

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété

Intellectuelle

Bureau international



(43) Date de la publication internationale
12 juin 2008 (12.06.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2008/068429 A2

(51) Classification internationale des brevets : **Non classée**

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/001898

(22) Date de dépôt international :
20 novembre 2007 (20.11.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0610136 20 novembre 2006 (20.11.2006) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). **UNIVERSITE D'ORLÉANS** [FR/FR]; Château de La Source, Avenue du Parc Floral, BP 6749, F-45067 Orléans Cedex 2 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **QUESNI-AUX RYFFEL, Valérie** [FR/FR]; 306, rue du Bois des Près, F-45560 Saint Denis en Val (FR). **PUZO, Germain** [FR/FR]; 2, impasse Goudouli, F-31320 Auzeville (FR). **NIGOU, Jérôme** [FR/FR]; 56, chemin del Prat, F-31320 Auzeville Tolosane (FR). **GILLERON, Martine** [FR/FR]; 56, chemin del Prat, F-31320 Auzeville Tolosane (FR).

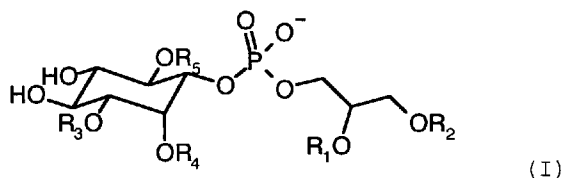
(74) Mandataire : **BREDEMA**; 38 avenue de l'Opéra, F-75002 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: COMPOSITION FOR THE PREVENTION AND/OR TREATMENT OF DISEASES ASSOCIATED WITH TNF AND/OR IL-12 OVEREXPRESSION <0}

(54) Titre : COMPOSITION POUR LA PREVENTION ET/OU LE TRAITEMENT DES MALADIES ASSOCIEES A LA SUR-EXPRESSION DU TNF ET/OU DE L'IL-12



(57) Abstract: {0>The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising at least one compound of the formula (I), or one of the pharmaceutically acceptable salts thereof in which R₁, R₂ and R₃ are independently hydrogen or a R₇-CO- group, where R₇ is a linear, branched or cyclic alkyl, alkene or alkyne group comprising 2 to 24 carbon atoms, R₄ is a hydrogen atom or a mannosyl group substituted at position 6 by an R₆ moiety chosen from the group comprised of a hydrogen atom, a mono-, a di-, a tri-, a tetra- and a penta-mannosyl; as well as the use of such a composition for the preparation of a drug for the prevention or the treatment of a disease associated with the over-expression of TNF and/or IL-12 in a subject. <0}

[Suite sur la page suivante]



WO 2008/068429 A2



RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

Publiée :

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

(57) **Abrégé :** La présente invention concerne une composition pharmaceutique comprenant au moins un composé de formule (I) ou l'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables dans laquelle R_1 , R_2 et R_3 sont indépendamment un hydrogène ou un groupement R_7 -CO- où R_7 est un groupement alkyle, alcène ou alcyne linéaire, ramifié ou cyclique comprenant de 2 à 24 atomes de carbone; R_4 est un atome d'hydrogène ou un groupement mannosyl substitué en position 6 par un résidu R_6 choisi dans le groupe comprenant un atome d'hydrogène et un groupement R_7 -CO-; et R_5 est choisi dans le groupe comprenant un atome hydrogène, un mono-, un di-, un tri-, un tétra- et un penta-mannosyl; ainsi que l'utilisation d'une telle composition pour la fabrication d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie associée à la surexpression du TNF et/ou de l'IL-12 chez un sujet.

**COMPOSITION POUR LA PREVENTION ET/OU LE TRAITEMENT DES
MALADIES ASSOCIEES A LA SUREXPRESSION DU TNF ET/OU DE L'IL-12.**

La présente invention concerne le domaine de la
5 prévention ou du traitement des maladies associées à la
surexpression du TNF et/ou de l'IL-12 chez un sujet.

L'incidence des maladies inflammatoires, comme
l'arthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn, est en
constante augmentation dans les pays développés, notamment en
10 Europe. Pour ces pathologies, le TNF et l'IL-12 constituent
des effecteurs clés.

L'interleukine-12 est une cytokine présentant une
structure unique et des effets pléiotropiques (KOBAYASHI et
al., *J. Exp. Med.*, vol.170, p:827-845., 1989 ; SEDER et *al.*,
15 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.90, p:10188-10192, 1993 ;
LING et *al.*, *J. Immunol.*, vol.154, p:116-127, 1995 ; PODLASKI
et *al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, vol.294, p:230-237, 1995).
Celle-ci consiste en deux sous-unités (p40 et p35) formant
des hétérodimères activateurs ou des homodimères p40
20 inhibiteurs. L'IL-12 est produite majoritairement par les
macrophages et les monocytes essentiellement suite à une
activation d'origine diverse, endogène ou exogène, notamment
par des microorganismes, parasites intracellulaires, des
bactéries ou des produits bactériens. Des études
25 fonctionnelles ont montré que l'IL-12 stimule l'activité
cytolytique des cellules NK (Natural Killer) et des
macrophages. Enfin, l'IL-12 joue un rôle central dans la
différenciation des cellules T de type Th1 et permet
l'induction de la production d'IFN- γ .

30 Le TNF α est une cytokine sécrétée par les monocytes et
les macrophages en réponse à des endotoxines ou d'autres
stimuli. Le TNF α correspond à un homotrimère soluble dont
les sous-unités protéiques présentent 17 kDa (SMITH et *al.*,

J. Biol. Chem., vol.262, p:6951-6954, 1987). Pour des revues sur le TNF, voir BEUTLER et al., (*Nature*, vol.320, p:584, 1986), OLD (*Science*, vol.230, p:630, 1986), et LE et al. (*Lab. Invest.*, vol.56, p:234). Pour autant, des cellules
5 autres que les monocytes et les macrophages sont susceptibles de produire du TNF α . À titre d'exemple, des lignées cellulaires humaines non-monocytiques produisent du TNF (RUBIN et al., *J. Exp. Med.*, vol.164, p:1350, 1986; SPRIGGS et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.84, p:6563, 1987).

10 Le TNF entraîne une réaction pro-inflammatoire qui résulte en un endommagement des tissus, comme l'induction d'une activité pro-coagulante dans les cellules vasculaires endothéliales (POBER et al., *J. Immunol.*, vol.136, p:1680, 1986), l'augmentation de l'adhérence des neutrophiles et des
15 lymphocytes (POBER et al., *J. Immunol.*, vol.138, p:3319, 1987), et la stimulation du relargage de « platelet activating factor » par les macrophages, les neutrophiles et les cellules vasculaires endothéliales (CAMUSSI et al., *J. Exp. Med.*, vol.166, p:1390, 1987).

20 Pour traiter différentes maladies inflammatoires, à savoir l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn et le psoriasis, différentes thérapies « anti-TNF » ont été développées (SCHREIBER et al., 2001) et le nombre de patients traités dans le monde avec ces thérapies atteint déjà le
25 million, majoritairement en Europe et aux USA. La majorité de ces thérapies utilise des anticorps dirigés contre le TNF comme ceux décrits dans le brevet US 5,698,195. À titre d'exemple d'anticorps dirigés contre le TNF et utilisés en thérapie, on peut citer l'HUMIRA® (ABOTT), le CDP-870 (UCB
30 Pharma), l'AFELIMOMAB® (KNOLL Gmbh), l'Infliximab® (Centocor) et le Remicade® (Shering-Plough).

Toutefois ces différents traitements ont révélé des effets indésirables comme l'augmentation de la tendance à développer la tuberculose et des infections opportunistes (MOHAN et al., *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol.15, p :179-184, 2003). Des milliers de cas ont été rapportés chez des patients traités par des thérapies anti-TNF (ASKLING et al., *Arthritis Rheum*, vol.52, p :1986-1992, 2005), la plupart étant des tuberculoses atypiques, difficiles à diagnostiquer et correspondant à des cas de tuberculose disséminée et extrapulmonaire, et probablement liés à la réactivation d'une infection chronique latente (MOHAN et al., *Clin. Infect. Dis.*, vol.39, p :295-299, 2004). Ainsi, jusqu'à 1-2% des patients traités par anti-TNF sont susceptibles de développer une tuberculose et en raison de la diminution du coût des thérapies anti-TNF, le nombre de patients atteints risque d'augmenter. Si la majorité de ces infections correspondent à la réactivation d'une infection latente, près de 30% des cas correspondent à des *primo* infections. Finalement, ces traitements anti-TNF pour des patients ayant un antécédent d'infection à la tuberculose nécessitent un traitement antibiotique pendant près de 9 mois (KEANE, *Rheumatology, Oxford*, 2005).

Les traitements dirigés contre l'IL-12 sont eux à un stade plus précoce de développement avec notamment des anticorps dirigés contre l'IL-12 tels que décrits dans la demande PCT WO9816248, des hyaluronanes spécifiques inhibant l'expression de l'IL-12 et décrits dans la demande de brevet US2004/097465.

Il existe donc encore aujourd'hui un besoin de développer de nouvelles thérapies pour les maladies inflammatoires et d'autres pathologies associées à une surexpression du TNF et/ou de l'IL-12.

Les phosphatidyl-myo-inositol mannosides (PIM) sont des molécules de faible poids moléculaire (~2500) connues comme faisant partie de la paroi mycobactérienne, qui contient également inclue également les lipoarabinomannanes (LAM) et
5 les lipomannanes (LM ; voir figure 1). Les PIM comprennent en général de 1 à 4 chaînes acylés, un résidu glycéro-phospho-myo-inositol et 1 à 6 résidus mannosylés, et peuvent également être synthétisés. Il est connu de l'art antérieur que certains LAM (PILAM) d'espèces à croissance rapide et non
10 virulentes, comme *M. smegmatis*, sont des molécules pro-inflammatoires stimulant la production de TNF et d'IL-12 (CHATTERJEE, *Infect Immun*, 1992 ; GILLERON, *J. Biol. Chem.*, 1997). Il a ainsi été démontré que les PILAM activent les macrophages par une voie TLR2-dépendante en activant la voie
15 de signalisation NF-kappaB (MEANS et al., *J. Immunol.*, vol.163, p :3920-3927, 1999). De même, il a également été mis en évidence une action pro-inflammatoire des LM, notamment les LM de *Mycobacterium bovis* BCG (QUESNIAUX, *J. Immunol.*, 2004 ; VIGNAL, *J. Immunol.*, 2003). Cette activité pro-
20 inflammatoire résulte d'une induction de l'activation des macrophages et des cytokines pro-inflammatoires par le biais du récepteur TLR2 et de la protéine adaptateur MyD88 (QUESNIAUX et al., *J. Immunol.*, 2004). Après une séparation des formes mono-, di-, tri- et tétra-acylées de LM de *M.*
25 *bovis* BCG par une purification extensive, il a pu être démontré que les LM tri- et tétra-acylées présentent une forte activité pro-inflammatoire TLR-dépendante (GILLERON et al., *Chem. Biol.*, vol.13, p :39-47, 2006). Ainsi, le profil d'acylation des LM mycobactériens représente un moyen
30 additionnel de régulation de la réponse inflammatoire de l'hôte.

Les dimannoside (PIM₂) et hexamannoside (PIM₆) phosphatidyl-myo-inositol sont les deux classes les plus

abondantes de PIM chez *Mycobacterium bovis* BCG et *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. PIM₁, PIM₃, PIM₄ et PIM₅ sont observés uniquement en quantité limitée, suggérant qu'ils correspondent à des intermédiaires biosynthétiques.

5 Les PIM sont synthétisés à partir de phosphatidylinositol (PI) par l'addition séquentielle de résidus mannose à des positions spécifiques. Les trois gènes codant pour les mannosyl transférases impliquées dans l'addition des trois premières unités α -Manp sont maintenant connus. L'étape

10 d'initiation est catalysée par l'enzyme pimA (KORDULAKOVA et al., *J. Biol. Chem.*, 2002) et consiste en le transfert d'un résidu α -Manp en position 2 du myo-inositol du PI pour former PIM₁, alors l'addition d'un second résidu α -Manp sur le myo-inositol en position 6 est catalysée par l'enzyme pimB

15 (SCHAEFFER et al., *J. Biol. Chem.*, vol.274, p :31625-31631, 1999). L'élongation s'opère ensuite par le biais de pimC (KREMER et al., *Biochem. J.*, vol.363, p :437-447, 2002) pour obtenir PIM₃, par l'addition d'un troisième résidu α -Manp sur l'unité α -Manp liée en 6 sur l'inositol. La structure des

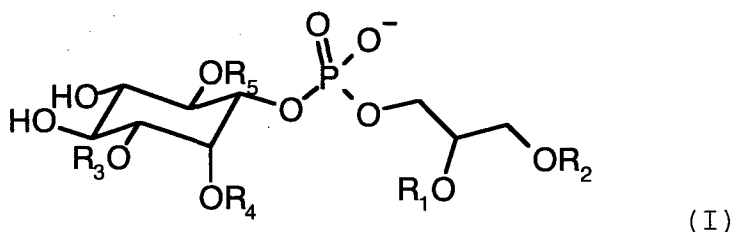
20 différents PIM a pu être déterminée (GILLERON et al., 1999 ; GILLERON et al., 2001 ; GILLERON et al., 2003). L'étude des PIM a en outre permis de caractériser les différentes formes acylées des PIM (GILLERON et al., précité, 2001). Finalement, la synthèse complète de PIM₂ et PIM₆ a pu être effectuée

25 récemment (STADELMAIER et al., *Carbohydr. Res.*, vol.338, p :2557-69, 2003 ; LIU et al., *J. Am. Chem. Soc.*, vol.128, p :3638-48, 2006).

De façon surprenante et inattendue, les inventeurs ont mis en évidence que certaines formes acylées de PIM₂ et de

30 PIM₆ inhibent l'induction de la réponse cytokines pro-inflammatoires.

Ainsi, un premier objet de l'invention consiste en une composition pharmaceutique comprenant au moins un composé de formule (I) :



5 ou l'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables dans laquelle :

- R_1 , R_2 et R_3 sont indépendamment un hydrogène ou un groupement $R_7\text{-CO-}$ où R_7 est un groupement alkyle, alcène ou alcyne linéaire, ramifié ou cyclique
10 comprenant de 2 à 24 atomes de carbone ;
- R_4 est un atome d'hydrogène ou un groupement mannosyl substitué en position 6 par un résidu R_6 choisi dans le groupe comprenant un atome d'hydrogène et un groupement $R_7\text{-CO-}$;
- 15 • R_5 est choisi dans le groupe comprenant un atome hydrogène, un mono-, un di-, un tri-, un tétra- et un penta-mannosyl.

Avantageusement, le ou les groupements mannosyls sont des groupements alpha-mannosyls. De préférence, le groupement R_5
20 est choisi dans le groupe comprenant un atome hydrogène, un mono- et un penta-mannosyl.

Avantageusement encore, le groupement R_7 est un groupement alkyle linéaire. De préférence, le groupement R_7 comprend de 11 à 21 atomes de carbone et de manière
25 particulièrement préférée de 13 à 19 atomes de carbone.

Les composés de formule (I) peuvent être obtenus simplement par l'homme du métier par purification de PIM à partir de mycobactéries et comme décrit dans les exemples ou par synthèse chimique selon le protocole décrit dans
5 STADELMAIER et al. (précité, 2003) ou dans LIU et al. (précité, 2006).

Les sels pharmaceutiquement acceptables des composés de formule (I) ne sont pas limités et incluent, à titre d'exemple, des sels de base inorganique comme les sels de
10 métal alcalin (sels de sodium, de lithium, de potassium, etc.), les sels d'ammonium et les sels de bases organiques comme les sels de diéthylamine, de cyclohexamine et d'acide aminés.

Selon un mode de réalisation préférée, la composition
15 selon l'invention comprend au moins un composé de formule (I) ou l'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables dans laquelle formule (I) :

- L'un des résidus R_1 , R_2 et R_3 est un groupement R_7 -CO-
où R_7 est un groupement alkyle, alcène ou alcyne
20 linéaire, ramifié ou cyclique comprenant de 2 à 24 atomes de carbone, et les deux autres étant des atomes d'hydrogène ;
- R_4 est un atome d'hydrogène ; et
- R_5 est un atome hydrogène.

25 Selon un second mode de réalisation préférée, la composition selon l'invention comprend au moins un composé de formule (I) ou l'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables dans laquelle formule (I) :

- R_1 , R_2 et R_3 étant indépendamment un atome d'hydrogène ou un groupement R_7 -CO- où R_7 est un groupement alkyle, alcène ou alcyne linéaire, ramifié ou cyclique comprenant de 2 à 24 atomes de carbone ;
- 5 • R_4 est mannosyl groupement mannosyl substitué en position 6 par un résidu R_6 choisi dans le groupe comprenant un atome d'hydrogène et un groupement R_7 -CO- ; et
- R_5 est un mannosyl ; où
- 10 • l'un des résidus R_1 , R_2 , R_3 et R_6 est un groupement R_7 -CO- et les trois autres résidus étant des atomes d'hydrogène.

Selon un troisième mode de réalisation préférée, la composition selon l'invention comprend au moins un composé de
15 formule (I) ou l'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables dans laquelle formule (I) :

- R_1 , R_2 et R_3 sont indépendamment un hydrogène ou un groupement R_7 -CO- où R_7 est un groupement alkyle, alcène ou alcyne linéaire, ramifié ou cyclique
20 comprenant de 2 à 24 atomes de carbone ;
- R_4 est mannosyl groupement mannosyl substitué en position 6 par un résidu R_6 choisi dans le groupe comprenant un atome d'hydrogène et un groupement R_7 -CO-; et
- 25 • R_5 est un penta-mannosyl; où
- au moins deux des résidus R_1 , R_2 , R_3 et R_6 correspondent à un groupement R_7 -CO-.

Avantageusement, deux, trois ou quatre des résidus R_1 , R_2 , R_3 et R_6 correspondent à un groupement R_7 -CO-.

Dans la composition selon l'invention, le composé de formule (I) peut être formulé selon des méthodes bien connues
5 comme solubilisé dans un solvant, du DMSO, de l'eau, dans un tampon ou incorporé dans des émulsions et des microémulsions.

La composition selon l'invention peut comprendre en outre des composants bien connus dans le domaine pharmaceutique comme des agents stabilisants, des agents émulsifiants, des
10 agents de tonicité, des agents conservateurs, des colorants, des excipients, des liants, des lubrifiants notamment.

Un deuxième objet de l'invention consiste en l'utilisation d'une composition telle que décrite précédemment pour la fabrication d'un médicament destiné à la
15 prévention ou au traitement d'une maladie associée à la surexpression du TNF et/ou de l'IL-12 chez un sujet.

Par sujet, on entend un mammifère, de préférence un humain.

Par maladie associée à la surexpression du TNF et/ou de
20 l'IL-12, on entend :

A) les maladies immunes ou auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, le rejet de greffe, le diabète sucré, le lupus érythémateux disséminé ou la maladie de Basedow ;

25 B) les infections et notamment les chocs résultant d'une infection chronique ou aigue d'origine bactérienne, virale et/ou parasitaire ;

C) les maladies inflammatoires comme les maladies inflammatoires chroniques (la sarcoïdose, l'affection
30 abdominale inflammatoire, l'arthrite rhumatoïde, la rectocolite hémorragique, la maladie de Crohn) et les

maladies inflammatoires vasculaires (le syndrome de défibrination, l'arthérosclérose, la maladie de Kawazaki) ;

D) les maladies neurodégénératives comme les maladies démyélinisantes (la sclérose en plaques et la myélite transverse aiguë), les maladies extrapyramidales et
5 cérébelleuses (les lésions du système corticospinal ou les désordres des noyaux gris centraux) ;

E) Les pathologies malignes impliquant des tumeurs sécrétant du TNF ou impliquant le TNF comme la leucémie
10 (aiguë, myélocytique, lymphocytaire ou myélodysplasique chronique), le lymphome (Hodgkin ou malin (Burkitt)) ; et

F) l'hépatite induite par l'alcool.

De préférence, ledit médicament est destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie inflammatoire chez
15 un sujet.

Ledit médicament peut être administré par injection (intraveineuse, intramusculaire, sous-cutané, intracutané, etc.), administration nasale, orale, percutanée ou par inhalation. En fonction du mode d'administration, ledit
20 médicament peut être préparé sous forme de solutions, d'émulsions, de cachets, de poudres, d'onguents, de lotions, de gels, de suppositoires ou de sprays.

Dans ledit médicament, la concentration en composé (I) ou de son sel pharmaceutiquement acceptable n'est pas limitée et
25 est comprise de préférence entre 0,1 et 100% (p/p) et de manière particulièrement préférée entre 0,5 et 20%.

Les exemples qui suivent permettent d'illustrer l'invention et sont donnés à titre non-limitatif.

EXEMPLES

1) Purification des différentes formes acylées de phosphatidyl-myo-inositol di- (PIM₂) et hexa- (PIM₆) mannosides :

Un extrait lipidique enrichi en PIM a été obtenu par
5 purification des glycolipides de *Mycobacterium. Bovis* BCG selon le protocole décrit dans VERCELLONE et al. (*J. Biol. Chem.*, vol.264, p :7447-7454, 1989) et dans GILLERON et al. (*J. Biol. Chem.*, vol.276, p :34896-34904, 2001).

Un extrait lipidique contenant des phospholipides
10 insolubles dans l'acétone a ensuite été appliqué sur une colonne de QMA-SPHEROSIL M (BIOSEPPRA S.A.) préalablement équilibrée par des solutions de chloroforme, chloroforme/méthanol (1 :1, v/v), méthanol pour élué les composés neutres. Les phospholipides ont ensuite été élués en
15 différentes fractions à l'aide de solvants organiques comprenant de l'acétate d'ammonium :

* Fraction A : 750 mg de phospholipides (enrichis en phosphatidyl-myo-inositol di-mannosides (PIM₂)) élués avec un
mélange chloroforme/méthanol (1 :2, v/v) comprenant 0,1 M
20 d'acétate d'ammonium ;

* Fraction B (subdivisée en deux fractions) : 440 mg de phospholipides (essentiellement des cardiolipides) et 160 mg de phospholipides (mélange de phosphatidyl-myo-inositol di- (PIM₂) et hexa- (PIM₆) mannosides) élués avec un mélange
25 chloroforme/méthanol (1 :2, v/v) comprenant 0,2 M d'acétate d'ammonium ; et

* Fraction C : 55 mg de phospholipides (enrichie en phosphatidyl-myo-inositol hexamannosides (PIM₆)) élués avec une solution de méthanol comprenant 0,2 M d'acétate
30 d'ammonium.

Des étapes de lyophilisation/resuspension successives ont été effectuées pour éliminer les sels d'acétate d'ammonium de ces différentes fractions.

Les différentes formes acylées ont ensuite été purifiées
5 à partir des fractions obtenues.

Pour les phosphatidyl-*myo*-inositol hexamannosides (PIM₆), 20 mg de phospholipides de la fraction C ont été resuspendues dans une solution d'acétate d'ammonium 0,1M contenant 15% (v/v) de propanol-1 par colonne d'octyl-
10 sépharose CL-4B (PHARMACIA) pré-équilibrée avec le même tampon. La colonne est d'abord éluée avec 50 ml de tampon d'équilibrage puis avec un gradient linéaire de propanol-1 de 15 à 65% (v/v) (250 ml chacun) dans une solution d'acétate d'ammonium 0,1M à un débit de 5 ml/h. Les fractions ont été
15 collectées toutes les 30 minutes. 20 µl de chaque fraction ont été séchées et soumis à une hydrolyse acide (100 µl d'acide trifluoroacétique 2M, 2h à 110°C). Les hydrolysats ont été séchés, resuspendus dans de l'eau puis analysés par chromatographie échangeuse d'anion à pH élevé (HPAEC) pour
20 leur contenu en mannose comme décrit dans GILLERON et al. (Précité, 2003). Les fractions obtenues ont été regroupées en fonction de leur profil de purification et des lyophilisations répétées ont permis d'éliminer les sels d'acétate d'ammonium. Une étape de précipitation à l'acétone
25 a été réalisée pour chaque fraction pour éliminer les contaminants issus du propanol-1. Finalement, 1,2mg, 1mg, 7,5mg et 3mg des fractions I à IV respectivement ont pu être obtenus.

Pour les phosphatidyl-*myo*-inositol dimannosides (PIM₂),
30 20 mg de phospholipides de la fraction A ont été resuspendues dans une solution d'acétate d'ammonium 0,1M contenant 25% (v/v) de propanol-1 par colonne d'octyl-sépharose CL-4B

(PHARMACIA) pré-équilibrée avec le même tampon. La colonne est d'abord éluée avec 50 ml de tampon d'équilibrage puis avec un gradient linéaire de propanol-1 de 25 à 50% (v/v) (125 ml chacun) dans une solution d'acétate d'ammonium 0,1M à un débit de 5 ml/h. Les fractions ont été collectées toutes les 15 minutes. 20 µl de chaque fraction ont été séchées et soumis à une hydrolyse acide (100 µl d'acide trifluoroacétique 2M, 2h à 110°C). Les hydrolysats ont été séchés, resuspendus dans de l'eau puis analysés par chromatographie échangeuse d'anion à pH élevé (HPAEC) pour leur contenu en mannose comme décrit dans GILLERON et al. (précité, 2003). Les fractions obtenues ont été regroupées en fonction de leur profil de purification et des lyophilisations répétées ont permis d'éliminer les sels d'acétate d'ammonium.

2) Préparation des cultures primaires de macrophages :

Des cellules murines de moelle osseuse ont été obtenues à partir de fémurs de lignées de souris sauvages souris C57BL/6 (B6), de souris déficientes en TLR2 (MICHELSEN et al., J. Biol. Chem., vol.276, p : 25680-25686, 2001) ou en SIGN-R1 (LANOUE et al., J. Exp. Med., vol.200, p : 1383-1393, 2004) et des lignées contrôles correspondantes respectivement. Les cellules obtenues ont été cultivées (10⁶/ml) pendant 7 jours dans un milieu DMEM (DUBECCO) complémenté avec 20% de sérum de cheval et 30% de milieu cellulaire conditionné L929 (source de M-CSF, MULLER et al., Mol. Med., vol.2, p :247-255, 1996). Trois jours après renouvellement du milieu, la préparation cellulaire comprend une population homogène de macrophages.

3) Stimulation des macrophages de souris sauvages par le LPS en présence et en l'absence de PIM

Les macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris sauvages B6 ont été cultivés sur des plaques de culture 96 puits à raison de 10^5 cellules par puits puis stimulés par du LPS (100 ng/ml, *Escherichia. coli*, sérotype O111 :B4, SIGMA) avec ou sans PIM (6,7 µg/ml). Les fractions de PIM utilisées correspondaient aux différentes formes acylées de PIM₆ (Ac₁PIM₆ à Ac₄PIM₆) et à deux fractions de PIM₂, une fraction comprenant les formes monoacylées de PI et de PIM₂ (PIC₁₆ et PIM₂C₁₆) et une fraction comprenant les formes tri et tétracylées de PIM₂ (Ac₃PIM₂ et Ac₄PIM₂). Toutes les préparations de PIM lyophilisées utilisées étaient solubilisées dans du DMSO et additionnées aux cultures à une concentration finale non cytotoxique de 1%.

Après une stimulation de 24 heures, les surnageants de culture ont été collectés et analysés pour leur contenu en cytokines TNF-α et IL-12p40 par ELISA (DUOSET) et pour leur contenu en nitrite par la réaction de GRIESS.

Les résultats montrent que les formes di-, tri- et tétra-acylées de PIM₆ ainsi que les formes mono-acylées de PI et de PIM₂ inhibent fortement la synthèse de TNF-α induite chez les macrophages en présence de LPS. En outre la forme mono-acylée de PIM₆ ainsi que les formes tri- et tétra-acylées de PIM₂ inhibent également cette synthèse de TNFα bien que dans une moindre mesure, notamment dans le cas des formes tri- et tétra-acylées de PIM₂ (figure 2). Des résultats similaires ont été obtenus pour le NO et l'expression de l'IL-12p40. Un test de cytotoxicité MTT réalisé sur les mêmes macrophages en présence des différentes fractions de PIM a permis de montrer que seule la fraction mono-acylée de PIM₆ présente une faible cytotoxicité pour les cellules (figure 3).

Dans la mesure où des préparations de PIM₂ et de PIM₆ ont été identifiées initialement comme étant des stimulateurs de la sécrétion de TNF et d'IL-12p40 par des cultures primaires de macrophages, des préparations non fractionnées
5 de PIM (fraction A à C) ont été testées sur la réponse induite par le LPS à la concentration de 20 µg/ml.

Les résultats obtenus n'ont montré aucune inhibition de la réponse inflammatoire (TNF-α et IL-12p40) des cultures primaires de macrophages induite par le LPS en présence des
10 préparations de PIM non fractionnées.

Cela tend à démontrer que la pureté ainsi que la provenance et la nature des formes acylées de PIM₂ et/ou PIM₆ influent sur l'efficacité de l'inhibition de la réponse inflammatoire.

15 4) Stimulation des macrophages de souris déficientes en TLR2 par le LPS en présence et en l'absence de PIM

Il avait été préalablement établi que les préparations de PIM non fractionnées constituaient des agonistes de TLR2 (JONES et al., *J. Leukoc. Biol.*, vol.69, p :1036-1044, 2001)
20 et que la faible activation des macrophages en présence de PIM₂ ou de PIM₆ était dépendante de TLR2 (GILLERON et al., cité précédemment, 2003).

Pour examiner l'hypothèse selon laquelle TLR2 serait impliqué dans l'activité anti-inflammatoire des fractions
25 acylées de PIM, des macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris déficientes en TLR2 ont été cultivés et testés en présence de LPS avec ou sans fraction comprenant différentes formes acylées de PIM₂ ou de PIM₆ comme décrit précédemment (cf. 3)

Les résultats montrent comme précédemment que les formes di-, tri- et tétra-acylées de PIM₆ ainsi que les formes mono-acylées de PI et de PIM₂ inhibent fortement la synthèse de TNF- α induite chez les macrophages en présence de LPS. En
5 outre la forme mono-acylée de PIM₆ ainsi que les formes tri- et tétra-acylées de PIM₂ inhibent également cette synthèse de TNF α bien que dans une moindre mesure, notamment dans le cas des formes tri- et tétra-acylées de PIM₂ (figure 4). En
conséquence, l'effet anti-inflammatoire de ces fractions est
10 indépendant de TLR2.

5) Stimulation des macrophages de souris déficientes en SIGN-R1 par le LPS en présence et en l'absence de PIM

Le récepteur DC-SIGN humain est connu comme étant un récepteur essentiel pour la fixation de *M. tuberculosis* (via
15 les ManLAM et les LM).

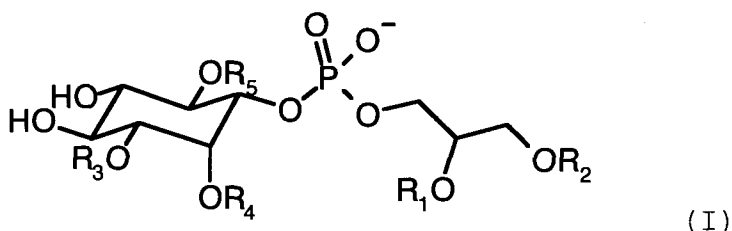
Pour examiner l'hypothèse selon laquelle les récepteurs murins de la famille de DC-SIGN seraient impliqués dans l'activité anti-inflammatoire des fractions acylées de PIM, des macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris
20 déficientes en SIGN-R1 ont été cultivés et testés en présence de LPS avec ou sans fraction comprenant différentes formes acylées de PIM₂ ou de PIM₆ comme décrit précédemment [cf. paragraphe 3)].

Les résultats montrent comme précédemment que les formes
25 di-, tri- et tétra-acylées de PIM₆ ainsi que les formes mono-acylées de PI et de PIM₂ inhibent fortement la synthèse de TNF- α induite chez les macrophages déficients en SIGN-R1 en présence de LPS. En outre, la forme mono-acylée de PIM₆ ainsi que les formes tri- et tétra-acylées de PIM₂ inhibent
30 également cette synthèse de TNF α bien que dans une moindre mesure, notamment dans le cas des formes tri- et tétra-

acylées de PIM₂ (Figure 5). En conséquence, l'effet anti-inflammatoire de ces fractions est indépendant de SIGN-R1.

REVENDICATIONS

1) Une composition pharmaceutique comprenant au moins un composé de formule (I) :



ou l'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables dans laquelle :

- R₁, R₂ et R₃ sont indépendamment un hydrogène ou un groupement R₇-CO- où R₇ est un groupement alkyle, alcène ou alcyne linéaire, ramifié ou cyclique comprenant de 2 à 24 atomes de carbone ;
- R₄ est un atome d'hydrogène ou un groupement mannosyl substitué en position 6 par un résidu R₆ choisi dans le groupe comprenant un atome d'hydrogène et un groupement R₇-CO- ; et
- R₅ est choisi dans le groupe comprenant un atome hydrogène, un mono-, un di-, un tri-, un tétra- et un penta-mannosyl.

2) La composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit groupement R₇ est un groupement alkyle linéaire.

3) La composition selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit groupement R₇ comprend de 11 à 21 atomes de carbone, de préférence de 13 à 19 atomes de carbone.

4) La composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, laquelle composition comprend au moins un composé de formule (I) ou l'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables dans laquelle formule (I) :

- 5 • L'un des résidus R_1 , R_2 et R_3 est un groupement R_7 -CO- où R_7 est un groupement alkyle, alcène ou alcyne linéaire, ramifié ou cyclique comprenant de 2 à 24 atomes de carbone, et les deux autres étant des atomes d'hydrogène ;

- 10 • R_4 est un atome d'hydrogène ; et
- R_5 est un atome hydrogène.

5) La composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, laquelle composition comprend au moins un composé de formule (I) ou l'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables dans laquelle formule (I) :

- 15 • R_1 , R_2 et R_3 étant indépendamment un atome d'hydrogène ou un groupement R_7 -CO- où R_7 est un groupement alkyle, alcène ou alcyne linéaire, ramifié ou cyclique comprenant de 2 à 24 atomes de carbone ;
- 20 • R_4 est mannosyl groupement mannosyl substitué en position 6 par un résidu R_6 choisi dans le groupe comprenant un atome d'hydrogène et un groupement R_7 -CO- ; et
- R_5 est un mannosyl ; où
- 25 • l'un des résidus R_1 , R_2 , R_3 et R_6 est un groupement R_7 -CO- et les trois autres résidus étant des atomes d'hydrogène.

6) La composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, laquelle composition comprend au moins un composé de formule (I) ou l'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables dans laquelle formule (I) :

- R_1 , R_2 et R_3 sont indépendamment un hydrogène ou un groupement R_7 -CO- où R_7 est un groupement alkyle, alcène ou alcyne linéaire, ramifié ou cyclique comprenant de 2 à 24 atomes de carbone ;
- R_4 est mannosyl groupement mannosyl substitué en position 6 par un résidu R_6 choisi dans le groupe comprenant un atome d'hydrogène et un groupement R_7 -CO-; et
- R_5 est un penta-mannosyl; où
- au moins deux des résidus R_1 , R_2 , R_3 et R_6 correspondent à un groupement R_7 -CO-.

7) La composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que deux, trois ou quatre des résidus R_1 , R_2 , R_3 et R_6 correspondent à un groupement R_7 -CO-.

8) La composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un composé choisi dans le groupe comprenant les agents stabilisants, les agents émulsifiants, les agents de tonicité, les agents conservateurs, les colorants, les excipients, les liants, les lubrifiants.

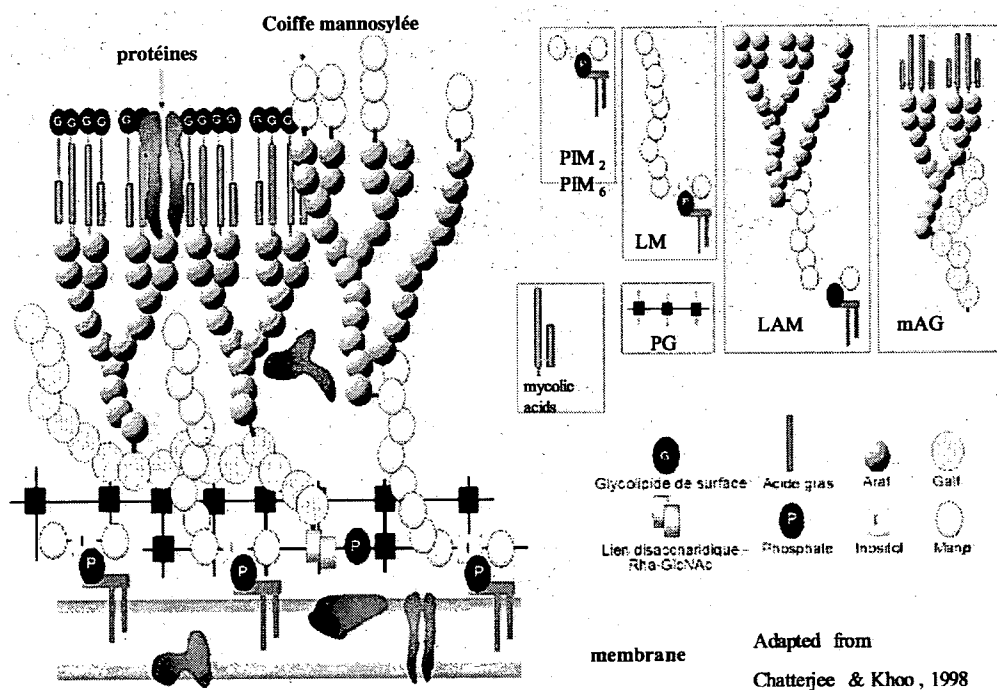
9) Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour la fabrication d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie associée à la surexpression du TNF et/ou de l'IL-12 chez un sujet.

10) L'utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que ladite maladie associée à la surexpression du TNF et/ou de l'IL-12 est choisie dans le groupe comprenant les maladies immunes ou auto-immunes, les infections, les
5 maladies inflammatoires, les maladies neurodégénératives, les pathologies malignes impliquant des tumeurs sécrétant du TNF ou impliquant le TNF et l'hépatite induite par l'alcool.

11) L'utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que ladite maladie associée à la surexpression du TNF et/ou de l'IL-12 est choisie parmi les maladies
10 inflammatoires.

1/5

**Figure 1 : Représentation schématique de l'enveloppe de
*M. tuberculosis***



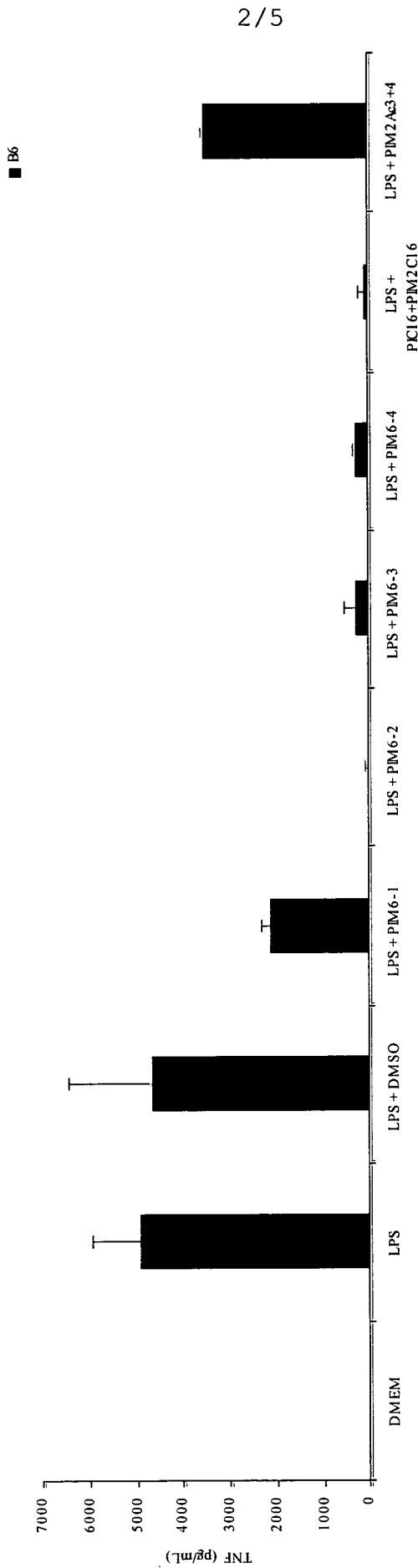


Figure 2

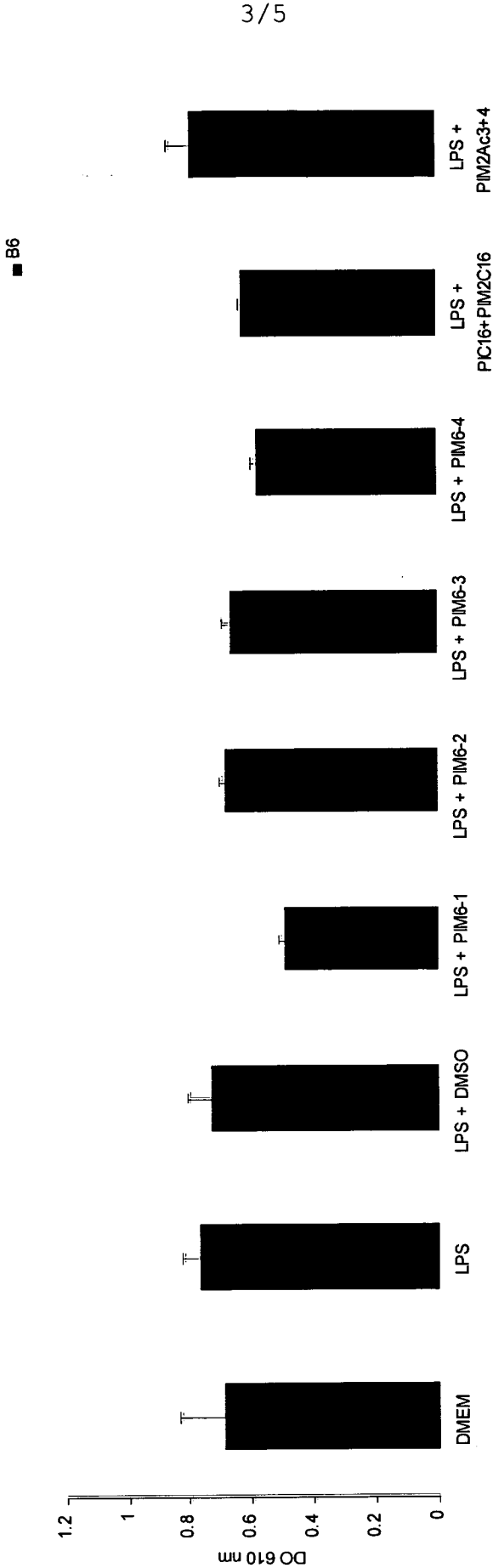


Figure 3

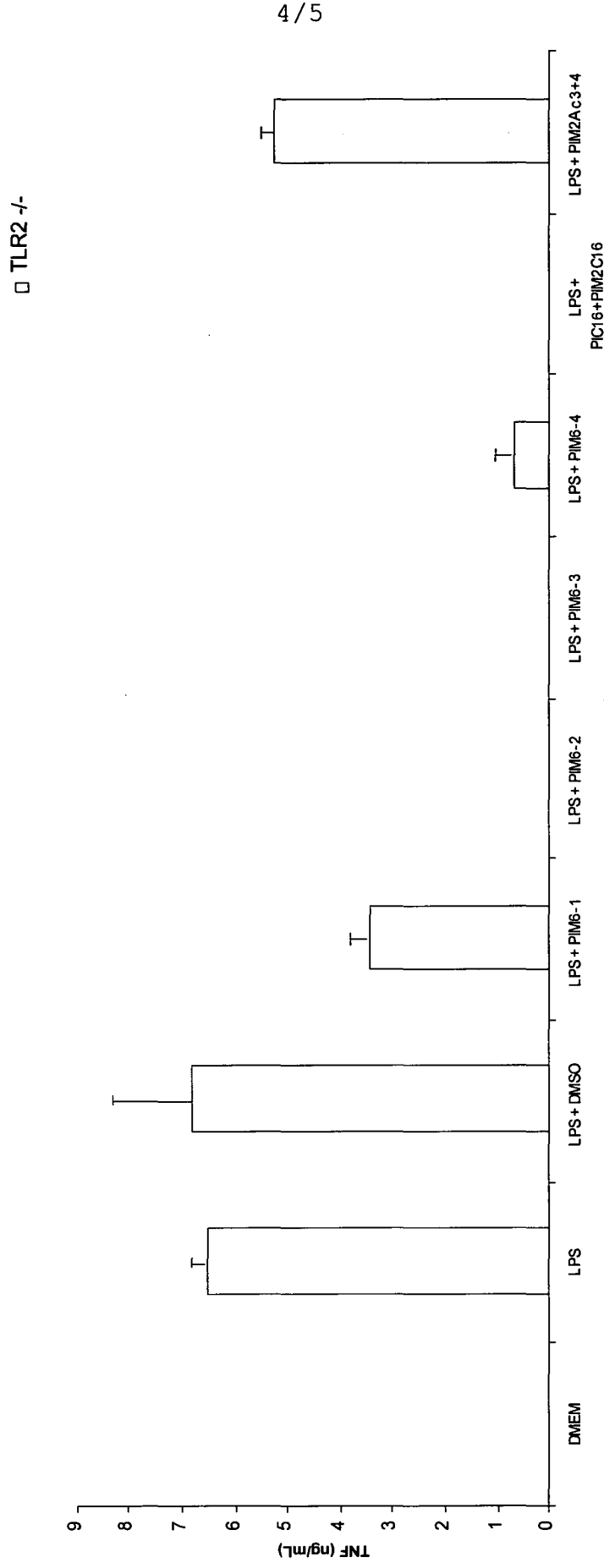


Figure 4

5/5

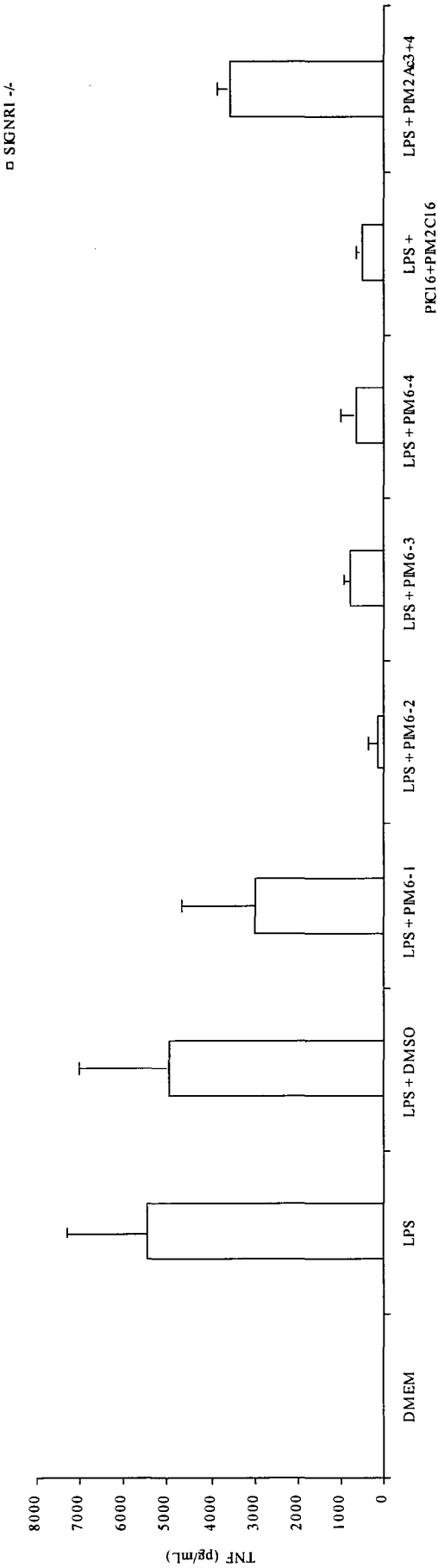


Figure 5