

L'invention concerne de nouveaux glycérolipides utiles, notamment, pour la préparation de complexes avec des substances actives comportant des charges négatives.

Elle concerne également de nouveaux complexes de glycérolipides cationiques et de substances actives comportant des charges négatives permettant l'introduction desdites substances actives dans les cellules. Elle concerne notamment de nouveaux complexes, dont la substance active consiste en un ou plusieurs acides nucléiques, utiles pour transférer les cellules.

Elle concerne également un procédé d'introduction de substances actives comportant des charges négatives à l'intérieur des cellules, notamment un procédé de transfection de cellules, à l'aide de ces complexes.

Elle concerne également les complexes glycérolipides cationiques/substances actives pour leur application en tant que produits thérapeutiquement actifs.

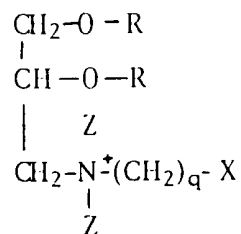
Elle concerne enfin les kits pour préparer ces complexes, notamment des kits d'analyse ou de diagnostic.

Les complexes lipidiques tels que les liposomes sont bien connus en tant qu'agents permettant d'introduire certaines macromolécules biologiques telles que les ADN, les ARN, les protéines ou certaines substances pharmaceutiquement actives à l'intérieur des cellules.

On a déjà proposé, en particulier, d'utiliser à cette fin des lipides cationiques. Les lipides cationiques sont en effet connus pour posséder une certaine affinité vis-à-vis des membranes cellulaires et vis-à-vis des acides nucléiques.

De nombreux lipides cationiques ont déjà été décrits et l'on cite notamment ceux décrits dans les demandes de brevet WO-A-9116024 ; WO-A-9514651 ; WO-A-9405624. En particulier la demande de brevet WO-A-9405624 décrit des lipides cationiques de formule :

30



35

dans laquelle les radicaux R sont notamment des radicaux octadécényle, les radicaux Z sont des radicaux méthyle, q est un nombre entier de 1 à 6, X est notamment une chaîne polyamine.

Un composé plus particulièrement décrit est le sel de
5 tetra(trifluoroacétate) de 1-propanaminium, N-[2-[[2,5-bis [(3-aminopropyl) amino]-1-oxo-pentyl] amino] éthyl]-n,n-diméthyl-2,3,-bis(9-octadécényloxy).

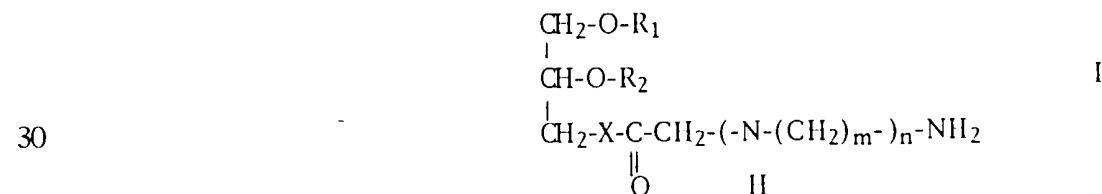
Il est néanmoins souhaitable de proposer d'autres lipides
10 cationiques, ayant éventuellement des propriétés améliorées ou différentes de ceux déjà décrits. On sait en effet que l'interaction entre les complexes et les membranes cellulaires peut varier considérablement en fonction de la cellule considérée. Les mécanismes qui permettent l'interaction des complexes avec les membranes cellulaires et le transfert des complexes à l'intérieur de la cellule sont, de ce fait, largement méconnus et les
15 chercheurs en sont donc réduits à une approche pour l'essentiel empirique.

D'autres facteurs rendent le choix des lipides a priori non évidents
tels que : formation des complexes, stabilité, comportement *in vivo*, éventuelle toxicité.

L'objet de la présente invention est donc en premier lieu de
20 résoudre un ou plusieurs des problèmes évoqués ci-dessus en proposant de nouveaux glycérolipides cationiques permettant notamment de réaliser de nouveaux complexes utiles pour le transfert de substances à l'intérieur des cellules.

Un autre objet de la présente invention est de réaliser des
25 complexes de faible taille (inférieure à 500 nm, avantageusement à 200 nm et de préférence à 100 nm).

L'invention concerne donc un glycérolipide de formule :



dans laquelle :

R₁, R₂, identiques ou différents sont des radicaux C₆-C₂₃ alkyle ou
alcényle, linéaires ou ramifiés ou des radicaux -C(=O)-(C₆-C₂₃) alkyle ou
35 -C(=O)-(C₆-C₂₃) alcényle, linéaires ou ramifiés,

X est l'atome d'oxygène ou un radical amino $-NR_3$, R_3 étant un atome d'hydrogène ou un radical alkyle inférieur de 1 à 4 atomes de carbone,

n est un nombre entier positif de 1 à 6,

m est un nombre entier positif de 1 à 6, et lorsque $n > 1$, m peut être
5 identique ou différent,
lesdits glycérolipides étant éventuellement sous forme cationique associés avec un ou plusieurs anions biologiquement acceptables.

Par l'expression "alcényle", on entend que la chaîne carbonée
10 peut comprendre une ou plusieurs double(s) liaison(s) le long de ladite chaîne.

Par "forme cationique", on entend que les glycérolipides sont sous forme protonée par fixation d'un proton sur un ou plusieurs atomes d'azote présents sur la chaîne polyamine.

Par "anion biologiquement acceptable", on entend que les anions
15 sont tels que les glycérolipides cationiques peuvent être introduits dans la cellule ou être présents dans la membrane cellulaire. On cite par exemple l'anion trifluoroacétate.

L'invention concerne également les conjugués du glycérolipide avec un ligand d'intérêt par l'intermédiaire d'un des atomes d'azote
20 secondaire ou primaire de la chaîne polyamine.

L'invention concerne encore une composition comportant un ou plusieurs glycérolipides décrits ci-dessus et au moins un colipide neutre susceptible d'améliorer la formation de complexes entre lesdits glycérolipides et les substances actives, ou d'améliorer le fonctionnement de ces complexes
25 vis-à-vis de la cellule.

De tels colipides neutres stabilisent pour certains glycérolipides les complexes avec les substances actives. Parmi de tels lipides neutres, on peut citer les trigycérides, les diglycérines, le cholestérol et ceux-ci sont bien connus dans l'art, par exemple par le brevet américain n° 5 438 044. En
30 particulier, on préférera les phospholipides neutres et avantageusement les aminophospholipides neutres. De préférence encore, le colipide neutre comprend la phosphatidyléthanolamine (PE) ou un dérivé de la phosphatidyléthanolamine tel que la DOPE ou dioléoyl-phosphatidyléthanolamine.

Le rapport en poids entre les glycérolipides et les colipides neutres est généralement compris entre 0,1 et 10, étant entendu que ce rapport peut varier selon la nature des glycérolipides et des colipides neutres. On peut également utiliser des mélanges de colipides neutres. On indique ci-après des variantes préférées de réalisation prises ou non en combinaison entre elles.

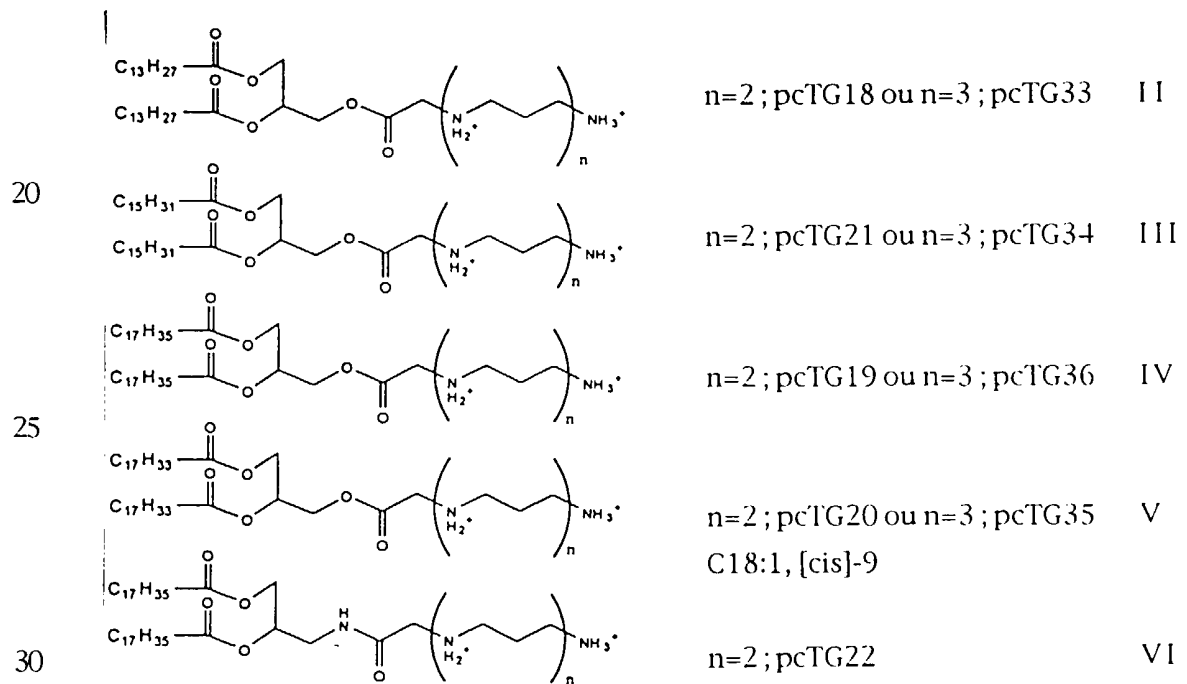
De préférence, R_1 , R_2 , identiques ou différents sont des radicaux $-C(=O)$ alkyle linéaires ou $-C(=O)$ alcényle linéaires.

De préférence, R_1 , R_2 , identiques ou différents sont des radicaux $-C(=O)$ alkyle ou $-C(=O)$ alcényle, comprenant 12 à 20 atomes de carbone.

De préférence, n est un nombre entier choisi parmi les nombres 2, 3 ou 4.

De préférence, m est un nombre entier choisi parmi les nombres 2, 3 ou 4.

De préférence, les glycérolipides sont choisis dans le groupe constitué par les composés de formule suivante :



Les glycérolipides cationiques selon l'invention sont préparés par réaction d'un composé de formule :

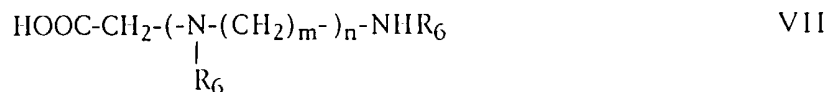


dans laquelle:

R₄, R₅ sont des groupes protecteurs, formant notamment ensemble un radical isopropylidène,

X a la même signification que dans la formule I,

5 avec un acide de formule :



m, n ayant la même signification que dans la formule I,

10 R₆ étant un groupe protecteur, notamment le t-butoxycarbonyle (BOC).

Les fonctions O-R₄, -O-R₅ sont déprotégées ensuite pour fixer par estérification ou étherification les radicaux R₁ et R₂ de manière connue.

Le composé obtenu est déprotégé en présence d'acide trifluoroacétique.

15 Les acides de formule VII sont préparés de manière connue.

Dans le cas des glycérolipides où m = 3, n = 2 ou 3 on se référera aux exemples indiqués ci-après pour connaître les modalités pratiques de synthèse. Les procédés décrits sont applicables en général aux synthèses des glycérolipides selon l'invention moyennant des adaptations à la portée de
20 l'homme du métier.

L'invention concerne encore les conjugués d'un glycérolipide selon l'invention avec un ou plusieurs ligands d'intérêt par l'intermédiaire d'un des atomes d'azote secondaire ou primaire de la chaîne polyamine.

De tels ligands peuvent permettre le ciblage vers un type
25 cellulaire particulier, faciliter la pénétration à l'intérieur de la cellule, la lyse des endosomes ou encore le transport intracellulaire et sont largement décrits dans la littérature. Il peut s'agir par exemple de sucre, peptide, hormone, vitamine, anticorps, peptide fusogénique, peptide de localisation nucléaire. On peut citer plus particulièrement les résidus galactosyl
30 permettant de cibler le récepteur asialoglycoprotéique à la surface des cellules hépatiques, le peptide fusogénique INI-7 dérivé de la sous-unité HA-2 de l'hémagglutinine du virus influenza (Plank et al. 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918-12924) ou d'un signal de localisation nucléaire dérivé de l'antigène T du virus SV40 (Lanford et Butel, 1984, Cell 37, 801-813) ou de la protéine EBNA-
35 1 du virus Epstein Barr (Ambinder et al., 1991, J. Virol. 65, 1466-1478).

De tels conjugués peuvent être obtenus par couplage chimique, notamment en utilisant des groupes protecteurs tels que trifluoroacétyle ou

Fmoc ou Boc sur la polyamine. La déprotection sélective d'un groupe protecteur permet alors de coupler le ligand et l'on déprotège ensuite le glycérolipide.

5 L'invention concerne également un procédé de préparation des complexes glycérolipides cationiques-substances actives anioniques, ledit procédé étant caractérisé en ce que l'on met en présence un ou plusieurs glycérolipides ou une composition selon l'invention avec une ou plusieurs substances actives et en ce que l'on récupère ledit complexe.

10 Selon une première variante, un ou plusieurs glycérolipides cationiques sont mis en solution avec une quantité appropriée de solvant ou mélange de solvant miscible dans l'eau, notamment l'éthanol, ou le diméthylsulfoxyde de manière à former des agrégats lipidiques selon une méthode connue décrite par exemple dans la demande de brevet WO-A-9603977.

15 La suspension mise dans un milieu tampon est ensuite mélangée avec une solution de substance active comportant des charges négatives.

20 Dans le cas où un lipide neutre est présent dans le complexe, on forme préalablement à la mise en solution dans le solvant miscible à l'eau, un film du mélange de lipide cationique et de lipide neutre comme la DOPE de manière connue.

Une des caractéristiques importantes du procédé réside dans le choix du rapport entre les charges positives du lipide cationique et les charges négatives de la substance active.

25 Sans vouloir être limité par un rapport spécifique, on choisira des quantités des différentes charges de manière à ce que le rapport entre les charges positives du lipide cationique et les charges négatives de la substance active soit compris entre 0,05 et 20, notamment entre 0,1 et 15 et de préférence environ de 5 à 10.

30 Le calcul pour arriver à un tel rapport prendra en considération les charges négatives portées par la substance active et on ajustera la quantité de glycérolipides nécessaires pour satisfaire au rapport indiqué ci-dessus. Les quantités et les concentrations pour les autres composés sont ajustées en fonction de leurs masses molaires respectives et de leur nombre de charges positives.

On a trouvé que, dans le cas des glycérolipides selon l'invention, cette première variante conduisait à d'excellents résultats en termes de tailles des complexes obtenus.

Selon une seconde variante, un ou plusieurs glycérolipides cationiques sont mis en suspension avec une quantité appropriée d'une solution de détergent comme un octylglucoside tel que le n-octyl β -D-glucopyranoside, ou le 6-O-(N-heptylcarbomoyl)-méthyl- α -D-glucopyranoside.

La suspension mise dans un milieu tampon est ensuite mélangée avec une solution de substance active comportant des charges négatives.

Dans le cas où un lipide neutre est présent dans le complexe, on forme préalablement à la mise en suspension dans la solution de détergent, un film du mélange lipide cationique et de lipide neutre comme la DOPE sous forme d'une solution sèche de manière connue. Les mêmes remarques concernant le rapport entre les charges positives du lipide cationique et les charges négatives de la substance active que celles indiquées dans la première variante sont applicables à cette seconde variante.

De manière optionnelle, on peut procéder à une dialyse subséquente pour réduire le détergent et récupérer les complexes. Le principe d'une telle méthode est par exemple décrit par Hofland et al. (1996, PNAS 93, p 7305-7309) et dans le chapitre II du document Philippot et al. (G. Gregoriadis, 81-89, CRC Press 1993).

Selon une troisième variante, un ou plusieurs glycérolipides cationiques, sont mis en suspension dans un tampon puis la suspension est soumise à une sonication jusqu'à homogénéité visuelle. La suspension lipidique est extrudée au travers de deux membranes microporeuses sous pression appropriée. La suspension lipidique est mélangée avec une solution de substance active comportant des charges négatives.

Dans le cas où un lipide neutre est présent dans le complexe, on forme préalablement à la mise en suspension, un film du mélange de lipide cationique et de lipide neutre comme la DOPE sous forme d'une solution sèche de manière connue. Les mêmes remarques concernant le rapport entre les charges positives du lipide cationique et les charges négatives de la substance active que celles indiquées dans la première variante sont applicables à cette troisième variante. Cette technique dite de sonication-extrusion est bien connue dans l'art.

Il apparaît que l'utilisation d'un lipide neutre tel que la DOPE peut pour certains glycolipides s'avérer avantageuse pour l'obtention de complexes de faible taille (inférieure à 200 nm, de préférence inférieure à 100 nm).

5 Les caractéristiques des complexes formés sont évaluées par plusieurs moyens permettant de déterminer :

- l'état de complexation avec la substance active, notamment par recherche des acides nucléiques libres par électrophorèse sur gel dans le cas où les substances sont des acides nucléiques.

10 - la taille des particules par diffusion quasi élastique de la lumière.

- l'absence de précipitation à long terme.

L'invention concerne les complexes de glycérolipides cationiques ou d'une composition selon l'invention et d'une ou plusieurs substances
15 actives comportant des charges négatives, notamment les acides nucléiques et les protéines. De préférence, leur taille est inférieure à 500 nm, avantageusement à 200 nm, et de manière préférée, inférieure à 100 nm.

Ledit acide nucléique peut être un ADN ou un ARN sens ou antisens. Les applications sens et anti sens sont bien connues de l'homme de
20 l'art. En bref, on entend par :

- "anti sens" un acide nucléique ayant une séquence complémentaire à une séquence cible, par exemple une séquence d'ARNm dont on cherche à bloquer l'expression par hybridation sur la séquence cible; et

25 - "sens" un acide nucléique ayant une séquence homologue ou identique à une séquence cible, par exemple une séquence qui se lie à un facteur de transcription protéique et impliquée dans l'expression d'un gène donné.

Selon un mode de réalisation préféré, l'acide nucléique comporte
30 un gène d'intérêt et des éléments permettant l'expression dudit gène d'intérêt. Dans ce mode de réalisation, ledit fragment d'acide nucléique est avantageusement sous forme de plasmide.

Dans le cadre de la présente invention, l'acide nucléique peut être homologue ou hétérologue à la cellule cible. Il peut être avantageux d'utiliser un acide nucléique codant pour une cytokine (interleukine dont l'IL-2, interféron, facteur stimulateur de colonies...), un récepteur cellulaire ou nucléaire, un ligand, un facteur de coagulation (Facteur VII, Facteur VIII, Facteur IX...), la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator en anglais), l'insuline, la dystrophine, une hormone de croissance, une enzyme (uréase, rénine, thrombine...), un inhibiteur d'enzyme (inhibiteur d'une protéase virale, α 1-antitrypsine...), un polypeptide à effet antitumoral (produit de gènes suppresseurs de tumeurs, polypeptide stimulant le système immunitaire...), un polypeptide capable d'inhiber ou de ralentir le développement d'une infection bactérienne, virale ou parasitaire (polypeptide antigénique, variant trans-dominant...), un anticorps, une toxine, une immunotoxine et enfin un marqueur (luciférase, β -galactosidase, produit conférant la résistance à un antibiotique...). Bien entendu, cette liste n'est pas limitative et d'autres gènes peuvent également être employés.

Avantageusement, l'acide nucléique est placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans la cellule hôte. Par "éléments nécessaires", on désigne l'ensemble des éléments permettant la transcription dudit fragment d'ADN en ARN (ARN antisens ou ARNm) et la traduction de l'ARNm en polypeptide. Ces éléments comprennent un promoteur régulable ou constitutif, lequel peut être hétérologue ou au contraire homologue au gène d'intérêt. On peut citer, à titre d'exemples, le promoteur du gène PGK (Phospho Glycérate Kinase) humain ou murin, le promoteur précoce du virus SV40 (Simian Virus), le LTR (Long Terminal Repeat) du RSV (Rous Sarcoma Virus), le promoteur TK (Thymidine Kinase) du virus HSV-1 (Herpes Simplex virus) le promoteur CMV (Cytomegalovirus) et les promoteurs adénoviraux E1A et MLP. Les éléments nécessaires peuvent, en outre, inclure des éléments additionnels (séquence intronique, séquence signal de sécrétion, séquence de localisation nucléaire, site d'initiation de la traduction, signal poly A de terminaison de la transcription...).

Les expériences de transfection montrent qu'avantageusement le rapport en poids du composé lipidique selon l'invention audit fragment d'ADN est de 0,01 à 100. Le rapport optimal se situe de 0,05 à 10.

L'invention concerne également les complexes glycérolipides-substances actives tels qu'ils sont susceptibles d'être obtenus par mise en solution dans un solvant miscible à l'eau, notamment l'éthanol ou le diméthylsulfoxyde, des glycérolipides selon l'invention ou par mise en suspension dans une solution de détergent des glycérolipides cationiques ou composition selon l'invention ou par sonication-extrusion d'une suspension de lipides cationiques ou composition selon l'invention et mélange avec une substance active.

L'invention concerne également un procédé pour introduire une substance active comportant des charges négatives à l'intérieur d'une cellule, caractérisé en ce que l'on met en contact des cellules cultivées sur un milieu approprié avec une suspension de complexes glycérolipides-substances actives comportant des charges négatives. Après un certain temps d'incubation les cellules sont lavées et récupérées.

La vérification de l'introduction de la substance active est effectuée (éventuellement après lyse de la cellule) par tout moyen approprié.

Le procédé d'introduction est bien connu en soi. Par le terme "introduction" on entend que la substance active comportant des charges négatives est transférée dans la cellule et est localisée, en fin de procédé, à l'intérieur de ladite cellule ou au niveau de la membrane de celle-ci.

L'invention concerne également un procédé pour transfecter une cellule, caractérisé en ce que l'on met en contact des cellules cultivées sur un milieu approprié avec une suspension de complexes glycérolipides-substances actives comportant des charges négatives. Après un certain temps d'incubation les cellules sont lavées et récupérées.

La vérification de la transfection de l'acide nucléique est effectuée par tout moyen approprié, par exemple par mesure de l'expression du gène considéré ou de la concentration de la protéine exprimée.

Le procédé de transfection est bien connu en soi. Par le terme "transfection" on entend l'introduction d'un acide nucléique exprimable dans une cellule aux fins d'expression dudit acide nucléique. Le terme "acide nucléique" recouvre les acides ribonucléiques ou deoxyribonucléiques.

Parmi les cellules, on cite les cellules de mammifères et en particulier une cellule humaine. Ladite cellule peut être une cellule primaire ou tumorale d'une origine hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte ou macrophage...) hépatique, épithéliale, fibroblaste... et tout particulièrement une cellule musculaire (myoblaste, cardiomyocyte..), une cellule trachéale ou pulmonaire.

L'invention concerne enfin les complexes glycérolipides cationiques/substances actives pour leur application en tant que produits thérapeutiquement actifs et les compositions thérapeutiques comportant de tels complexes et un véhicule inerte approprié au mode d'administration. Une telle composition est particulièrement adaptée à la thérapie génique par transfert d'un acide nucléique à l'intérieur d'une cellule cible.

Une composition selon l'invention peut être administrée par voie intragastrique, sous-cutanée, intraveineuse, intrapéritonéale, intratumorale ou nasale. On préférera tout particulièrement les voies d'administration intracardiaque, intramusculaire, intrapulmonaire ou intratrachéale.

L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu ou de la maladie à traiter ou encore de l'acide nucléique à transférer.

Une composition selon l'invention est destinée à la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal et, préférentiellement, par thérapie génique. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement in vivo (par exemple dans un muscle, dans les poumons par aérosol...). On peut également adopter l'approche ex vivo qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires...), de les transférer in vitro selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient.

Cette dernière composition est avantageusement utilisée pour transférer un acide nucléique dans une cellule musculaire ou une cellule pulmonaire.

L'invention concerne enfin un procédé de thérapie génique consistant à administrer à un patient une quantité appropriée d'une composition selon l'invention, éventuellement à renouveler plusieurs fois le traitement.

Les exemples ci-après illustrent l'invention, sans la limiter en aucune façon, en liaison avec la figure 1 annexée qui fait partie intégrante de la description.

- 5 Synthèse des acides de formule VII avec $m = 3 ; n = 2 ; R_6 = \text{BOC}$ (acide 7a) ou $m = 3 ; n = 3 ; R_6 = \text{BOC}$ (acide 7b) (voir figure 1)

Amino acides 4 et 6

Une solution d'acrylonitrile (9,6 ml, 146 mmoles) dans 50 ml de 1,4-dioxane est ajoutée goutte à goutte à une solution glacée de glycine (10,0 g, 132 mmoles) et de soude 1N (133 ml) dans un mélange 1/1 d'eau et de 1,4-dioxane (200 ml). Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 1 h et à température ambiante pendant 4 h supplémentaires. Une solution de dicarbonate de ditertiobutyle (35,0 g, 159 mmoles) dans le 1,4-dioxane (100 ml) est ensuite ajoutée goutte à goutte et le milieu réactionnel est agité pendant deux heures à température ambiante. Après extraction par l'éther (2 x 100 ml), la phase aqueuse est acidifiée (pH 2-3) avec de l'acide chlorhydrique 1N et extraite avec de l'acétate d'éthyle (2 x 100 ml). Les phases organiques combinées sont séchées et concentrées. Le cyano acide obtenu 1 (24,4 g, Rdt 81%) se présente sous la forme d'un solide blanc de point de fusion 87-89°C. RMN-1H (200 MHz, D₂O) : δ 3,88 et 3,87 (2 s, 2 H, -CH₂-CO₂H), 3,48 et 3,45 (2 t, J = 6,3 Hz, 2 H, -CH₂-N(BOC)-), 2,58 et 2,56 (2 t, J = 6,3 et 6,4 Hz, 2 H, -CH₂-CN), 1,30 et 1,24 (2s, 9 H, t-Bu-).

Une solution d'acide 1 (11,5 g, 50,4 mmoles) dans 100 ml d'éthanol contenant 4,04 g (100 mmoles) de soude est hydrogénée en présence de nickel de Raney (3,2 g) pendant 18 h à température ambiante. Le mélange est filtré sur célite et le catalyseur lavé avec du méthanol (2 x 30 ml). Le filtrat est acidifié à pH 4-5 avec de l'acide chlorhydrique à 10 % et concentré sous vide pour donner un solide blanc qui est dissous dans le chloroforme (50 ml) pour précipiter la plus grande partie du chlorure de sodium. Après filtration, concentration sous vide du filtrat et recristallisation dans le tétrachlorure de carbone, on obtient l'acide amino 2 (10,4 g ; Rdt 89 %) dont le point de fusion est de 201-202°C.

RMN-1H (200 MHz, D₂O) : δ 3,53 (s, 2 H, -CH₂-CO₂H), 3,17 (t, J = 6,6 Hz, 2 H, -CH₂-N(BOC)-), 2,83 (t, J = 7,5 Hz, 2 H, -CH₂-NH₂), 1,69 (quint, J = 7 Hz, 2 H, -CH₂-), 1,26 et 1,21 (2s, 9 H, t-Bu-).

La même procédure que pour l'obtention du cyano acide 1 conduit à l'obtention du cyano acide 3 à partir de l'acide 2.

RMN-1H (200 MHz, CDCl₃) : δ 4,00-3,85 (m, 2 H, -CH₂-CO₂H), 3,55-3,43 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-CN), 3,31 (t, J = 7,2 Hz, 4 H, -CH₂-N(BOC)-), 2,61 (m, 2 H, -CH₂-CN), 1,78 (quint, J = 7,2 Hz, 2 H, -CH₂-), 1,47 et 1,44 (2s, 18 H, t-Bu-).

L'acide 4 est obtenu avec un rendement de 87 % après purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : méthanol/dichlorométhane 3/7, puis 6/4) à partir du cyano acide 3 selon la même procédure qui a conduit à l'acide 2. Le point de fusion est 189-190°C.

RMN-1H (200 MHz, D₂O) : δ 3,57 et 3,54 (2s, 2 H, -CH₂-CO₂H), 3,2-3,0 (m, 6 H, -CH₂-N(BOC)-), 2,80 (t, J = 7,7 Hz, 2 H, -CH₂-NH₂), 1,80-1,50 (m, 4 H, -CH₂-), 1,27 et 1,22 (2s, 18 H, t-Bu-).

La même procédure que pour le cyano acide 1 permet l'obtention du cyano acide 5 à partir de l'acide 4.

RMN-1H (200 MHz, CDCl₃) : δ 3,85 (s large, 2 H, -CH₂-CO₂H), 3,47 (t, J = 6,6 Hz, 2 H, -CH₂-CH₂-CN), 3,35-3,05 (m, 8 H, -CH₂-N(BOC)-), 2,60 (m, 2 H, -CH₂-CN), 1,85-1,60 (m, 4 H, -CH₂-), 1,46 et 1,44 (2 s, 27 H, t-Bu-).

L'acide 6 est obtenu avec un rendement de 83 % après purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : méthanol/dichlorométhane 3/7, puis 6/4) à partir du cyano acide 5 selon la même procédure qui a conduit à l'acide 2.

RMN-1H (200 MHz, D₂O) : δ 3,76 et 3,73 (2s, 2 H, -CH₂-CO₂H), 3,25-2,75 (m, 12 H, -CH₂-N(BOC)- et -CH₂-NH₂), 1,85-1,50 (m, 6 H, -CH₂-), 1,28 et 1,23 (2s, 27 H, t-Bu-).

Acides 7a et 7b

Une solution de dicarbonate de ditertiobutyle (1,09 g, 5,01 mmoles) dans le tétrahydrofurane (4 ml) est ajoutée à une solution d'acide 4 (1,50 g, 3,85 mmoles) et de triéthylamine (1,07 ml, 7,7 mmoles) dans un mélange 1/1 de tétrahydrofurane et d'eau (8 ml). Le milieu réactionnel est agité pendant 2 h à température ambiante. Il est alors acidifié à pH 3 par une solution aqueuse à 10% d'acide chlorhydrique et est extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium et

concentrée pour donner une huile incolore qui après chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle) donne l'acide 7a.

(1,79 g ; Rdt : 95%).

RMN-¹H (200 MHz, CD₃OD) : δ 3,79 (s, 2 H, -CH₂-CO₂H), 3,30-3,15 (m, 6 H, -CH₂-N(BOC)-), 3,03 (t, J = 6.7 Hz, 2 H, -CH₂-N(BOC)-), 1,85-1,60 (m, 4 H, -CH₂-), 1,46 et 1,43 (2 s, 27 H, t-Bu-)

La même procédure que pour l'acide 7a permet l'obtention de l'acide 7b (7,31 g ; Rdt : 95%) à partir de l'acide 6 (6,50 g).

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 3,93 et 3,86 (m, 2 H, -CH₂-CO₂H), 3,40-3,05 (m, 12 H, -CH₂-N(BOC)-), 1,85-1,60 (m, 6 H, -CH₂-), 1.44 (s large, 36 H, t-Bu).

Synthèse de glycérolipides cationiques

Esters 8a et 8b

Une solution de dicyclohexylcarbodiimide (0,60 g, 2,9 mmoles) dans le dichlorométhane sec (1 ml) est ajoutée à une solution d'acide 7a (1,10 g, 2,25 mmoles), de (S)-(+)-2,2-diméthyl-1,3-dioxolane-4-méthanol (0,39 g, 2,9 mmoles) et de 4-(diméthylamino)pyridine (27 mg, 0,23 mmole) dans le dichlorométhane sec (3 ml). Le mélange réactionnel est agité pendant 18 h à température ambiante. Le précipité de dicyclohexylurée est enlevé par filtration et le filtrat est concentré sous vide puis chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant: éther/hexane 6/4) pour donner l'ester 8a (0,72 g; 53%).

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 4,40-4,02 (m, 4 H, -CH₂-O-), 3,98 et 3,90 (2 s larges, 2 H, -CH₂-CO₂-), 3,73 (m, 1 H, CH-O-), 3,35-3,00 (m, 8 H), 1,85-1,55 (m, 4 H, -CH₂-), 1,45, 1,43 et 1,42 (3 s, 30 H), 1,36 (s, 3 H, Me-).

La même procédure que pour l'ester 8a permet l'obtention de l'ester 8b (3,08 g; rdt : 49%) à partir de l'acide 7b (5,32 g, 8,22 mmoles).

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 4,40-4,02 (m, 4 H, -CH₂-O-), 3,99 et 3,91 (2 s larges, 2 H, -CH₂CO₂-), 3,73 (m, 1 H, CH-O-), 3,32-3,00 (m, 12 H, -CH₂-N(BOC)-), 1,85-1,55 (m, 6 H, -CH₂-), 1,45, 1,44, 1,43 et 1,41 (4 s, 39 H, t-Bu- and Me-), 1,36 (2 s, 3 H, Me-).

Dihydroxyesters 9a et 9b

Une solution d'ester 8a (663 mg, 1,10 mmole) et d'acide chlorhydrique 1 N (0,44 ml) dans le méthanol (19 ml) est agitée pendant 16 h à température ambiante. De la triéthylamine (0,5 ml) est ensuite ajoutée

jusqu'à neutralité. L'évaporation sous vide suivie de la chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : éther puis acétate d'éthyle) donne le dihydroxyester 9a (497 mg; rdt : 80%) sous la forme d'une huile incolore.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 4,26 (m, 2 H, -CH₂-OC(O)-), 4,00-3,50 (m, 5 H, CH-OH, -CH₂OH et -CH₂-CO₂-), 3,40-3,00 (m, 8 H, -CH₂-N(BOC)-), 1,85-1,55 (m, 4 H, -CH₂-), 1,45 et 1,43 (2 s, 27 H, t-Bu-).

La même procédure que pour le dihydroxyester 9a permet l'obtention du dihydroxyester 9b (340 mg ; rdt : 71%) à partir de l'ester 8b (500 mg, 0,66 mmole).

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 4,26 (m, 2 H, -CH₂-OC(O)-), 4,00-3,40 (m, 5 H, CH-OH, -CH₂OH, et -CH₂-CO₂-), 3,40-3,00 (m, 12 H, -CH₂-N(BOC)-), 1,85-1,55 (m, 6 H, -CH₂-), 1,46, 1,45 et 1,43 (3 s, 36 H, t-Bu-).

Triesters 10a, 11a, 12a et 13a

Une solution de dicyclohexylcarbodiimide (142 mg, 0,69 mmole) dans le dichlorométhane sec (1 ml) est ajoutée à une solution de dihydroxyester 9a (130 mg, 0,23 mmole), d'acide oléique (195 mg, 0,69 mmole ; Fluka puriss.) et de 4-(diméthylamino)pyridine (3 mg, 0,02 mmole) dans le dichlorométhane sec (2 ml). Le mélange réactionnel est agité pendant 16 h à température ambiante. Le précipité de dicyclohexylurée est enlevé par filtration et le filtrat est concentré sous vide et chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant : éther/hexane 3/7 puis 4/6) pour donner le triester 10a (142 mg; 57%) sous forme d'une huile incolore.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 5,34 (m, 4 H, -CH=), 5,26 (m, 1 H, CH-OC(O)-), 4,40-4,05 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 3,95 et 3,88 (2 m, 2 H, -N(BOC)-CH₂-CO₂-), 3,35-3,00 (m, 8 H, -CH₂-N(BOC)-), 2,31 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 2,01 (m, 8 H, -CH₂-CH=), 1,85-1,50 (m, 8 H, -CH₂-), 1,46, 1,44 et 1,42 (3 s, 27 H, t-Bu-), 1,30 et 1,27 (2 s larges, 44 H, -CH₂-), 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-).

La même procédure que pour le triester 10a permet d'obtenir les triesters 11a (rdt : 65%) , 12a (rdt : 64%) et 13a (rdt : 58%) à partir du dihydroxyester 9a et respectivement de l'acide myristique, de l'acide palmitique et de l'acide stéarique.

11a RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 5,26 (m, 1 H CH-OC(O)-), 4,45-4,05 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 3,95 et 3,88 (2 m, 2 H, -N(BOC)-CH₂-CO₂-), 3,35-3,00 (m, 8 H, -CH₂-N(BOC)-), 2,31 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 1,85-1,50 (m, 8 H, -CH₂-), 1,46, 1,44 et 1,42 (3 s, 27 H, t-Bu-), 1,26 (s, 40 H, -CH₂-), 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-).

5 12a RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 5,26 (m, 1 H, CH-OC(O)-), 4,40-4,05 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 3,95 et 3,88 (2 m, 2 H, -N(BOC)-CH₂-CO₂-), 3,35-3,00 (m, 8 H, -CH₂-N(BOC)-), 2,31 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 1,85-1,50 (m, 8 H, -CH₂-), 1,46, 1,44 et 1,42 (3 s, 27 H, t-Bu-), 1,25 (s, 48 H, -CH₂-), 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-).

10 13a RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 5,26 (m, 1 H, CH-OC(O)-), 4,40-4,05 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 3,95 et 3,88 (2 m, 2 H, -N(BOC)-CH₂-CO₂-), 3,35-3,00 (m, 8 H, -CH₂-N(BOC)-), 2,31 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 1,85-1,50 (m, 8 H, -CH₂-), 1,46, 1,44 et 1,42 (3 s, 27 H, t-Bu-), 1,26 (s, 56 H, -CH₂-), 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-).

Triesters 10b, 11b, 12b et 13b

15 La même procédure que pour le triester 10a permet l'obtention du triester 10b (137 mg ; rdt : 61%) à partir du dihydroxyester 9b (130 mg, 0,18 mmole) et d'acide oléique (153 mg, 0,54 mmole ; Fluka puriss.).

20 RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 5,34 (m, 4 H, -CH=), 5,26 (m, 1 H, CH-OC(O)-), 4,40-4,05 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 3,96 et 3,89 (2 m, 2 H, -N(BOC)-CH₂-CO₂-), 3,35-3,00 (m, 12 H, -CH₂-N(BOC)-), 2,31 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 2,01 (m, 8 H, -CH₂-CH=), 1,85-1,50 (m, 10 H, -CH₂-), 1,46, 1,45, 1,44 et 1,41 (4 s, 36 H, t-Bu-), 1,30 et 1,27 (2 s larges, 44 H, -CH₂-), 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-).

25 La même procédure que pour le triester 10a permet d'obtenir les triesters 11b (rdt : 64%) , 12b (rdt : 58%) et 13b (rdt : 63%) à partir du dihydroxyester 9b et respectivement de l'acide myristique, de l'acide palmitique et de l'acide stéarique.

30 11b RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 5,26 (m, 1 H, CH-OC(O)-), 4,40-4,05 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 3,97 et 3,89 (2 m, 2 H, -N(BOC)-CH₂-CO₂-), 3,35-3,00 (m, 12 H, -CH₂-N(BOC)-), 2,31 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 1,85-1,50 (m, 10 H, -CH₂-), 1,46, 1,45, 1,44 et 1,41 (4 s, 27 H, t-Bu-), 1,26 (s, 40 H, -CH₂-), 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-).

12b RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 5,26 (m, 1 H, CH-OC(O)-), 4,40-4,05 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 3,97 et 3,89 (2 m, 2 H, -N(BOC)-CH₂-CO₂-), 3,35-3,00 (m, 12 H, -CH₂-N(BOC)-), 2,31 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 1,85-1,50 (m, 10 H, -CH₂-), 1,46, 1,45, 1,44 et 1,41 (4 s, 27 H, t-Bu-), 1,25 (s, 48 H, -CH₂-), 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-).

13b RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ 5,26 (m, 1 H, CH-OC(O)-), 4,40-4,05 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 3,97 et 3,89 (2 m, 2 H, -N(BOC)-CH₂-CO₂-), 3,35-3,00 (m, 12 H, -CH₂-N(BOC)-), 2,31 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 1,85-1,50 (m, 10 H, -CH₂-), 1,46, 1,45, 1,44 et 1,41 (3 s, 27 H, t-Bu-), 1,25 (s, 56 H, -CH₂-), 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-).

Glycérolipides pcTG20

Le triester 10a (120 mg, 0,11 mmole) en solution dans le dichlorométhane sec (1 ml) est traité pendant 3 h avec un mélange 1/1 d'acide trifluoroacétique et de dichlorométhane sec (20 ml) à 0 °C. On ajoute ensuite de l'hexane (50 ml) et le mélange est évaporé sous vide et donne un film qui est mis en suspension (vortex) dans de l'éther distillé (5 à 10 ml). La filtration donne une poudre blanche qui est lavée avec de l'éther et séchée sous vide pour donner le glycérolipide pcTG20 (124 mg; 99%). Point de fusion : se décompose à 160 °C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃ - CF₃CO₂D) : δ 5,34 (m, 5 H, -CH= et CH-OC(O)-), 4,60 - 4,15 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 3,99 (s large, 2 H, -NH₂⁺-CH₂-CO₂-), 3,45-3,20 (m, 8 H, -CH₂-NH₂⁺-), 2,39 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 2,50-2,20 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-NH₂⁺-), 2,01 (m, 8 H, -CH₂-CH=), 1,61 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-CO₂-), 1,30 et 1,27 (2 s, 44 H, -CH₂-), 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-).

Analyse élémentaire : Calculé pour C₅₃H₉₂F₉N₃O₁₂ : C, 56,12%; H, 8,18%; N, 3,70%. Trouvé : C, 56,3%; H, 7,9%; N, 3,7%.

Glycérolipide pcTG35

La même procédure que pour le lipide cationique pcTG20 permet l'obtention du lipide cationique pcTG35 (101 mg; rdt : 97%) à partir du triester 10b (100 mg, 0,08 mmole). Point de fusion : se décompose à 190 °C.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃ - CF₃CO₂D) : δ 5,35 (m, 5 H, -CH= et CH-OC(O)-), 4,60-4,15 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 4,00 (s large, 2 H, -NH₂⁺-CH₂-CO₂-), 3,45-3,10 (m, 12 H, -CH₂-NH₂⁺-), 2,40 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 2,45-2,20 (m, 6 H, -CH₂-CH₂-NH₂⁺-), 2,01 (m, 8 H, -CH₂-CH=), 1,60 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-CO₂-), 1,30 et 5 1,27 (2 s, 44 H, -CH₂-), 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-).

Analyse élémentaire : Calculé pour C₅₈H₁₀₀F₁₂N₄O₁₄ : C, 53,36%; H, 7,72%; N, 4,29%. Trouvé : C, 53,2%; H, 7,6%; N, 4,3%. La spectrométrie de masse a été mesurée à 849,8 Da (calculée : 849,3 Da).

10 Glycérolipides pcTG18, pcTG21 et pcTG19

La même procédure que pour le glycérolipide pcTG20 permet d'obtenir les glycérolipides pcTG18 (rdt : 97%; solide; se décompose à 165 °C), pcTG21 (rdt : 96%; solide; se décompose à 170 °C) et pcTG19 (rdt : 92%; solide; se décompose à 186 °C) à partir respectivement des triesters 11a, 12a et 13a.

15 pcTG18 RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CF₃ CO₂D) : δ 5,35 (m, 1 H, CH-OC(O)-), 4,60-4,15 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 3,97 (s large, 2 H, -NH₂⁺-CH₂-CO₂-), 3,45-3,15 (m, 8 H, -CH₂-NH₂⁺-), 2,38 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 2,45-2,20 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-NH₂⁺-), 1,60 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-CO₂-), 1,25 (s, 40 H, -CH₂-), 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-). Spectrométrie de masse : calculée 684,1 Da ; mesurée 684,5 Da.

20 pcTG21 RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CD₃OD) : δ 5,20 (m, 1 H, CH-OC(O)-), 4,45-4,00 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 3,78 (s large, 2 H, -NH₂⁺-CH₂-CO₂-), 3,15-2,40 (m, 8 H, -CH₂-NH₂⁺-), 2,24 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 2,18-1,92 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-NH₂⁺-), 1,52 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-CO₂-), 1,17 (s, 48 H, -CH₂-), 0,79 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-). Spectrométrie de masse : calculée : 740,2 Da ; mesurée 740,6 Da.

25 pcTG19 RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CF₃ CO₂D) : δ 5,38 (m, 1 H, CH-OC(O)-), 4,60-4,15 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 4,01 (s large, 2 H, -NH₂⁺-CH₂-CO₂-), 3,45-3,20 (m, 8 H, -CH₂-NH₂⁺-), 2,41 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 2,50-2,25 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-NH₂⁺-), 1,61 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-CO₂-), 1,26 (s, 56 H, -CH₂-), 0,88 (t, J = 30 6,4 Hz, 6 H, Me-). Spectrométrie de masse : calculée 796,3 Da ; mesurée 796,8 Da.

Glycérolipides pcTG33, pcTG34 et pcTG36

La même procédure que pour le glycérolipide pcTG20 permet d'obtenir les glycérolipides pcTG33 (rdt : 97%; solide; se décompose à 205 °C), 35 pcTG34 (rdt : 94%; solide; se décompose à 215 °C) et pcTG36 (rdt : 92%; solide;

se décompose à 220 °C) à partir respectivement des triesters 11b, 12b et 13b.

pcTG33 RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CF₃ CO₂D) : δ 5,37 (m, 1 H, CH-OC(O)-), 4,60-4,15 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 4,00 (s large, 2 H, -NH₂⁺-CH₂-CO₂-), 3,45-3,15 (m, 12 H, -CH₂-NH₂⁺-), 2,39 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 2,45-2,17 (m, 6 H, -CH₂-CH₂-NH₂⁺-), 1,60 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-CO₂-), 1,25 (s, 40 H, -CH₂-), 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-). Spectrométrie de masse : calculée 741,2 Da ; mesurée 741,6 Da

pcTG34 RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CF₃ CO₂D) : δ 5,37 (m, 1 H, CH-OC(O)-), 4,60-4,15 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 3,98 (s large, 2 H, -NH₂⁺-CH₂-CO₂-), 3,45-3,10 (m, 12 H, -CH₂-NH₂⁺-), 2,39 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 2,45-2,15 (m, 6 H, -CH₂-CH₂-NH₂⁺-), 1,60 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-CO₂-), 1,25 (s, 48 H, -CH₂-), 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-). Spectrométrie de masse : calculée 797,3 Da ; mesurée 797,8 Da

pcTG36 RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃-CF₃ CO₂D) : δ 5,35 (m, 1 H, CH-OC(O)-), 4,60-4,15 (m, 4 H, -CH₂-OC(O)-), 3,98 (s large, 2 H, -NH₂⁺-CH₂-CO₂-), 3,45-3,10 (m, 12 H, -CH₂-NH₂⁺-), 2,37 (t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 2,45-2,15 (m, 6 H, -CH₂-CH₂-NH₂⁺-), 1,59 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-CO₂-), 1,25 (s, 56 H, -CH₂-), 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 6 H, Me-). Spectrométrie de masse : calculée 854,4 Da ; mesurée 854,0 Da.

Glycérolipide pcTG22

20 Une voie un peu différente de celle décrite ci-dessus a permis l'obtention du glycérolipide pcTG22 à partir du 3-amino-1,2-propanediol.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃ - CD₃OD) : δ 5,04 (m, 1 H, CH-OC(O)-), 4,27-3,92 (m, 2 H, -CH₂-OC(O)-), 3,63 (s large, 2 H, -CH₂-C(O)-NH-), 3,10-2,90 (m, 8 H, -CH₂-NH₂⁺-), 2,24 et 2,23 (2 t, J = 7,5 Hz, 4 H, -CH₂-CO₂-), 2,15-1,95 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-NH₂⁺-), 25 1,51 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-CO₂-), 1,17 (s, 56 H, -CH₂-), 0,79 (t, J = 6,7 Hz, 6 H, Me-). Spectrométrie de masse : calculée 795,3 Da ; mesurée 795,3 Da.

Préparation des complexes glycérolipides-ADN par mise en solution dans l'éthanol

30 1. Préparation des complexes glycérolipides pcTG20, éventuellement DOPE,-ADN

Les quantités de lipides sont calculées en se basant sur la concentration d'ADN final (0,1 mg/ml pour les essais en cultures cellulaires), le rapport de charges désiré, la masse molaire et le nombre de charges positives du lipide cationique choisi. Pour obtenir un complexe entre 35

pcTG20/DOPE et de l'ADN plasmidique à un rapport de 10 entre charges positives apportées par le lipide cationique et charges négatives apportées par l'ADN à une concentration d'ADN finale de 0,1 mg/ml, on mélange les différents ingrédients selon le calcul le suivant :

5 0,1 mg d'ADN/ml soit (0,1/330) mmoles de charges négatives (330Da est le poids moléculaire moyen d'un nucléotide) par ml correspondent à : 0,30 μ mole/ml de charges négatives. Pour obtenir 10 fois plus de charges positives il faut une concentration de 3,0 μ mole/ml de charges positives apportées par le lipide cationique. La masse molaire de pcTG20 sous forme de
10 trifluoroacétate est de 1134 g/mole et la molécule contient 3 charges positives. Donc il faut 1,0 μ mole/ml de pcTG20 ce qui correspond à 1,13 mg/ml.

 Pour obtenir une concentration équimolaire en L- α -Dioleoyl-phosphatidyléthanoline (DOPE, 744 g/mole, Sigma ; P0510) il en faut 0,74 mg/ml dans la préparation lipidique. Les quantités et les
15 concentrations pour les autres composés sont ajustées en conséquence de leurs masses molaires respectives et de leur nombre de charges positives.

 Les lipides repris dans du chloroforme sont évaporés puis solubilisés dans du chloroforme/méthanol (v:v) et à nouveau évaporés. Les lipides cationiques sont pesés et la quantité de DOPE est ajoutée à partir d'une
20 solution mère de 10 ou 20 mg/ml dans du chloroforme dans un tube en verre stérilisé à l'alcool et aux UV pour obtenir une concentration de 2mM en lipide cationique. Les solvants sont évaporés sous vide (200 mbar) pendant 45 min à 45°C en utilisant un vortex de 40 tours par minute (Labconco, Rapidvap, Uniequip, Martinsried, Allemagne). Le film lipidique est repris dans de
25 l'éthanol pour être à la concentration de 50 mg/ml en lipide cationique.

 pcTG20/DOPE 1,13 mg + 0,74 mg = 1,87 mg dans 23 μ l d'éthanol. Cette solution est complétée par 20mM HEPES pH 7,5 (ajusté avec NaOH) pour préparer une solution à 5mg/ml finale en lipide cationique.

 pcTG20/DOPE: 230 μ l final - 23 μ l lipides = 207 μ l d'HEPES.

30 L'ADN plasmidique est préparé dans un tube plastique à partir d'une solution mère à 1 mg/ml (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7,5).

 Pour une solution de 0,5 ml finale, on prélève 50 μ l de la solution mère (50 μ g ADN) auquel on ajoute 335 μ l de 20mM HEPES pH 7,5.

Pour complexer l'ADN avec des préparations lipidiques, on ajoute des lipides sur l'ADN. La suspension est mélangée par aspiration/refoulage à la pipette (10-fois). Les complexes sont conservés à + 4°C.

115 μ l de pcTG20/DOPE sont ajoutés à 385 μ l de la solution ADN pour
5 obtenir 0,5 ml de complexe à 0,1 mg/ml ADN et un rapport de charges de 10.

La préparation des complexes se fait sous une hotte à flux laminaire.

On obtient les complexes dont les caractéristiques sont indiquées dans le tableau I ci-après.

10

2. Préparation des complexes glycérolipides pcT35, pcTG22 et pcTG18 éventuellement DOPE,-ADN

Selon le même protocole on obtient les complexes dont les caractéristiques sont indiquées dans le tableau I ci-après.

15

Préparation des complexes glycérolipides-ADN par mise en suspension dans une solution de détergent

1. Préparation des complexes glycérolipides pcTG20, éventuellement DOPE,-ADN

20

Les quantités de lipides sont calculées comme décrit ci-dessus en se basant sur la concentration d'ADN final (0,1 mg/ml pour les essais *in vitro*), le rapport de charges désiré, la masse molaire et le nombre de charges positives du lipide cationique choisi. Le mélange des lipides se fait dans un tube en verre, stérilisé à l'alcool et aux UV, pour obtenir une solution 2mM en lipide cationique (voir ci dessus). Les solvants sont évaporés et le film
25 lipidique est repris dans une solution de n-octyl, β -D-glucopyranoside (octylglucoside, Sigma, O 9882) selon un rapport lipide cationique/détergent de 1/5 (mole:mole).

On prélève 253 μ l d'une solution d'octylglucoside 20 mM dans de
30 l'HEPES 20 mM pH 7,5 avec lesquels on reprend le film de mélange lipidique pcTG20/DOPE. L'ADN plasmidique est préparé à partir d'une solution mère d'ADN plasmidique à 1 mg/ml dont 50 μ l sont placés dans 0,5 ml (0,1 mg/ml final) auquel on ajoute 323,5 μ l d'HEPES 20 mM pH 7,5. 126,5 μ l de la suspension lipidique sont ajoutés sur l'ADN en aspirant et refoulant 10 fois à
35 la pipette pour obtenir la suspension finale à 0,1 mg/ml d'ADN et un rapport

de charges +/- de 10. Pour éliminer le détergent, une dialyse de 3 fois 4 heures à température ambiante contre de l'HEPES 20 mM pH 7,5 est entreprise dans des microdoigts de dialyse (seuil d'exclusion de 13,2 kD ; Sartorius, Göttingen, Allemagne). Les complexes ADN/lipide dialysés sont conservés à +
5 4°C. La préparation se fait dans une hotte à flux laminaire.

On obtient les complexes dont les caractéristiques sont indiquées dans le tableau I ci-dessous.

10 2. Préparation des complexes glycérolipides pcTG35, éventuellement DOPE,- ADN

On applique le même protocole que précédemment.

Préparation des complexes lipides-ADN par sonication extrusion

Les quantités de lipides sont calculées comme décrit ci-dessus en
15 se basant sur la concentration d'ADN final (0,1 mg/ml pour les essais *in vitro*), le rapport de charges désiré, la masse molaire et le nombre de charges positives du lipide cationique choisi. Le mélange des lipides se fait dans un tube en verre, stérilisé à l'alcool et aux UV, pour obtenir une solution 2mM en lipide cationique, comme indiqué ci-dessus. Les solvants sont évaporés et le
20 film lipidique est repris dans 900 µl d'HEPES 20 mM pH 7,5 à 4°C pendant environ 16h. La suspension est soniquée dans un bain de sonication (Branson 221) jusqu'à homogénéité visuelle. La suspension lipidique est extrudée au travers de deux membranes de 0,2 µm de diamètre de pores (Nucleopore, Costar, Cambridge, MA, USA) et rincée avec de l'HEPES 20 mM pH
25 7,5 (Extruder de Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada) à une pression maximale de 50 bars. La suspension lipidique est maintenue à température ambiante pendant 1 heure. 450 µl de la suspension lipidique sont ajoutés sur 50 µl d'une solution mère de l'ADN plasmidique (1 mg/ml) et mélangés en aspirant/refoulant 10 fois à la pipette. Les complexes lipide/ADN sont
30 conservés à +4°C.-Les préparations sont faites sous une hotte à flux laminaire.

Protocole d'évaluation de la complexation de l'ADN par les lipides

Un gel à 1% (w:v) d'agarose est préparé dans un tampon TAE (TAE :
Tris 4,8 g/l + acétate de sodium 0,68 g/l + EDTA 0,336 g/l pH 7,8. Si nécessaire,
35 l'échantillon est dilué dans du TAE puis on ajoute le tampon d'échantillon (0,083% bleu de bromophénol, 0,083% cyanol xylène FF, 10% glycérol dans

l'eau) de façon à se trouver à 50 ngADN/ μ l. L'échantillon est brièvement vortexé et laissé 30 min à température ambiante. A titre de témoin, on utilise le plasmide non-complexé préparé à la même concentration. 10 μ l (500 ng d'ADN) sont déposés sur le gel et la migration s'effectue à 60mV pendant 3 heures. Le gel est révélé dans du TAE contenant 0,006% (v:v) de bromure d'éthidium à 10 mg/ml pendant au moins 30 min. Ensuite le gel est rincé dans du TAE et analysé sous UV.

10 Protocole de mesure de la taille des particules par diffusion quasi élastique de la lumière

Les analyses sont faites sur un Coulter N4Plus (Coultronics France S.A., Margency, France) à 25°C après équilibration de l'échantillon pendant 20 min. Une aliquote de l'échantillon est aspirée et refoulée plusieurs fois avant d'être pipetée. L'échantillon est dilué dans la cuve de mesure et 15 homogénéisé. La mesure de la lumière diffractée à 90° est faite pendant 180 sec après 180 sec d'attente. La gamme utilisée va de 3 nm à 10 000 nm en utilisant 31 bins. Pour être valable, l'échantillon doit donner entre 50 000 et 1 000 000 counts/sec.

20 Caractéristiques physico-chimiques

Les trois méthodes de formulation "injection d'éthanol", "dialyse de détergent" et "sonication/extrusion" sont appliquées aux lipides cationiques selon l'invention avec ou sans des quantités équimolaires de DOPE à des rapports de charges d'environ 10, ou 5. Les formulations sont considérées 25 comme appropriées lorsque l'ADN est complètement complexé (aucune migration dans le gel d'agarose) et que les complexes présentent un diamètre déterminé par diffusion quasi élastique de la lumière inférieur à 500 nm. Le tableau résume les résultats de ces analyses. Tous les complexes ADN/lipides indiqués dans le tableau complexent l'ADN complètement.

TABLEAU I

	glycérolipide cationique	Rapport ¹	Taille (nm) ²	Formulation
5	pcTG20/DOPE	10	84 +/-20	éthanol
	pcTG20/DOPE	10	212 +/-141	détergent
	pcTG20/DOPE	5	96 +/-17	éthanol
	pcTG35/DOPE	10	67 +/-22	éthanol
10	pcTG35/DOPE	5	93 +/-39	éthanol
	pcTG35	10	83 +/-11	éthanol
	pcTG35	5	69 ³	éthanol
	pcTG33	10	223 +/-138	sonication
15	pcTG33/DOPE	10	243 +/-172	sonication
	pcTG22	10	79 +/-59	éthanol
	pcTG22	5	87 +/-52	éthanol
	pcTG22/DOPE	10	261 +/-98	sonication
20	pcTG22/DOPE	10	89 +/-146	éthanol
	pcTG22/DOPE	5	72 +/-44	éthanol
	pcTG18	10	68 +/-53	éthanol
	pcTG18	5	72 +/-30	éthanol
	pcTG18/DOPE	10	62 +/-43	éthanol
	pcTG18/DOPE	5	109 +/-64	éthanol

1: Rapport entre les charges positives du lipide cationique et les charges négatives de l'ADN.

2: déterminée 24 à 48 heures après la préparation (+/- représente la déviation standard de la mesure).

3: déterminée 8 jours après la préparation

Ces analyses montrent que les formulations remplissent les exigences requises. La méthode "injection d'éthanol" donne les meilleurs résultats pour de nombreuses préparations qui présentent une taille inférieure à 100 nm. Les méthodes par dialyse de détergent et sonication/détergent permettent également d'obtenir certains complexes répondant aux buts de la présente invention.

Transfection *in vitro* de cellules satellites

Des cultures de muscles de chien et de muscles humains sont effectuées dans un milieu HamF 14 (Life Technologies) supplémenté avec 10 % de sérum foetal de veau (FCS, Hyclone, Logan, UT), 10 µg/ml d'insuline (Sigma), 10 ng/ml d'EGF (Sigma) et de FGF (Pepro Tech Inc, Rocky Hill, NJ) 2mM de glutamine (bioMérieux), et 40 µg/ml de gentamycine (Schering Plough).

Les cellules sontensemencées 24 h à 48 h avant la transfection, dans une boîte de cellules à 96 puits avec environ 5×10^3 à 10^4 cellules par puits, à environ 30 % de confluence, et maintenues à 37°C en atmosphère 5 % CO_2 et 95 % d'air.

Les transfections sont effectuées avec des mélanges de quantités variables de lipides et d'ADN plasmidique pour déterminer les rapports de charges et les concentrations d'ADN optimales par puits.

Les complexes utilisés sont préparés 24 h à 48 h avant la transfection et dilués dans HamF 14 plus 40 µg/ml de gentamycine et de la glutamine 2mM.

Après élimination du milieu de culture, 100 µl de mélanges de transfection avec ou sans 10 % de FCS sont transférés dans chacun des puits et les plaques sont incubées pendant 4 h à 37°C.

Tous les milieux de transfection sont alors ajustés à 10 % de FCS, 10 µg/ml d'insuline (Sigma), 10 ng/ml d'EGF (Sigma) et de FGF (Pepro Tech Inc, Rocky Hill, NJ), de la glutamine 2mM (bioMérieux), et 40 µg/ml de gentamycine (Schering Plough) pour un volume final de 250 µl. Les cultures sont incubées pendant 48 h puis les cellules sont récupérées et testées pour leur capacité à exprimer le gène de la luciférase. Les concentrations de protéines sont déterminées par le système de test de quantité de protéine (Promega).

30 Transfection de cellules A549 avec des complexes lipidiques

Les cellules A549 (cellules épithéliales dérivées de carcinome pulmonaire humain) sont mises en culture dans du milieu d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 10% de sérum de veau foetal (Gibco BRL) 24 heures avant le début de la transfection dans des plaques de 96 puits (2×10^4 cellules par puits) dans une atmosphère humide à 37°C et 5% CO_2 /95% air. Pour la transfection en l'absence de sérum, le milieu est enlevé et remplacé par du milieu sans sérum. Dans une autre microplaque les suspensions de

complexes lipides/ADN suivantes sont préparées (complexes lipides/ADN à 0,1 mg/ml d'ADN et au rapport de charges indiqué) : 44 μ l (4,4 μ g ADN), 22 μ l (2,2 μ g ADN), 5,5 μ l (0,55 μ g ADN) de solution stock dans les 3 premiers puits, et 11 μ l (0,11 μ g ADN) de la solution stock diluée 10 fois dans le puits suivant. Le volume est complété à 110 μ l avec du DMEM et 100 μ l sont transférés sur les cellules A549. L'incubation se fait avec 4, 2, 0,5 et 0,1 μ g d'ADN par puits pendant 4 heures. Ensuite, 50 μ l de DMEM + 30% de sérum de veau foetal sont ajoutés 4 heures après le début de la transfection puis 100 μ l de DMEM + 10% FCS 24 heures après le début de la transfection. Les transfections en présence de 10% de sérum de veau foetal sont réalisées d'une façon identique sauf que la transfection se passe dans du milieu avec sérum.

Analyse de la transfection

48 h après la transfection, le milieu est éliminé et les cellules sont lavées avec 100 μ l de solution phosphate PBS et lysées avec 50 μ l de tampon de lyse (Promega). Les lysats sont congelés à -80 °C jusqu'à la mesure de l'activité en luciférase. Celle-ci se fait sur 20 μ l de mélange pendant une minute en utilisant le système de détermination de la "Luciférase" (Promega) (luminomètre LB96P Berthold) dans des plaques à 96 puits en mode cinétique.

Transfection *in vitro*

Quelques-unes de ces préparations ont été évaluées en transfection *in vitro* en utilisant les cellules A549 et les cellules satellites primaires de chien.

Les résultats sont résumés dans le tableau II ci-dessous et montrent les unités relatives de lumière (RLU) par puits. Les valeurs données sont obtenues avec 2 μ g d'ADN par puits. Tous les complexes sont préparés en utilisant la méthode d'injection d'éthanol. La concentration totale de protéine par puits est déterminée par les techniques conventionnelles (test BCA, Pierce). A titre indicatif, un puits contient environ 20 à 30 μ g de protéine.

TABLEAU II

Lipide	rapport ¹	A549 ²	A549 + sérum	myoblastes	myoblastes + sérum
pcTG20/DOPE	10	$3,6 \times 10^5$	$6,1 \times 10^6$	$8,9 \times 10^5$	$2,3 \times 10^7$
5 pcTG20/DOPE	5	$8,25 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7$	$8,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$
pcTG35/DOPE	10	4×10^6	$1,0 \times 10^7$	$7,1 \times 10^3$	$6,5 \times 10^7$
pcTG35/DOPE	5	$3,3 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^8$
pcTG35	10	$1,2 \times 10^8$	$7,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	$6,2 \times 10^8$
10 pcTG35	5	$1,6 \times 10^8$	$6,6 \times 10^7$	$3,4 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$

1: Rapport entre les charges positives du lipide cationique et les charges négatives de l'ADN.

2: ADN libre entre 0 et 270 unités de lumière relative.

L'expression de la luciférase (RLU/min) rapportée en mg de protéines donne les valeurs suivantes :

pcTG35 R +/- 10 (A549) $3,4 \times 10^{10}$ RLU/min/mg protéine

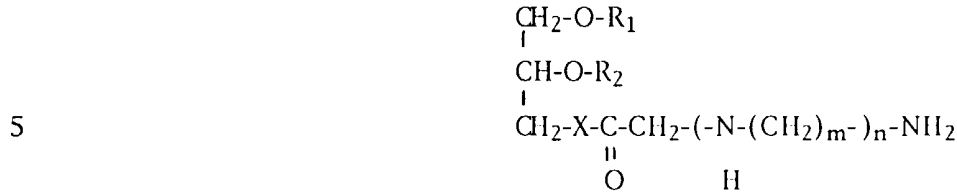
pcTG35 R +/- 5 (A549) $2,8 \times 10^{10}$ RLU/min/mg protéine

pcTG35/DOPE R +/- 5 (A549 + sérum) $1,0 \times 10^{10}$ RLU/min/mg protéine.

Les composés pcTG20 et pcTG35 sont capables de transfecter efficacement les deux types de cellules testées. On notera que certaines formulations donnent des résultats plus élevés en présence de sérum et que le sérum n'a pas d'effet inhibiteur sur ce type de préparation.

REVENDEICATIONS

1. Glycérolipide de formule I :



dans laquelle :

R_1 , R_2 , identiques ou différents sont des radicaux C_6 - C_{23} alkyle ou alcényle, linéaires ou ramifiés ou des radicaux $\text{-C(=O)-(C}_6\text{-C}_{23})$ alkyle ou

$\text{-C(=O)-(C}_6\text{-C}_{23})$ alcényle, linéaires ou ramifiés,

X est l'atome d'oxygène ou un radical amino -NR_3 , R_3 étant un atome d'hydrogène ou un radical alkyle inférieur de 1 à 4 atomes de carbone,

n est un nombre entier positif de 1 à 6,

m est un nombre entier positif de 1 à 6, et lorsque $n > 1$, m peut être

identique ou différent,

lesdits glycérolipides étant éventuellement sous forme cationique associés avec un ou plusieurs anions biologiquement acceptables.

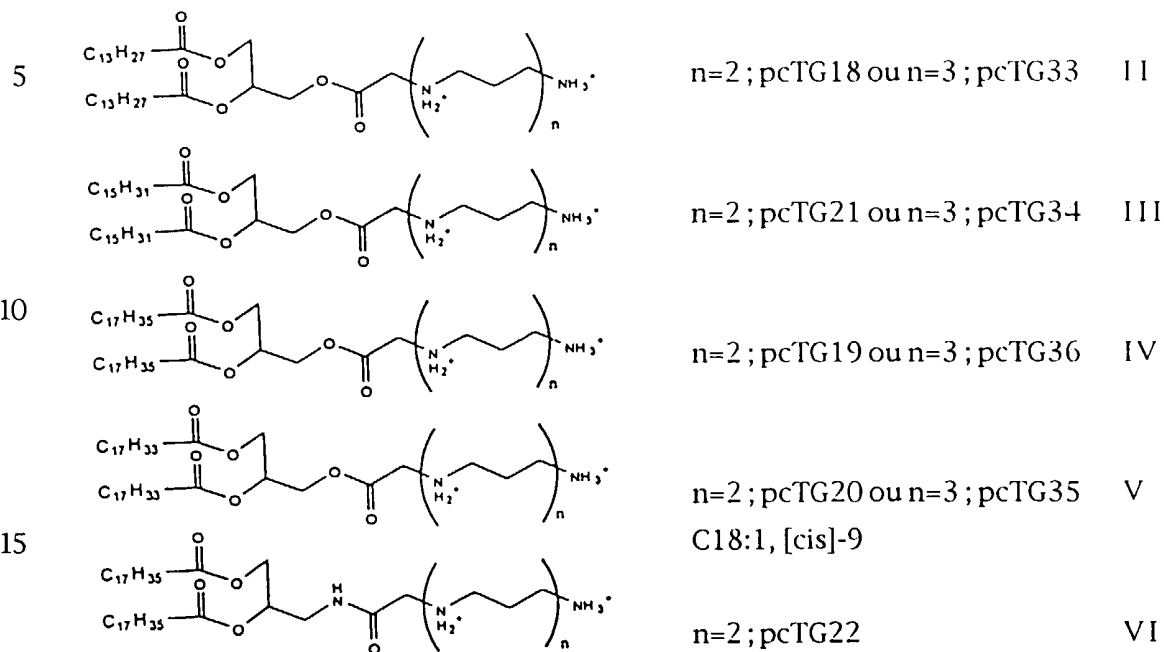
2. Glycérolipide selon la revendication 1, caractérisé en ce que R_1 , R_2 , identiques ou différents sont des radicaux -C(=O) alkyle linéaires ou -C(=O) alcényle linéaires.

3. Glycérolipide selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que R_1 , R_2 , identiques ou différents sont des radicaux -C(=O) alkyle ou -C(=O) alcényle, comprenant 12 à 20 atomes de carbone.

4. Glycérolipide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que n est un nombre entier choisi parmi les nombres 2, 3 ou 4.

5. Glycérolipide selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que m est un nombre entier choisi parmi les nombres 2, 3 ou 4.

6. Glycérolipide selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les glycérolipides sont choisis dans le groupe constitué par les composés de formule suivante :



20 7. Glycérolipide selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le glycérolipide est conjugué à un ou plusieurs ligands d'intérêt par l'intermédiaire d'un des atomes d'azote secondaire ou primaire de la chaîne polyamine.

25 8. Glycérolipide selon la revendication 7, caractérisé en ce que le ligand d'intérêt est choisi dans le groupe constitué par un sucre, un peptide, une hormone, une vitamine, un anticorps, un peptide fusogénique, un peptide de localisation nucléaire.

30 9. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un glycérolipide selon l'une des revendications précédentes et au moins un colipide susceptible d'améliorer la formation d'agrégats lipidiques entre lesdits glycérolipides et des substances actives biologiquement acceptables.

35 10. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce que le colipide est choisi dans le groupe constitué par la phosphatidyléthanolamine (PE) ou un dérivé de la phosphatidyléthanolamine tel que la DOPE ou dioléoyl-phosphatidyléthanolamine.

11. Composition selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce que le rapport en poids glycérolipide/colipide est compris entre 0,1 et 10.
- 5 12. Procédé de préparation d'un complexe glycérolipide/substance active, caractérisé en ce que l'on met en présence un ou plusieurs glycérolipides selon l'une des revendications 1 à 8 ou une composition selon l'une des revendications 9 à 11 avec une ou plusieurs substances actives et en ce que l'on récupère ledit complexe.
- 10 13. Procédé de préparation selon la revendication 12, caractérisé en ce que le rapport entre les charges positives du ou des glycérolipides cationiques et les charges négatives de la substance active est compris entre 0,05 et 20, de préférence entre 5 et 10.
- 15 14. Procédé de préparation selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce que lesdits complexes sont obtenus par mise en solution dans un solvant miscible à l'eau, notamment l'éthanol ou le diméthylsulfoxyde, des glycérolipides ou des compositions selon l'une des revendications 1 à 11 ou par mise en suspension dans une solution de détergent des glycérolipides ou des compositions selon l'une des revendications 1 à 11, puis mélange avec la substance active, et éventuellement dialyse dans le cas de la solution de détergent pour réduire le détergent ou par sonication/extrusion d'une suspension de glycérolipide ou composition selon l'une des revendications 1 à 11 et mélange avec une substance active et récupération des complexes.
- 20 25
15. Complexe de glycérolipide cationique selon l'une des revendications 1 à 8 ou d'une composition selon l'une des revendications 9 à 11 et d'une ou plusieurs substances actives comportant des charges négatives.
- 30
16. Complexe selon la revendication 15, caractérisé en ce que la substance active est choisie parmi les acides nucléiques, les protéines.
- 35 17. Complexe selon l'une des revendications 15 ou 16, caractérisé en ce qu'il présente une taille inférieure à 500 nm, avantageusement inférieure à 200 nm.

18. Complexe selon l'une des revendications 15 à 17, caractérisé en ce qu'il présente une taille inférieure à 100 nm.

5 19. Complexe selon l'une des revendications 15 à 18, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 14.

10 20. Kit pour préparer des complexes selon l'une des revendications 15 à 19, comprenant un ou plusieurs glycérolipides selon l'une des revendications 1 à 8 ou une ou plusieurs compositions selon l'une des revendications 9 à 11.

15 21. Procédé pour introduire une substance active dans une cellule, caractérisé en ce que l'on met en contact un ou plusieurs complexes selon l'une des revendications 15 à 19 avec les cellules cibles.

22. Procédé pour transférer une cellule, caractérisé en ce que l'on met en contact avec les cellules cibles un ou plusieurs complexes selon l'une des revendications 16 à 19 comprenant des acides nucléiques.

20 23. Complexes selon l'une des revendications 15 à 19, pour leur application en tant que produit thérapeutiquement actif, notamment pour transférer un acide nucléique à l'intérieur d'une cellule.

25 24. Complexes selon la revendication 23, caractérisés en ce que le glycérolipide correspond à la formule I où R_1 , R_2 correspondent au radical oléoyle ; $n = 2$; $m = 3$ ou $n = 3$; $m = 3$.

25 25. Complexes selon l'une des revendications 23 ou 24, caractérisés en ce que les cellules sont des cellules musculaires ou pulmonaires.

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	EP 0 685 457 A (NIPPON SHINYAKU CO.,LTD) * document complet * ---	1-5,7,16
X	EP 0 685 234 A (NIPPON SHINYAKU CO.,LTD) * document complet * ---	7,16
X	DE 195 21 412 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) * document complet * ---	1-5,7,16
D,A	WO 94 05624 A (LIFE TECHNOLOGIES,INC.) * revendications * -----	1,7

DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)

C07C
A61K

1

EPO FORM 1503 03.82 (P/4C13)

Date d'achèvement de la recherche

21 octobre 1997

Examineur

Van Bijlen, H

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

- X : particulièrement pertinent à lui seul
- Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
- A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général
- O : divulgation non-écrite
- P : document intercalaire

- T : théorie ou principe à la base de l'invention
- E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
- D : cité dans la demande
- L : cité pour d'autres raisons
- & : membre de la même famille, document correspondant