

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 913 335**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **07 53675**

⑤① Int Cl⁸ : **A 61 K 8/44 (2006.01), A 61 P 31/04**

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 06.03.07.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 12.09.08 Bulletin 08/37.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *GEFFARD MICHEL* — FR.

⑦② Inventeur(s) : *GEFFARD MICHEL.*

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : *AQUINOV.*

⑤④ **UTILISATION DE CONJUGUES D'ACIDES GRAS ET DE POLY-L-LYSINE POUR LUTTER CONTRE DES
MICROORGANISMES PATHOGENES.**

⑤⑦ L'objet de l'invention est l'utilisation d'au moins un
conjugué entre au moins un acide gras ou dérivé d'acide
gras, et au moins une poly-L-Lysine pour lutter contre des
microorganismes pathogènes.

FR 2 913 335 - A1



UTILISATION DE CONJUGUES D'ACIDES GRAS ET DE POLY-L-LYSINE POUR LUTTER CONTRE DES MICROORGANISMES PATHOGENES

La présente invention se rapporte à l'utilisation de poly-L-Lysine greffée avec au moins un acide gras ou dérivé d'acide gras, pour lutter contre des bactéries, des levures et des champignons pathogènes.

Les microorganismes pathogènes sont à l'origine de multiples maladies infectieuses, responsables de nombreux décès dans le monde.

La découverte des antibiotiques a permis de lutter efficacement contre certaines de ces maladies bactériennes et mycosiques.

Les antibiotiques sont des substances naturelles produites par des bactéries du sol, certains champignons ou des produits de synthèse, qui à faibles concentrations, agissent sur d'autres microorganismes en les tuant ou en ralentissant leur croissance, sans être toxiques pour l'homme ou l'animal.

Toutefois l'usage massif des antibiotiques a engendré des phénomènes de résistance aux bactéries, levures et champignons pathogènes, les microorganismes s'adaptant aux changements environnementaux par leur multiplication rapide.

En outre, plus la résistance est élevée, plus on prescrit des antibiotiques nouveaux, ce qui a favorisé l'émergence de nouvelles résistances aux anti-bactériens et anti-fongiques classiques et entraîné l'apparition des maladies nosocomiales ou la résurgence de maladies infectieuses telle que la tuberculose.

Il est donc impératif de trouver et développer de nouveaux systèmes capables de lutter efficacement contre les microorganismes pathogènes, en vue d'éradiquer les maladies infectieuses dont ils sont responsables.

C'est l'objectif de la présente invention qui se propose, pour y répondre, d'utiliser
5 des acides gras greffés sur un polypeptide spécifique.

En particulier, la présente invention vise l'utilisation d'au moins un conjugué entre au moins un acide gras ou dérivé d'acide gras, et au moins une poly-L-Lysine, pour fabriquer un médicament destiné à lutter contre des microorganismes pathogènes.

10 L'invention est maintenant décrite en détail.

Par microorganismes pathogènes on entend des bactéries, des levures et/ou des champignons, responsables d'infections humaines ou animales.

Par poly-L-Lysine, on entend une poly-L-Lysine linéaire ou ramifiée.

Avantageusement les conjugués selon l'invention sont capables de détruire ou de
15 ralentir la croissance des microorganismes pathogènes.

On suppose que la poly-L-Lysine s'absorbe sur certaines parois cellulaires et est ensuite internalisée avec les composés acides gras spécifiques interférant dans le métabolisme des microorganismes. L'effet bactéricide propre de la poly-L-Lysine linéaire ou ramifiée est amplifié par la présence des acides gras.

20 Selon un autre avantage les acides gras du conjugué utile selon l'invention ne sont pas métabolisés lorsqu'ils sont administrés à l'homme ou à l'animal. Les conjugués circulent dans l'organisme jusqu'à fixation sur le microorganisme ciblé.

En fonction de l'activité spécifique recherchée, les conjugués utiles selon l'invention sont réalisés avec des acides gras adaptés à un effet particulier. C'est
25 la conformation spécifique des acides gras utilisés avec la poly-L-Lysine qui donne l'effet bactéricide, anti-mycosique ou anti-lévurien au conjugué.

Des conjugués préférés pour la présente invention sont des conjugués monofonctionnels c'est-à-dire des conjugués de la poly-L-Lysine avec un seul

acide gras ou dérivé d'acide gras, et des conjugués bifonctionnels c'est-à-dire des conjugués de la poly-L-Lysine avec deux acides gras et/ou dérivés d'acide gras différents.

Parmi les conjugués monofonctionnels particulièrement adaptés pour la présente invention on peut citer notamment l'Acide Acétique-poly-L-Lysine ou acétyl-poly-L-Lysine, l'Acide Pyruvique-poly-L-Lysine ou pyruvyl-poly-L-Lysine, l'Acide Propionique-poly-L-Lysine ou propionyl-poly-L-Lysine, l'Acide Butyrique-poly-L-Lysine ou butyryl-poly-L-Lysine, l'Acide Lactique-poly-L-Lysine ou lactyl-Poly-L-Lysine, l'Acide Succinique-poly-L-Lysine ou succinyl-poly-L-Lysine, l'Acide glutarique-poly-L-Lysine ou glutaryl-poly-L-Lysine, l'Acide caproïque-poly-L-Lysine ou caproyl-poly-L-Lysine, l'Acide caprylique-poly-L-Lysine ou caprylyl-poly-L-Lysine l'Acide caprique-poly-L-Lysine ou capryl-poly-L-Lysine, l'Acide Azélaïque poly-L-Lysine ou azélayl-poly-L-Lysine, l'Acide Laurique-poly-L-Lysine ou lauryl-poly-L-Lysine, l'Acide Myrisitique-poly-L-Lysine ou myristyl-poly-L-Lysine, l'Acide Palmitique-poly-L-Lysine ou palmityl-poly-L-Lysine, l'Acide Palmitoléique-poly-L-Lysine ou palmitoleyl-poly-L-Lysine, ou encore l'Acide Oléique-poly-L-Lysine ou oléyl-poly-L-Lysine.

A titre d'exemple, le conjugué lauryl-poly-L-Lysine est particulièrement actif sur les staphylocoques, et le conjugué pyruvyl-poly-L-Lysine est particulièrement actif sur les streptocoques, les citrobacters et/ou les levures telle que *Candida albicans* par exemple.

Parmi les conjugués bifonctionnels particulièrement adaptés pour la présente invention on peut citer à titre d'exemple le capryl-poly-L-Lysine-laurique ou le farnésyl-poly-L-Lysine Oléique.

Selon un aspect de l'invention, on utilise préférentiellement des concentrations en acide gras ou dérivés d'acides gras pour réaliser les conjugués de l'ordre de 20 à 100 milligrammes/litre. Ces faibles concentrations ont pour avantage de conduire à des produits stables et non toxiques.

4

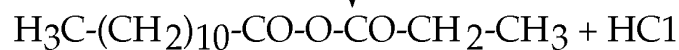
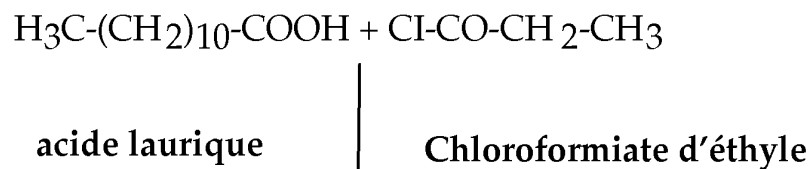
Les conjugués selon l'invention peuvent être utilisés pour fabriquer des médicaments pour lutter contre des infections en général.

Un médicament particulièrement efficace présentant une large activité bactéricide comprendrait par exemple une association de pyruvyl-poly-L-Lysine à 5×10^{-3} Molaire et de lauryl-poly-L-Lysine-Capryl à 5×10^{-4} Molaire.

Les conjugués selon l'invention peuvent également être utilisés en cosmétologie.

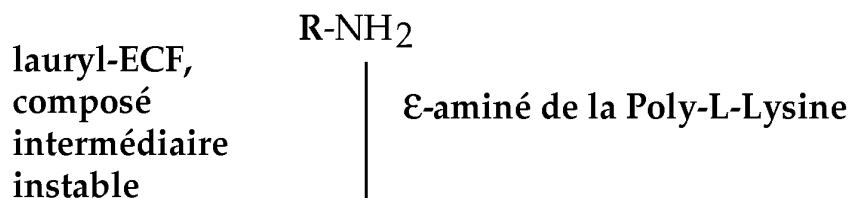
Les conjugués utiles selon l'invention peuvent être synthétisés selon le schéma réactionnel suivant, illustré avec l'acide laurique :

10



20

+



30



lauryl-Poly-L-Lysine
acide acétique

Les acides gras ou dérivés d'acides gras n'étant pas solubles en milieux aqueux, ils sont repris dans un solvant organique, par exemple et préférentiellement le méthanol anhydre.

40 On adjoint aux acides gras du chloroformiate d'éthyle qui active leur groupement carboxylique.

Le composé d'activation obtenu est ensuite mis en présence sous agitation d'une solution aqueuse contenant de la poly-L-Lysine, ce qui provoque immédiatement une réaction d'amidification.

On obtient ainsi un conjugué acide(s) gras-poly-L-Lysine, ou dérivé(s) d'acide(s) gras-poly-L-Lysine qui est finalement purifié par dialyse pour éliminer les solvants, l'excès d'acide(s) gras et les produits secondaires de la réaction d'amidification.

Ce conjugué acide(s) gras-poly-L-Lysine, ou dérivé(s) d'acide(s) gras-poly-L-Lysine peut éventuellement être associé à un ou plusieurs conjugués anti-oxydant(s)-poly-L-Lysine et/ou à un ou plusieurs conjugués acide(s) aminé(s)-poly-L-Lysine. La solution obtenue a également un effet bactéricide.

Des essais ont été effectués pour montrer l'efficacité des conjugués utiles selon l'invention.

Différentes souches de microorganismes ont été utilisées pour ces essais :

- 15 - des souches bactériennes Gram⁻ :
- *Citrobacter koserii*
 - *Citrobacter diversus*
 - *Escherichia coli* (plusieurs sérotypes)
 - *Klebsiella pneumoniae*
 - 20 • *Klebsiella oxytoca*
 - *Morganella morganii*
 - *Proteus mirabilis*
 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - *Pseudomonas putida*
 - 25 • *Serratia marcescens*
 - *Alcalescens diaspar*
 - *Enterobacter hafniae*

6

- des souches bactériennes Gram⁺ :

- Staphylococcus aureus
- Streptococcus epidermis
- Streptococcus A, B, D

5 • Mycobacterium tuberculosis

- des souches bactériennes multirésistantes aux antibiotiques (Staphylococcus aureus, Alcaescens dispar , Escherichia coli, Staphylococcus epidermis, Pseudomonas aeruginosa),

- des levures Candida albicans de 6 sous-groupes différents.

10 Les différents essais ont été réalisés selon le mode opératoire décrit en suivant. Les effets anti-bactéricides et anti-fongiques des solutions testées ont été évalués sur des boîtes contenant des milieux de cultures appropriés à la croissance :

- gélose chocolat haemophilus pour la culture de Neisseria,

15 - gélose BCP pour les germes peu exigeants,

- gélose Mueller Hinton 2 (MH2-F) pour la majorité des souches bactériennes sauf Neisseria et les streptocoques,

- gélose columbia ANC (COL ANC-F) pour les streptocoques,

- gélose Sabouraud gentamicine chloramphénicol (SAB GENTA CHL-F)

20 pour les candidas albicans et les levures en général, et

- milieu Leowenstein, Coletsos pour Mycobacterium tuberculosis.

Les boîtes sont recouvertes par 1ml de solution bactérienne ou mycosique à la concentration de 0,5 à 1 de Mac Farland (lecture au densitomètre) soit $1,5 \times 10^8$ bactéries/ml.

25 La boîte est ensuite séchée 15 minutes à 37°, et on applique 2 gouttes (50µl) de chaque solution à tester.

La boîte de culture est recouverte après 16 heures d'incubation à 37°.

Chaque plage de lyse due à l'activité anti-bactérienne ou anti-fongique des conjugués est mesurée. La lecture de l'effet bactéricide ou antifongique est mesurée en cm^2 .

Les résultats de différents tests sont présentés ci-dessous.

5

- 1 - Comparaison de l'activité bactéricide des conjugués selon l'invention avec celle d'acides gras libres

Les résultats sont évalués visuellement selon l'échelle suivante :

0 pas d'activité, culture négative

10 + correspond à 10^3 colonies

++ correspond à 10^4 colonies

+++ correspond à 10^6 colonies, et

++++ correspond à 10^7 colonies.

Ils sont présentés dans le tableau ci-dessous :

15

Longueur de la chaîne	Nom de l'acide gras non lié	Activité bactéricide sur Escherichia coli ou Staphylococcus aureus de l'acide gras seul	Activité bactéricide sur Escherichia coli ou Staphylococcus aureus du conjugué
C2-C4	C2 = acetate	0	+++
	C3 = propionate	0	+++
	C4 = butyrate	0	+++
	C5 = acide valérique	0	+++
C6	Acide Caproïque	++	+++
C8	Acide Caprylique	+++	+++
C10	Acide Caprique	++++	+++
C12	Acide Laurique	++++	++
C14	Acide Myristique	+	+
C16	Acide Palmitique	0	+
C16 : 1	Acide Palmitoléique	++	+++
C18 : 1	Acide Oléique	+	+
Farcys	Farnesyl-cystéine	0	++

- 2 - Efficacité de conjugués d'acides gras et poly-L-Lysine sur
certains microorganismes

La concentration en acides gras sur la poly-L-Lysine est de 5×10^{-3} M.

5

	Lactyl-poly-L-Lysine (H ₃ C-CHOH-CO-NH-PL)	Propionyl-poy-L-lysine (CH ₃ -CH ₂ -CO-PL)	Pyruvyl-Poly-L-Lysine (H ₃ C-CO-CO-PL)	Butyryl-poly-L-Lysine (H ₃ C-CH ₂ -CH ₂ -CO-PL)	Acétyl-poly-L-Lysine (H ₃ C-CO-PL)
Staphylococcus aureus.	1,82 cm ²	2,3 cm ²	2,13 cm ²	1,82 cm ²	1,68 cm ²
Escherichia coli.	1,92 cm ²		2,09 cm ²	2,65 cm ²	0
Pseudomonas aeruginosa.	2,34 cm ²	0	1,32 cm ²		
Candida albicans.	1,05cm ²	2,13cm ²	2,46 cm ²	2,3 cm ²	1,97cm ²
Citro bacter koserii.	1,13 cm ²	0	1,54 cm ²	1,77 cm ²	1,77 cm ²
Klebsiella oxytoca.	0	0	1,33 cm ²	0	3,14 cm ²
Streptocoque B.	peu sensible	0	1,77cm ² qqls colonies	1,33 cm ² qqls colonies	3,14 cm ² colonies
Streptocoque D.	2,01 cm ²	0	2,27 cm ²	0	4,15cm ²
Enterobacter Hafniae	1,44cm ²	1,12 cm ²	2,27 cm ²	2,03 cm ²	2,71 cm ²
Alcaescens Diaspar.	1,53cm ²	1,13cm ² inhibition partielle	1,53cm ²	0,85 cm ²	1,4cm ²
Morganella Morganii.	0	0	0	0	0
Proteus Mirabilis.	0	0	0	0	0
Nesseria	1,65cm ²	1,13 cm ²	2,01cm ²	0,78 cm ²	2,27cm ²

- 3 - Comparaison de l'activité bactéricide des conjugués selon l'invention avec celle d'acides gras conjugués avec une poly-Ornithine (ORN)

Les solutions testées sont à la même concentration en acides gras que celles avec les conjugués poly-L-Lysine, soit 5×10^{-3} d'acides gras liés.

5

	Lactyl-ORN	Pyruvyl-ORN	Butyryl-ORN	Acétyl-ORN
Staphylococcus aureus.	0	0	0	0
Pseudomonas aeruginosa.	0	0	0	0
Escherichia coli.	0	0	0	0

Ces résultats montrent bien que c'est la conformation des acides gras liés aux acides aminés de la poly-L-Lysine qui donne l'effet bactéricide et antimycosique.

10

- 4 - Efficacité d'un mélange de conjugués selon l'invention sur des souches multi-résistantes

Les exemples de bactéricidie sont obtenus avec la préparation capryl-poly-L-Lysine-lauryl et pyruvyl-poly-L-Lysine à différentes concentrations : à 5×10^{-4} M (5D4), à 5×10^{-3} M (5D3) et à 5×10^{-2} M (5D2).

15

	Pyruvyl-Poly-L-Lysine (5D4) + Capryl-Poly-L-Lysine-Lauryl (5D4)	Pyruvyl-Poly-L-Lysine (5D3) + Capryl-Poly-L-Lysine-Lauryl (5D4)	Pyruvyl-Poly-L-Lysine (5D3) + Capryl-Poly-L-Lysine-Lauryl (5D2)
Staphylococcus aureus.	1,33 cm ²	1,65 cm ²	2,27 cm ²
Escherichia coli.	Non testé	1,54 cm ²	1,77 cm ²
Pseudomonas spp	Non testé	2,86 cm ²	Non testé
Staphylococcus epidermidis	Non testé	2,54 cm ²	Non testé

Plus de 15 souches multirésistantes prélevées sur des malades ont toutes été sensibles à ces préparations de mélanges de conjugués selon l'invention.

- 5 - Efficacité de l'activité bactéricide des conjugués selon l'invention sur la souche Mycobacterium tuberculosis

La souche Mycobacterium tuberculosis est cultivée pendant un mois et demi sur milieu de Loewenstein Coletsos : des colonies apparaissent à la concentration de 10^6 .

On met en contact du Mycobacterium tuberculosis une solution pyruvyl-poly-L-Lysine à $5 \times 10^{-3} M$ + capryl-poly-L-Lysine-Lauryl à $5 \times 10^{-4} M$.

On obtient une culture négative.

La solution contenant le mélange de conjugués selon l'invention a donc un effet bactéricide sur Mycobacterium tuberculosis.

- 6 - Activité bactéricide des conjugués selon l'invention

On ajoute à 1ml de pyruvyl-poly-L-Lysine à $5 \times 10^{-3} M$ + capryl-poly-L-Lysine-Lauryl à $5 \times 10^{-4} M$, les souches suivantes :

- Staphylococcus aureus (densité de Mac Farland = 4, $1,2 \times 10^9$ bactéries/ml)

- Escherichia coli (densité de Mac Farland = 2, 6×10^8 bactéries/ml)

- Pseudomonas aeruginosa (densité de Mac Farland = 2, 6×10^8 bactéries/ml).

Les mesures de l'activité bactéricide après 1 heure, 3 heures, 5 heures et 24 heures de contact sont répertoriées dans le tableau suivant :

	Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa
1 heure	+++ 10 ⁶	+++ 10 ⁶	+++ 10 ⁶
3 heures	Négative	+ 10 ³	+++ 10 ⁶
5 heures	Négative	Négative	+ 10 ³
24 heures	Négative	Négative	Négative

- 7 - Evaluation de la concentration minimale inhibitrice des conjugués selon l'invention

Sur une souche multirésistante de staphylococcus epidermidis, la concentration minimale inhibitrice pour une solution capryl-poly-L-Lysine-lauryl + pyruvate-poly-L-Lysine est :

- inférieure à $1,25 \times 10^5 \text{M}$ pour capryl-poly-Lysine-lauryl, et
- inférieure à $1,25 \times 10^4 \text{M}$ pour pyruvate-poly-Lysine.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un conjugué entre au moins un acide gras ou dérivé d'acide gras, et au moins une poly-L-Lysine, pour fabriquer un médicament destiné à lutter contre des microorganismes pathogènes.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le
5 conjugué est obtenu par la mise en œuvre d'un procédé comprenant notamment les étapes suivantes :
 - adjonction de chloroformiate à au moins un acide gras ou dérivé d'acides gras,
 - mise en présence du composé obtenu d'une solution aqueuse
10 contenant de la poly-L-Lysine,
 - réaction d'amidification et obtention du conjugué acide(s) gras - poly-L-Lysine ou dérivé(s) d'acide(s) gras-poly-L-Lysine.
3. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le ou les acide(s) gras ou dérivé(s) d'acide(s) gras sont utilisés dans des
15 concentrations comprises entre 20 à 100 milligrammes/litre pour réaliser les conjugués.
4. Utilisation selon l'une quelconque des précédentes revendications, caractérisée en ce que au moins un conjugué est monofonctionnel.
5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes,
20 caractérisée en ce que au moins un conjugué est le conjugué lauryl-poly-L-Lysine pour fabriquer un médicament destiné à lutter contre des staphylocoques.
6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que au moins un conjugué est le conjugué pyruvyl-poly-Lysine pour fabriquer un médicament destiné à lutter contre des citrobacters et/ou
25 des streptocoques et/ou des levures.

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que au moins un conjugué est bifonctionnel.

8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'on associe un conjugué lauryl-poly-L-Lysine-Capryl et un
5 conjugué pyruvyl-poly-L-Lysine pour fabriquer un médicament destiné à lutter contre *Mycobacterium tuberculosis*.

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que le au moins un conjugué est associé à un ou plusieurs
10 conjugués anti-oxydant(s)-poly-L-Lysine et/ou à un ou plusieurs conjugués acide(s) aminé(s)-poly-L-Lysine.

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0753675 FA 690993**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 28-09-2007

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2006035431 A	06-04-2006	AU 2005288519 A1	06-04-2006
		CA 2581883 A1	06-04-2006
		EP 1793837 A2	13-06-2007

WO 9615810 A	30-05-1996	AT 202487 T	15-07-2001
		AU 694825 B2	30-07-1998
		AU 4181196 A	17-06-1996
		CA 2205557 A1	30-05-1996
		DE 69521521 D1	02-08-2001
		DE 69521521 T2	25-04-2002
		DK 792167 T3	29-10-2001
		EP 0792167 A1	03-09-1997
		ES 2161915 T3	16-12-2001
		FR 2727117 A1	24-05-1996
		GR 3036710 T3	31-12-2001
		JP 10511643 T	10-11-1998
		NZ 297040 A	28-05-1999
		PT 792167 T	28-12-2001
US 6114388 A	05-09-2000		
