L'analyse poussée des propriétés des deux énantiomères a pu montrer que l'énantiomère dextrogyre était porteuse d'une très forte affinité pour les récepteurs muscariniques M<sub>1</sub>/M<sub>2</sub>/M<sub>3</sub>, exemplifiés ci-après, alors que l'autre énantiomère montrait une plus faible affinité  
20 pour les récepteurs muscariniques. L'acétylcholine est le principal neuromédiateur du système nerveux parasympathique. Les actions physiologiques de l'acétylcholine sont médiées par les récepteurs muscariniques ou nicotiques. Chacun de ces récepteurs est hétérogène: e.g., la famille des récepteurs muscariniques comprend, à ce jour, 5 sous-types (M.sub.1, M.sub.2, M.sub.3, M.sub.4, et M.sub.5) chacun de  
25 ces récepteurs est codé par un gène différent et possède une répartition et une fonction physiologique distincte. Cependant plusieurs récepteurs muscariniques peuvent coopérer pour induire un effet physiologique commun, comme c'est le cas au niveau de la régulation de l'incontinence.

Le récepteur M<sub>3</sub> est un des contributeurs de la contraction du muscle impliqué  
30 dans le contrôle du sphincter vésical (détrusor : ensemble de la musculature lisse de la paroi vésicale/vessie).

Il existe des causes responsables de l'incontinence qui peuvent être supprimées lorsqu'elles sont identifiées : infection des voies urinaires, lithiase (calculs), constipation, par exemple. Il arrive aussi qu'un trouble de la continence soit lié à un traitement médicamenteux. L'incontinence peut, chez les personnes  
5 âgées, correspondre à un changement du cadre de vie, à une inadaptation de l'environnement. Chez la femme ménopausée, la diminution de l'imprégnation œstrogénique est souvent mise en cause dans l'apparition du phénomène d'incontinence, les traitements hormonaux de substitution font partie de l'arsenal thérapeutique dans cette population de patientes. En dehors de ces circonstances, la  
10 cause de l'incontinence peut être identifiée par des examens particuliers. La prise en charge d'une incontinence peut faire appel à des médicaments, à la rééducation ou, dans certains cas, à la chirurgie. La réactivité excessive de la vessie peut être traitée par des médicaments antispasmodiques spécifiques. La faiblesse des sphincters peut être améliorée par des médicaments sympathomimétiques ou, chez les femmes, par  
15 les hormones estrogènes. Des médicaments sympatholytiques peuvent être utilisés pour relâcher des sphincters trop contractés.

Il existe plusieurs types d'incontinences urinaires qui sont temporaires ou continues suivant les facteurs étiologiques. Ainsi on distingue généralement :

20 - l'incontinence par miction impérieuse (hyper-réflexie du détrusor), les contractions anormales de la vessie surviennent de façon involontaire et entraînent une envie pressante d'uriner.

- l'incontinence urinaire d'effort

Il s'agit d'une incontinence passive par diminution des résistances urétrales. La fuite d'urine survient lorsqu'une pression abdominale s'exerce lors d'une toux, d'un  
25 éternuement,...)

- l'incontinence des vessies neurologiques, liée à des dysfonctionnements vésico-sphinctériens :

- l'incontinence par traumatisme.

- l'incontinence par abouchement ectopique de l'urètre.

30 - l'énurésie (chez l'enfant de plus de quatre ans).

L'incontinence par impétuosité, l'incontinence urinaire d'effort et l'incontinence par abouchement ectopique de l'uretère ne se retrouvent que chez la femme tandis que celle par regorgement est masculine.

Le traitement de première intention de la « vessie hyperactive » est basé sur  
5 l'utilisation des drogues anticholinergiques ou encore nommées anti-muscariniques. Les méta-analyses récentes montrent que le bénéfice clinique versus placebo est incontestable même si le traitement est accompagné d'effets indésirables comme la tachycardie, la constipation ou la sécheresse buccale, pouvant expliquer la faible  
10 compliance des patients au traitement (Herbison P. et coll., BMJ, 2003). Cela est expliqué par le fait du manque de sélectivité vésicale des antimuscariniques par rapport aux autres organes. Même si les récepteurs muscariniques de type M<sub>2</sub> sont ceux qui sont quantitativement le plus exprimés au niveau de la vessie et du bas appareil urinaire, proportionnellement la petite part, de récepteurs muscariniques M<sub>3</sub> se montre de plus grande importance sur le plan de la régulation fonctionnelle des  
15 contractions du detrusor. Dans des études fonctionnelles basées sur les modèles ex vivo, utilisant des fragments de detrusor en survie, il a été montré que le sous-type de récepteur muscarinique M<sub>3</sub> était identifié comme le seul sous-type récepteuriel impliqué dans la contraction du muscle, chez le rat (Longhurst P.A. et coll., Br. J. Pharmacol., 1995), chez le lapin (Choppin A., et coll., Brit. J. Pharmacol., 1998) et  
20 chez l'homme (Chess-Williams R., et coll., J. Auton. Pharmacol., 2002). Ces données relatant l'importance en terme de régulation du récepteur M<sub>3</sub> ont été confirmées dans des modèles de souris transgéniques déficientes en récepteur M<sub>3</sub> (Matsui M., et coll., PNAS, 2000). Sur le plan mécanistique et à l'état normal, l'acétylcholine se fixe sur le récepteur M<sub>3</sub> ce qui libère les messagers secondaires IP3  
25 (inositol triphosphate) et DAG (diacylglycerol) induisant la contraction du muscle lisse. L'acétylcholine induit également la contraction en inhibant la libération d'adénosine monophosphate et en inversant la relaxation induite par la noradrénaline via les récepteurs  $\beta$ .

Un des effets adverses majeur de l'utilisation des anticholinergiques dans  
30 l'inhibition de l'incontinence est le phénomène de sécheresse buccale. Paradoxalement, c'est grâce à cet effet que sont sélectionnées en pharmacologie les drogues candidates potentiellement utilisables dans l'incontinence, comme cela est

exposé ci-dessous. Dans les études animales précliniques l'oxybutynine et la darifénacine, deux inhibiteurs utilisés contre l'incontinence, réduisent la salivation et sont plus sélectifs vis-à-vis du récepteur M<sub>3</sub> que vis-à-vis du récepteur M<sub>2</sub>. Par opposition, la toltérodine réduit moins la salivation et, est plus active sur les contractions du detrusor. La toltérodine est plus spécifique du récepteur M<sub>2</sub> que du récepteur M<sub>3</sub> (Gillberg P.G., et coll., Eur. J. Pharmacol., 1998). Cependant, même s'il était supposé qu'une sélectivité vis-à-vis des récepteurs M<sub>2</sub> ou M<sub>3</sub> pouvait permettre de différencier les effets des inhibiteurs, en clinique les résultats sont moins nets et il apparaît qu'une action simultanée sur les récepteurs M<sub>2</sub> et M<sub>3</sub> serait une association efficace vis-à-vis des syndromes d'incontinence. Ainsi, la darifénacine qui montre une affinité 7 fois plus forte pour les récepteurs muscariniques M<sub>3</sub> que pour les récepteurs muscariniques M<sub>2</sub>, ne confirme pas de sélectivité vésicale ou envers les glandes salivaires. En conclusion, les récepteurs M<sub>3</sub> régulent les contractions du muscle lisse de la vessie, les récepteurs M<sub>2</sub> interviendraient dans l'initiation de cette contraction (Krichevski V.P., et coll., J. Urol., 1999).

Pour les raisons citées précédemment, il apparaît que le candidat inhibiteur devrait posséder une action de liaison mixte à la fois sur le récepteur M<sub>2</sub> et sur le récepteur M<sub>3</sub> pour avoir une action complète vis à vis de l'induction de la contraction et sur sa régulation. De plus le récepteur muscarinique M<sub>1</sub>, qui avait été déconsidéré dans ce domaine, semble jouer également un rôle au niveau du detrusor (Maruyama S., et coll., J. Urol., 2006).

Dans le but de diminuer les effets adverses induits par les agents antimuscariniques, divers dispositifs ont été utilisés. Ils sont transdermiques, ou bien disposés in situ chez la femme, sous la forme d'anneau vaginaux à libération prolongée (Schröder A., et coll., Urol, 2000). L'oxybutynine transdermique sous forme de dispositifs transdermiques a été expérimentée avec succès, afin de limiter les effets secondaires dus à une dissémination systémique du principe actif (Stakmann J. S., et coll., Urol., 2006). Par cette voie, la limitation des effets de sécheresse buccale ou oculaire, troubles de la vision, constipation, migraines est moins observée ; en revanche les intolérances cutanées au dispositif apparaissent. Néanmoins, le phénomène de premier passage hépatique est annulé, ce qui limite

l'activité secondaire induite par le métabolite hépatique très puissant de l'oxibutynine (N-desoxybutynine) dont le taux plasmatique après administration orale d'oxibutynine est 6 à 9 fois supérieur à celui de l'oxybutynine. C'est la conjugaison de ces deux entités qui déclenche les effets d'inhibition de l'incontinence, mais également l'induction des effets secondaires.

Ainsi la limitation du taux plasmatique de métabolites actif des drogues antimuscariniques peut également reposer, outre une spécificité de voie d'administration, sur un métabolisme hépatique particulier ne produisant pas de métabolites actifs, pouvant exacerber l'effet de la drogue initialement administrée, mais également augmenter la fréquence et l'intensité des effets secondaires.

En outre, plus la demi-vie du produit sera longue, plus la fréquence d'administration sera faible, facilitant ainsi la compliance au traitement.

L'objet de la présente invention est fondé sur les propriétés particulières et inattendues du 10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine (énantiomère dextrogyre de la méquitazine, codifiée ici sous le nom V0162). Les exemples ci-après montrent que :

- l'affinité vis-à-vis des récepteurs muscariniques  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  humains est très puissante et de niveau nanomolaire
- l'énantiomère dextrogyre (V0162) est plus affiné que le racémate et que l'énantiomère lévogyre, vis-à-vis des récepteurs muscariniques.
- le ciblage muscarinique est mixte avec par ordre d'affinité :  $M_1 > M_3 > M_2$ , cette inhibition étant qualitativement et quantitativement jugée optimale pour l'inhibition du phénomène d'incontinence.
- in vivo l'énantiomère dextrogyre est anticholinergique par voie intraveineuse alors que l'énantiomère lévogyre ne démontre pas d'activité nette. Il en est de même pour la voie orale.
- in vivo l'application mucosale du V0162 en suspension se traduit par un passage systémique net entraînant un taux circulant compatible avec une activité pharmacologique vis-à-vis des cibles réceptorielles muscariniques.
- in vivo dans un modèle de sialorrhée chez le rat, le V0162 induit une diminution significative des sécrétions salivaires après administration par voie orale.

- in vivo dans le modèle d'hyperactivité vésicale (incontinence d'urgence) induite par exposition à l'acide acétique, le V0162 réduit la pression intravésicale évaluée par cystomanométrie.

La combinaison de toutes ces propriétés, reprises à titre d'exemples du présent brevet montre de manière inattendue que le V0162 (10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10*H*-phénothiazine) est un composé actif dans l'incontinence urinaire et des troubles qui y sont associés.

**EXEMPLE 1 :** affinité du V0162 (10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10*H*-phénothiazine) vis-à-vis des récepteurs muscariniques humains, in vitro

Le but de cette étude est de déterminer une constante d'affinité du composé vis-à-vis des trois classes de récepteurs humains muscariniques in vitro. Le modèle choisi est la cellule CHO transfectée de manière stable par les ADNc codant pour chacun des trois types de récepteurs humains muscariniques. Dans un premier temps est déterminée l'affinité des cellules exprimant chaque type de récepteur pour un ligand dont il a été établi par ailleurs qu'il se fixait à 100% sur le récepteur muscarinique cible. Le ligand optimal pour le récepteur recombinant M<sub>1</sub> est la pirenzépine tritiée à 2nM (Dorje F., et coll, JPET, 1991), celui du récepteur recombinant M<sub>2</sub> est la methoctramine tritiée à 2nM, celui du récepteur M<sub>3</sub> est le 4-DAMP à 0.2nM (Peralta E.G., et coll., EMBO, 1987). La spécificité de liaison des récepteurs exprimés par chaque type cellulaire a été vérifiée en parallèle en évaluant la non-fixation de l'atropine à 1µM. La liaison vis-à-vis des récepteurs est définie comme suit : différence entre la liaison globale et la liaison non spécifique déterminée en présence d'excès de ligand froid. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison optimale obtenue avec le ligand modèle (100%). Les IC<sub>50</sub> (concentration nécessaire à inhiber 50% de la liaison du ligand optimal avec sont récepteur cible correspondant) et les coefficients de Hill ( $n_H$ ) ont été déterminés par analyse de régression non-linéaire des courbes de compétitions. Les constantes d'inhibition (K<sub>i</sub>) ont été calculées grâce à l'équation de Cheng Prusoff ( $K_i = IC_{50}/(1+L/ K_D)$ ); où L est la concentration de radioligand et K<sub>D</sub> l'affinité du radioligand pour le récepteur.

Table 1 : V0162 liaison réceptorielle in vitro

Récepteurs humains	Composé testé	IC <sub>50</sub> (nM)	K <sub>i</sub> (nM)	n <sub>H</sub>
M1 (h)	(10-[(3S)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine)	5.9	5.1	1.1
	<b>(10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine)</b>	<b>1.6</b>	<b>1.4</b>	<b>1.0</b>
	(10-[(3R,3S)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine)	2.1	1.8	0.8
M2(h)	(10-[(3S)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine)	94	66	1.0
	<b>(10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine)</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>1.1</b>
	(10-[(3R,3S)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine)	20	14	0.9
M3(h)	(10-[(3S)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine)	17	12	1.0
	<b>(10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine)</b>	<b>5.5</b>	<b>3.9</b>	<b>1.1</b>
	(10-[(3R,3S)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine)	8	5.7	1.2

Ces résultats montrent que le V0162 ((10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine) est un composé qui se lie fortement aux récepteurs muscariniques. Son ratio de spécificité M<sub>2</sub>/M<sub>3</sub> est compris entre 1.5 et 2. Son affinité pour M<sub>1</sub> est également au nanomolaire.

Ainsi in vitro ce composé démontre une très forte affinité vis-à-vis des récepteurs muscariniques impliqués dans l'initiation, la régulation et le maintien des contractions du detrusor. Les différences entre énantiomères et racémate vis-à-vis de ces trois récepteurs varient entre un facteur 3 et un facteur 10, en termes de K<sub>i</sub>.

**EXEMPLE 2 :** Activité anticholinergique ex vivo du V0162 (10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine).

Le but de cette expérimentation est de confirmer sur un organe en survie l'activité anticholinergique du V0162. Pour ce faire, des explants prélevés chez le cobaye ont été mis en survie. La morphologie des préparations était homogène de lot à lot. Chaque explant était disposé dans une chambre de survie et immergé dans une solution physiologique de composition (mM): NaCl (118); KCl (4.7); MgSO<sub>4</sub> (1.2); CaCl<sub>2</sub> (2.5); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2); NaHCO<sub>3</sub> (25); glucose (11), à température de 37°C et respectant un pH de 7.4. Avant le test, les agents suivants ont été dispersés dans le tampon de survie afin de bloquer les réponses non spécifiques à l'acétylcholine : propanolol (10<sup>-6</sup>M) pour bloquer les réponses β<sub>2</sub>-adrénergiques ; cimétidine (10<sup>-5</sup>M) pour bloquer les réponses histaminergiques de type 2 ; methysergide (10<sup>-6</sup>M) pour bloquer les réponses sérotoninergiques et indométhacine (3.10<sup>-6</sup>M) pour prévenir l'apparition d'un tonus musculaire dû à une libération de prostaglandines par la préparation elle-même. Lors des acquisitions, les tissus ont été connectés à des transpondeurs afin d'enregistrer en continu les variations de tension. Après 60 min de calibration des préparations, les tissus ont été exposés à des concentrations variables de V0162. Les contractions induites par l'acétylcholine en dose réponses ont été réalisées afin de déterminer la réponse de la préparation à la stimulation en absence d'inhibiteur putatif.

**Table 2 :** V0162, effet anticholinergique ex vivo

Composé testé	Concentration (nM)	Réponse à l'acétylcholine		
		Courbes	Réponse max. (%)	EC <sub>50</sub> (x10 <sup>-6</sup> M)
V0162	0	témoin	100	7.6 <sub>±2</sub>
	30	test	98 <sub>±1</sub>	22.5 <sub>±2.4</sub> <sup>#</sup>
	0	témoin	100	5.4 <sub>±0.8</sub>
	100	test	98 <sub>±1</sub>	76.0 <sub>±3.6</sub> <sup>#</sup>
	0	témoin	100	7.4 <sub>±0.5</sub>
	300	test	98 <sub>±1</sub>	410 <sub>±76.7</sub> <sup>#</sup>

Expression des résultats sous forme de moyennes  $\pm$  sem avec n=6 par groupe ; \* : p<0.05 intra et # : p<0.05 extra

Le système d'évaluation anticholinergique est validé par les dose-effets obtenus avec l'acétylcholine comme médiateur physiologique de la contraction musculaire. Ces résultats analysés par le test «t» de Student pour valeurs non-appariées montrent que le V0162 s'oppose à l'action contractile de l'acétylcholine.

5 Dans ce modèle ex vivo on confirme les données obtenues in vitro : le V0162 se comporte comme un compétiteur antagoniste de l'acétylcholine. Son action débute à partir de 30nM.

**EXEMPLE 3** : Activité d'inhibition de la sialorrhée du V0162 (10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10*H*-phénothiazine), in vivo.

10

L'activité anticholinergique ayant été démontrée in vitro au niveau réceptorielle et cellulaire puis ex vivo au niveau du tissu cible, le but de ces expérimentations est de constater si après administration par voie orale, une inhibition de la sécrétion salivaire apparaît. Le blocage des récepteurs M<sub>3</sub>, impliqué dans les contractions du

15 détenseur et dans la sécrétion salivaire, provoque souvent le phénomène de sécheresse buccale comme effet concomitant d'un traitement de l'incontinence par l'oxybutynine ou la toltérodine. Les investigations sur les nouveaux agents inhibiteurs de l'incontinence, ont été basées pendant longtemps sur la sélectivité réceptorielle. On supposait que la spécificité d'un agent vis-à-vis des récepteur M<sub>3</sub>

20 plutôt que M<sub>2</sub>, permettrait de limiter l'inhibition aux zones d'expression du récepteur et donc d'éviter l'inhibition au niveau des cibles physiologiques non impliquées dans l'incontinence, comme par exemple la sphère cardiaque ou les glandes salivaires. Cependant comme nous l'avons vu précédemment la sélectivité des agents de lutte

25 d'expression du sous-type de récepteurs muscariniques. En effet, la répartition de ces récepteurs n'est pas réellement liée à une différence tissulaire (ie : on trouve des récepteurs M<sub>2</sub> également dans le détenseur). Sur le plan fonctionnel, l'activation de certains récepteurs contrôle le niveau d'activation d'autres récepteurs de la même famille muscarinique. Ainsi l'élimination des composés pouvant affecter la sécrétion

30 salivaire, dans le but de sélectionner des composés exclusivement actifs sur le détenseur (et donc sur l'incontinence), aboutit à un non-sens. Aussi les dernières évolutions poussent vers l'évaluation d'agent de lutte contre l'incontinence sur les

tests d'inhibition de la sécrétion salivaire. Un point capital est la capacité du composé à diffuser vers un tissu cible. Ainsi des composés pouvant inhiber la sécrétion salivaire dans les modèles ex vivo ou même in vivo chez l'animal peuvent se révéler dénués d'effets sur la sécheresse buccale en clinique humaine. Il n'en demeure pas moins que l'activité d'inhibition de la sécrétion salivaire constitue un outil de choix et sûr de l'activité anticholinergique.

Dans le but d'évaluer l'activité anticholinergique dans le modèle validé de la sialorrhée chez le rat induite par la pilocarpine, Des groupes d'animaux ont été mis à jeun, le lendemain, les produits ont été administrés par voie orale 90 min avant l'injection intra péritonéale de pilocarpine (0.5mg.kg<sup>-1</sup>). Les composés testés ont été administrés aux doses de 2.5 ; 5 et 10 mg.kg<sup>-1</sup>. Au préalable le V0162 (10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine) a été mis en suspension dans un véhicule : la carboxyméthylcellulose à 0.5%. L'atropine comme témoin positif de l'expérimentation a été administrée à la dose de 1mg.kg<sup>-1</sup>. Les animaux ont été anesthésiés puis la sécrétion salivaire a été collectée pendant 60 min, toutes les dix min. Les échantillons ont été ensuite séchés et pesés.

**Table 3** : Inhibition de la sécrétion salivaire chez le rat après administration po, effet anticholinergique in vivo

Traitement	n	Dose (mg.kg <sup>-1</sup> )	Sécrétion (mg)	Inhibition (%)
véhicule	10	-	1045.8	-
V0162	10	2.5	735.6	29
V0162	10	5	338.9	<b>67*</b>
V0162	10	10	45.1	<b>95*</b>
* Atropine	10	1	17.9	<b>98*</b>

20

*Expression des résultats sous forme de moyennes avec n=10 par groupe ; \* : p<0.05*

Le système d'évaluation de la sialorrhée est validé par l'action de l'atropine dans le modèle. Les résultats montrent que le composé cité en exemple réduit de façon significative la sécrétion salivaire chez l'animal, après administration par voie orale. Les effets obtenus sont dose-dépendants. La puissance du composé V0162 (10-

25

5 [(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine) est similaire à celle obtenue avec l'atropine utilisé ici comme standard méthode. Ainsi, le composé V0162 ainsi que ses sels pharmaceutiquement acceptables se révèlent utiles pour la fabrication de médicaments, en particulier sous une forme adoptée à l'administration nasale, destinés au traitement de rhinorées.

Dans un second temps, l'activité anticholinergique des deux énantiomères a été comparée à une seule dose, après administration par voie orale selon le même schéma expérimental que celui précédemment décrit.

10 **Table 4** : Inhibition de la sécrétion salivaire chez le rat après administration po du mélange racémique et des énantiomères, effet anticholinergique in vivo

Traitement	n	Dose (mg.kg <sup>-1</sup> )	Inhibition (%)
véhicule	7	-	-
Énantiomère lévogyre (10-[(3S)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine)	7	5	-4
<b>Enantiomère dextrogyre (V0162)</b> (10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine)	7	5	<b>77*</b>
<sup>2</sup> Mélange racémique (10-[(3R,3S)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine)	6	5	<b>73*</b>

*Expression des résultats sous forme de moyennes avec n=10 par groupe ; \* : p<0.05*

15 En conclusion, ces expérimentations confirment les résultats précédemment obtenus in vitro et ex vivo, et démontrent de manière inattendue que le V0162 (10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine) est un puissant anticholinergique per os. De plus il appartient à la classe des inhibiteurs potentiels de l'incontinence car, comme l'oxibutynine, la darifénacine ou la toltérodine, il diminue la sécrétion salivaire chez l'animal, après administration de doses pharmacologiques  
20 non toxiques et bien tolérées.

En outre contrairement à ce qui était attendu, l'inhibition de la voie cholinergique n'est effective qu'après traitement des animaux par l'énantiomère dextrogyre. L'énantiomère lévogyre démontre une activité anticholinergique in vitro, mais ces résultats ne sont pas les mêmes après administration per os.

- 5 Ainsi, ces résultats montrent que seul le V0162 exerce une activité anticholinergique in vivo.

**EXEMPLE 4 :** Passage transmuqueux d'une suspension de V0162 (10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10*H*-phénothiazine), in vivo chez le lapin.

- 10 Nous avons vu que le composé était capable d'induire une activité anticholinergique après administration par la voie orale. Par ailleurs il est établi que la sélectivité de l'action des anticholinergiques sur la sphère urinaire, dans le but d'inhiber les contractions du détrusor et donc l'incontinence, ne reposait pas sur une sélectivité vis-à-vis des sous-types de récepteurs muscariniques, car ils sont exprimés
- 15 de manière ubiquitaire. Ainsi un des moyens de parvenir à une sélectivité est de réduire la circulation systémique des antimuscariniques tout en augmentant leur concentration au niveau de leur site d'action : le bas appareil urinaire. L'application vaginale de ce composé pourrait permettre de limiter les effets secondaires tout en augmentant l'efficacité. La vessie peut être sur le plan pharmacologique séparée en
- 20 deux : le corps et la base. Les récepteurs muscariniques sont répartis majoritairement au niveau du corps, et la réponse contractile aux stimulations cholinergiques se situe au même niveau. De même l'autre mécanisme impliqué dans le maintien de la continence, l'activité directe sur la relaxation du muscle, voit son contrôle situé au même endroit. De plus des travaux récents ont montré la possibilité de réduire les
- 25 contractions de la vessie par injection locale d'agents anticholinergiques. Ainsi les anticholinergiques pourraient agir non seulement comme antagoniste de l'acétylcholine au niveau des contractions du détrusor, mais également en bloquant les récepteurs muscariniques des voies afférentes à la vessie.

Dès lors, l'utilisation in situ d'un composé antagoniste constituerait une approche de choix pour le traitement de l'incontinence notamment chez la femme ménopausée. La restriction majeure est la capacité de l'agent antimuscarinique à traverser la muqueuse vaginale afin de cibler les afférences muscariniques au voisinage de la vessie (Yongtae K., et coll., J. Urol., 2005).

Dans le but d'analyser la propension du composé d'intérêt à traverser une muqueuse modèle, le V0162 a été administré par pulvérisation sur la muqueuse nasale chez le lapin, puis des prélèvements sanguins ont été effectués dans le but de mesurer un éventuel taux circulant de V0162. 48 lapins ont été traités par voie nasale quotidiennement pendant 28 jours par une suspension titrée à 0.4% masse/volume. Les 3 groupes d'animaux étaient répartis de la façon suivante : solution saline, véhicule, V0162. Chaque groupe était constitué de mâles et de femelles, à part égales. L'administration de la suspension par voie nasale a été effectuée deux fois par jour pendant 28 jours. Les prélèvements plasmatiques ont été réalisés à J1, J2, J7, J28, J35. Les échantillons ont été analysés par une méthode LC/MS/MS validée de dosage du V0162.

**Table 5:** Taux circulant de V0162 après administrations répétées par voie nasale

Date et heure de prélèvement	Taux de V0162 (ng.mL <sup>-1</sup> )
Jour 1/avant administration	BLQ
Jour 1/ 4 heures après administration	0.88
Jour 2/ avant administration	0.22
Jour 7/ avant administration	0.41
Jour 28/ 4 heures après administration	1.35
Jour 28/ 24 heures après administration	0.23
Jour 35/ avant administration	BLQ

*Expression des résultats sous forme de moyennes avec n=10 par groupe ; BLQ : en dessous de la limite de quantification.*

Les résultats montrent que l'administration par voie nasale d'une suspension de V0162 induit un taux circulant voisin de 4 nM, compatible avec une action pharmacologique. En effet, nous avons vu préalablement que l'IC<sub>50</sub> du V0162 était de 5 nM au niveau du récepteur muscarinique M<sub>3</sub> et de 1 nM pour ce qui concerne le

5 récepteur muscarinique M<sub>1</sub>.

On peut donc conclure que l'administration par voie mucosale du V0162 se traduit par un passage efficace compatible avec les taux circulants requis pour son activité anticholinergique. Cette administration n'induit pas d'effets délétères sur la muqueuse nasale. Les taux circulants obtenus n'entraînent pas d'effets toxiques dans

10 ce modèle, ni sur le plan histologique ni sur celui des fonctions vitales : rythme respiratoire, fréquence cardiaque, comportement.

Ainsi il est possible d'administrer le composé d'intérêt par simple application sur la muqueuse dans le but de délivrer localement l'agent anticholinergique.

15 **EXEMPLE 5 :** Activité d'inhibition de l'incontinence d'une suspension de V0162 (10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine), in vivo.

L'objectif de cette étude a été de mesurer la pression intravésicale et la salivation, chez l'animal, dans le but de tester l'urosélectivité d'anti-muscariniques, lorsque ceux-ci sont administrés par voie orale et par voie vaginale. Afin d'évaluer la

20 pression intravésicale, les vessies des animaux ont été cathétérisées pour permettre l'enregistrement (cystomanométrie : enregistrement en continu de la pression vésicale). Les produits à tester ont été administrés soit per os à une dose de 5mg.Kg<sup>-1</sup> soit par application locale de suspension de V0162 à 0.4% dans un véhicule à base de cyclodextrine et d'arginine. La veine jugulaire a été également cannulée afin

25 d'administrer un agoniste muscarinique : béthanéchol (200 µg/kg, iv). A chaque administration de béthanéchol, la variation de pression vésicale ( $\Delta$ PV, mmHg) et la quantité de salive (mg) ont été évalués et quantifiés. Le témoin positif était constitué par un groupe d'animaux traités à l'oxybutynine (Ditropan®; 10, 100 et 1000 µg/kg, iv).

Les résultats (uniquement exprimés dans le texte) montrent que comparativement à l'oxybutynine, le V0162 par voie orale ou par application locale réduit significativement l'augmentation de la pression intravésicale induite par l'agoniste de référence : le béthachol.

- 5 Les expérimentations qui précèdent montrent que le composé V0162 est capable d'induire une activité anticholinergique après administration par voie orale. De plus le composé est capable de franchir la muqueuse. Le composé V0162 possède les caractéristiques d'un anticholinergique puissant : nM in vitro et mg.kg<sup>-1</sup> per os in vivo. Il est actif par voie orale et peut également être administré par voie locale au
- 10 niveau de la muqueuse sous la forme d'une préparation gélifiée dans le but de cibler la zone où sont représentés les récepteurs muscariniques contrôlant directement ou régulant la continence.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation du 10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine ainsi que l'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables pour la fabrication d'un médicament destiné à prévenir ou traiter des troubles, affections et/ou pathologies par inhibition sélective des récepteurs muscariniques M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> et M<sub>3</sub>.
2. Utilisation selon la revendication 1 pour la fabrication d'un médicament destiné à traiter les rhinorées, en particulier sous leur forme adaptée à l'administration nasale.
3. Utilisation selon la revendication 1 pour la préparation d'un médicament permettant de prévenir ou de traiter l'incontinence urinaire et les troubles associés.
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 dans laquelle, le 10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine est un mélange choisi parmi les mélanges comprenant au moins 95-100% de 10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine, 96-100% de 10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine, 97-100% de 10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine, 98-100% de 10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine, 99-100% de 10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine, et le 10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine pur.
5. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'incontinence et les troubles associés sont choisis parmi : l'incontinence par miction impérieuse (hyper-réflexie du détrusor), les contractions anormales de la vessie survenant de façon involontaire et entraînant une envie pressante d'uriner ; l'incontinence urinaire d'effort ; l'incontinence des vessies neurologiques, liée à des dysfonctionnements vésico-sphinctériens ; l'incontinence par traumatisme ; l'incontinence par abouchement ectopique de l'urètre ; l'énurésie (chez l'enfant de plus de quatre ans).

6. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que les pathologies ou symptômes associés aux troubles urinaires sont des infections bactériennes ou fongiques dérivant de l'hyperactivité vésicale.
- 5 7. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que le médicament est présenté sous une forme adaptée à l'administration par la voie orale.
8. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que le médicament est présenté sous une forme de dosage par voie orale à une dose comprise entre  $1\mu\text{g.kg}^{-1}$  et  $10\text{mg.kg}^{-1}$ , avantageusement entre  $0.01\text{mg.kg}^{-1}$  et  $1\text{mg.kg}^{-1}$ .
- 10 9. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que le médicament est présenté sous une forme de dosage par voie locale intravaginale sous une forme de gel de concentration en actif compris entre 0.01% et 10%.
- 15 10. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que le médicament est présenté sous une forme de dosage par voie locale intravaginale sous une forme d'ovule, de suppositoire comprenant entre 10mg et 500mg d'équivalent en principe actif.
- 20 11. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que le médicament est destiné à une administration par voie intravaginale sous forme de dispositif à libération prolongée de type anneau vaginal, à une dose permettant la libération dans la circulation peri-mucosale de 0.2ng à 100ng de 10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine par mL de plasma, avantageusement 2ng à 50ng de 10-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylméthyl]-10H-phénothiazine par mL de plasma.
- 25
- 30