(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 649 321**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **89 09209**

(51) Int Cl[5] : A 61 K 31/70.

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 7 juillet 1989.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de la mise à disposition du public de la demande :** BOPI « Brevets » n° 2 du 11 janvier 1991.

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE, établissement public.* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** Trung Le Doan ; Christine Chavany.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire(s) :** S.C. Ernest Gutmann-Yves Plasseraud.

(54) Compositions à base de dérivés nucléotidiques, leurs procédés de préparation, et leurs utilisations notamment en tant que compositions pharmaceutiques.

(57) La présente invention concerne des compositions comprenant des composés constitués de dérivés nucléotidiques, d'intérêt thérapeutique et/ou clinique, codant, le cas échéant, pour un polypeptide déterminé, ces dérivés étant hydrophiles, chargés positivement ou négativement, modifiés ou non, et associés à un dérivé hydrophobe possédant, le cas échéant, une charge complémentaire de celle des dérivés nucléotidiques susmentionnés.

L'invention a plus particulièrement pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant des compositions telles que définies ci-dessus, et leurs utilisations, notamment pour le traitement de maladies virales, parasitaires ou tumorales.

FR 2 649 321 - A1

COMPOSITIONS A BASE DE DERIVES NUCLEOTIDIQUES, LEURS PROCEDES DE PREPARATION, ET LEURS UTILISATIONS NOTAMMENT EN TANT QUE COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES.

La présente invention a pour objet des compositions à base de dérivés nucléotidiques. Elle a également pour objet les procédés de préparation de ces compositions, ainsi que leur utilisation, notamment dans le domaine pharmaceutique.

Les nucléosides modifiés encore appelés "pseudo-nucléosides" sont utilisés depuis plusieurs années avec succès contre les maladies d'origine virale, dont le dernier en date l'AZT (3'-azidothymidine) utilisé dans le traitement des malades atteints du SIDA (Roland K. ROBINS, Synthetic Antiviral Agents, C and EN (1986) 28-40). Ces composés agissent en tant que terminateurs de chaînes dans les processus d'élongation (Transcription inverse par exemple). Ces composés ne sont actifs qu'après transformation dans les cellules en dérivés triphosphate correspondants. Ce processus étant l'étape limitante dans le mode d'action de ces médicaments, il est donc préférable de les utiliser directement sous forme triphosphate.

Malheureusement, la forme triphosphate du nucléoside franchit très mal la membrane cellulaire, ce qui n'est pas le cas pour le nucléoside correspondant.

D'autres composés de même nature chimique mais portant un nombre de motifs plus élevé par molécule comme les oligonucléotides ou les polynucléotides, dont

certains possèdent des propriétés antivirales reconnues.

En effet, les dérivés oligonucléotidiques, ont connu un développement considérable ces dix dernières années en raison de leur aptitude à inhiber sélectivement l'expression de gènes (en particulier des gènes de virus, de parasites, et des oncogènes) dont les produits d'expression sont impliqués directement ou indirectement dans le développement d'une maladie déterminée.

Il a été montré également que les oligonucléotides de séquences complémentaires de certaines régions du génome du virus du SIDA (virus HIV) sont capables d'inhiber la prolifération de ce virus in vitro (S. AGRAWAL et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1988) 85, 7079-7083).

Cependant, l'utilisation de ces dérivés nucléotidiques (de structure naturelle ou modifiée), notamment en culture de cellules ou en application thérapeutique, se heurte au problème, d'une part, de leur grande sensibilité à la dégradation par des enzymes de l'organisme, telles que les nucléases, et, d'autre part, de leur faible pénétration cellulaire.

Ces problèmes ont été partiellement résolus par modification chimique du squelette phosphodiester donnant lieu à de nouvelles classes d'oligonucléotides tels que les oligonucléotides phosphonates, phosphotriesters, et phosphorothioates (notamment ceux décrits dans le brevet français n°84.11795 déposé le 25/07/1984, et dans S. AGRAWAL et al, précedemment cité) et encore les oligonucléotides en configuration α

(C. HELENE and N.T. THUONG, Nucleic Acids and Molecular Biology, vol. 2, ed. by F. ECKSTEIN and D.M. J. LILLEY, Springer Verlag, 1988, pp 105-123).

Certains de ces composés ainsi modifiés présentent effectivement une relativement bonne résistance aux nucléases. Cependant, leur pouvoir de pénétration cellulaire reste très faible, notamment pour ceux de ces composés qui sont chargés, tels que par exemple les oligonucléotides en configuration α et les oligonucléotides phosphorothioates.

Enfin, des polynucléotides comme le [poly(I):poly(C)] sont connus pour leur capacité d'induire la production d'interférons (N.B. FINTER in "Interferons and Interferon Inducers", American Elsevier, New York, (1973))

La présente invention a précisément pour but de résoudre à la fois le problème de la sensibilité aux nucléases et de la faible pénétration dans les cellules de ces composés nucléotidiques, qu'ils soient sous forme naturelle ou modifiée.

Il est bien entendu que dans ce qui précède et ce qui suit, l'expression dérivés nucléotidiques, regroupe à la fois les dérivés mononucléotidiques mono, di ou triphosphates, les dérivés oligonucléotidiques et les dérivés polynucléotidiques, qu'ils soient sous forme naturelle ou modifiée.

L'invention concerne des compositions caractérisées en ce qu'elles comprennent des composés constitués de dérivés nucléotidiques d'intérêt thérapeutique et/ou clinique, ces composés étant associés à des vecteurs de transport physiologiquement

acceptables. Ces vecteurs de transport sont susceptibles, d'une part, de protéger lesdits composés de l'action des enzymes de l'organisme et, d'autre part, de permettre la pénétration de ces composés à travers la membrane cellulaire des cellules contenant une (ou plusieurs) séquence d'ADN, ou d'ARN, endogène ou exogène, cette séquence étant directement ou indirectement impliquée dans le processus du développement d'une pathologie déterminée.

Par dérivés nucléotidiques d'intérêt thérapeutique ou clinique entrant dans la constitution des compositions de l'invention, on entend plus particulièrement tout dérivé susceptible soit d'être directement actif contre une maladie déterminée, soit de permettre la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic in vitro de cette maladie.

Parmi ces dérivés nucléotidiques, on distingue en premier lieu les dérivés mononucléotidiques constitués d'un nucléotide naturel ou modifié et comportant dans leur structure un, deux ou trois groupes phosphates.

Les dérivés oligonucléotidiques, dits "antisens" sont susceptibles de reconnaître spécifiquement une séquence d'ADN ou d'ARN (ou séquence cible), représentative d'une pathologie déterminée et/ou directement liée au processus du développement de cette pathologie. Ces dérivés antisens comprennent généralement dans leur structure une séquence complémentaire de la séquence cible.

Ces séquences cibles d'ADN, ou d'ARN, ainsi reconnues, sont soit des séquences endogènes (ou encore naturellement présentes dans le génome humain ou

animal), soit des séquences exogènes (ou encore n'appartenant pas au génome humain ou animal d'origine, mais provenant de l'extérieur, notamment par l'intermédiaire de bactéries, de parasites, ou de virus).

D'une manière générale, les dérivés d'intérêt thérapeutique compris dans les compositions de l'invention se fixent aux séquences sus-mentionnées de manière à inhiber le processus de développement d'une maladie déterminée provoquée lors de l'expression de cette séquence. En d'autres termes, ils sont actifs par "blocage sélectif" de l'expression d'un gène dont le produit d'expression est responsable d'une maladie déterminée.

Par blocage sélectif, on entend aussi bien le blocage d'une séquence impliquée dans l'initiation, la propagation, ou la terminaison de la réplication d'un gène, lors de la transcription d'un, ou de plusieurs gènes, et/ou de la maturation ou de la traduction des ARN messagers correspondants.

Il peut s'agir également d'une action de protection qui rend la séquence "bloquée" inaccessible pour une protéine, une enzyme ou un composé chimique par exemple.

Les dérivés d'intérêt clinique compris dans les compositions de l'invention sont généralement des sondes nucléotidiques susceptibles de s'hybrider spécifiquement dans des conditions déterminées avec des séquences d'ADN ou d'ARN spécifiques d'un virus, d'une bactérie ou d'un parasite, suite à une infection d'un individu, ou d'un animal, ou encore à une pathologie

issue d'un dérèglement du fonctionnement de certains gènes d'un individu (par exemple tumeurs, pathologies liées à des dérèglements hormonaux et/ou enzymatiques).

D'une manière générale, les dérivés nucléotidiques (comportant généralement de 1 à 50 nucléotides, et de préférence de 12 à 20 nucléotides) ou polynucléotidiques en simple et en double brins (comportant généralement de 10^2 à 10^9 nucléotides, et de préférence 500 à 20.000 nucléotides) utilisés dans le cadre de la présente invention, même s'ils comportent certaines modifications, sont de préférence hydrophiles et comportent des charges, plus particulièrement des charges négatives.

Les dérivés nucléotidiques naturels sont plus avantageux à utiliser dans le cadre de la présente invention, compte tenu de leur simplicité d'obtention et de leur faible prix de revient, que les dérivés nucléotidiques modifiés qui risquent, pour certains d'entre eux, de ne pas s'hybrider correctement avec la séquence cible.

A titre d'exemples, de dérivés mononucléotidiques particulièrement intéressants dans le cadre de la présente invention, on peut citer ceux décrits dans l'article de ROBINS et al précédemment cité.

Parmi les oligonucléotides et polynucléotides particulièrement intéressants à utiliser dans cette invention, on citera, notamment ceux à activité antitumorale (notamment par blocage des oncogènes) ou à activité antivirale, ou antiparasitaire, sous forme chargée, tels que décrits dans le brevet français n°

84.11795, et dans l'article d'AGRAWAL et al sus-mentionnés.

Les vecteurs de transport sus-mentionnés sont de préférence biocompatibles et biodégradables, hydrophobes et de nature polymérique ou protéique.

Parmi les vecteurs de transport préférés entrant dans la constitution des compositions de l'invention, on peut citer les protéines basiques (telles que les histones) et les protéines plasmatiques, notamment les lipoprotéines (telles que les lipoprotéines de faible densité, ou encore LDL), ou encore la sérum-albumine, les anticorps monoclonaux, les hormones.

Par leur propriété de reconnaissance d'épitopes très spécifiques situés sur des protéines exprimées à la surface de cellules bien déterminées, les anticorps monoclonaux, ou encore les hormones, constituent des vecteurs particulièrement avantageux pour un transport ciblé de ces dérivés.

Outre le fait que les lipoprotéines protègent les dérivés nucléotidiques de l'action des nucléases, elles permettent également un transport ciblé de ces dérivés vers les cellules cibles (notamment vers les cellules de certaines tumeurs) sur lesquels sont exprimés un grand nombre de récepteurs de ces lipoprotéines. Compte tenu de leur caractère non immunogène et de leur grande variété disponible actuellement sur le marché, les lipoprotéines représentent des vecteurs de transport très avantageux.

D'autres vecteurs de transport particulièrement préférés de l'invention sont représentés par les particules submicroscopiques à base de polymères. Par

exemple, des nanoparticules faites à base de polymères d'isobutylcyanoacrylate (telles que décrites dans le brevet européen n° 064967 déposé le 23/04/1982), ou encore les microparticules faites à partir de copolymères de l'acide lactique et de l'acide glycolique (G. SPENLEHAUER, M. VERT, J.P. BENOIT, F. CHABOT and M. VEILLARD, J. Control. Release, (1988) 7, 217-229) peuvent être utilisées pour l'application envisagée dans le cadre de la présente invention.

Par nanoparticules, on entend toutes particules du type sus-mentionné et possédant un diamètre moyen de l'ordre d'environ 100 à environ 500 nanomètres. De préférence, les nanoparticules utilisées dans le cadre de la présente invention ont un diamètre moyen de l'ordre de 200 nanomètres.

Ces nanoparticules présentent l'avantage de protéger les dérivés nucléotidiques des effets des nucléases de l'organisme, et favorisent la pénétration de ces dérivés nucléotidiques dans les cellules.

Des compositions particulièrement préférées de l'invention, sont celles contenant à titre de vecteur de transport, des protéines plasmatiques telles que sus-mentionnées, ces protéines étant elles-mêmes encapsulées dans des particules polymériques telles que les nanoparticules définies ci-dessus.

Toutefois, compte tenu de leur caractère hydrophile et de leurs charges, les dérivés nucléotidiques préférés de l'invention, ne peuvent être associés tels quels aux vecteurs de transport essentiellement hydrophobes entrant dans la constitution des compositions selon l'invention.

Or la présente invention fournit précisément des dérivés nucléotidiques hydrophiles et chargés associés de façon stable à des vecteurs de transport hydrophobes.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet des compositions caractérisées en ce qu'elles comprennent des composés constitués de dérivés mononucléotidiques, oligonucléotidiques ou polynucléotidiques d'intérêt thérapeutique et/ou clinique, tels que mentionnés ci-dessus, ces dérivés étant hydrophiles, chargés positivement ou négativement, modifiés ou non, et associés à un dérivé hydrophobe possédant, le cas échéant, une charge complémentaire de celle des dérivés nucléotidiques sus-mentionnés, ces composés étant eux-mêmes associés à des vecteurs de transport biocompatibles, notamment de nature polymérique et/ou protéique tels que définis ci-dessus.

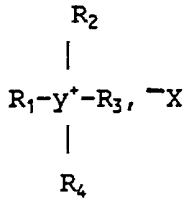
Le dérivé hydrophobe sus-mentionné est avantageusement biocompatible et biodégradable.

Parmi les dérivés hydrophobes, non chargés utilisables dans le cadre de la présente invention, on citera les dérivés de la porphyrine, de la daunomycine, les lipides etc..., lesquels dérivés hydrophobes sont reliés au dérivé nucléotidique par l'intermédiaire d'une liaison covalente.

Des dérivés hydrophobes particulièrement avantageux, notamment dans le cas où les dérivés nucléotidiques utilisés sont chargés, se présentent sous forme ionique (anionique ou cationique) et possédent des charges complémentaires de celles des dérivés devant être associés aux vecteurs de transport.

Ces dérivés hydrophobes sont capables de se lier d'une part aux dérivés nucléotidiques, par interaction électrostatique avec la charge de ces derniers dérivés, et d'autre part avec les régions hydrophobes du vecteur par leur partie hydrophobe.

A titre d'exemple d'ions hydrophobes préférés de l'invention, on citera notamment les cations issus des sels de formule générale



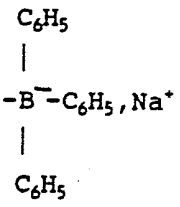
dans laquelle

- X représente un halogène, notamment un atome de chlore ou de brome,
- Y représente un atome d'azote ou de phosphore.
- les groupes R_1, R_2, R_3, et R_4, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, ou une fonction hydroxyle, ou un halogène ou un groupe alcoyle ou alcoxy, linéaire ou ramifié, ayant de 1 à 25 atomes de carbone, le cas échéant substitué par une ou plusieurs fonctions hydroxyles, ou un groupe aryle, notamment un groupe phényle ou polyaromatique, pouvant contenir un ou plusieurs hétéroatomes tels que N, S, P Se, etc...,
- l'un au moins de ces groupes R_1, R_2, R_3, ou R_4, représente un groupe alcoyle ou aryle tel que défini ci-dessus.

Il va de soi que les sels d'ammonium (dans lesquels Y représente un atome d'azote) ou de

phosphonium (dans lesquels Y représente un atome de phosphore) sus-mentionnés sont particulièrement appropriés pour la préparation de compositions de l'invention comprenant des dérivés nucléotidiques chargés négativement.

Dans le cas où les dérivés nucléotidiques sont chargés positivement, on utilisera à titre de dérivé hydrophobe un anion, notamment celui du tétraphénylborure de sodium de formule



D'autres dérivés hydrophobes particulièrement préférés de l'invention sont constitués par des amines à chaîne grasse comportant une charge positive, à pH physiologique, et dont les chaînes hydrocarbonées comprennent notamment de 5 à 25 atomes de carbone, comme par exemple la stéarylamine, la sphingosine, ou encore par les lipides ou les phospholipides, et dont les chaînes hydrocarbonées comprennent notamment de 10 à 25 atomes de carbone comportant également une charge positive dans leur structure.

L'association du dérivé nucléotidique avec un dérivé hydrophobe chargé tel que décrit ci-dessus, se fait avantageusement, par simple mise en contact du dérivé hydrophobe, présentant une charge complémentaire de celle du dérivé nucléotidique, avec ledit dérivé nucléotidique dans des conditions permettant la

formation d'une liaison du type électrostatique entre ces deux dérivés.

Cette dernière solution représente une variante préférée du procédé de préparation des compositions de l'invention. En effet, l'établissement d'une simple liaison électrostatique entre le dérivé hydrophobe et le dérivé nucléotidique ne modifie en rien les propriétés structurelles et fonctionnelles de ce dernier, à la différence d'une liaison de covalence qui risque de modifier les propriétés sus-mentionnées et par conséquent d'altérer les effets thérapeutiques et/ou de diagnostic desdits dérivés nucléosidiques ou nucléotidiques.

Dans le cadre de cette variante préférée du procédé de l'invention, l'étape de mise en contact du dérivé nucléotidique avec le dérivé hydrophobe sous forme ionique, est avantageusement réalisée de manière à ce que le rapport

$$r = \frac{\text{charge du dérivé hydrophobe}}{\text{charge du dérivé nucléotidique,}}$$

soit compris entre 1 et 200, de préférence entre 10 et 50.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation de ces compositions comprenant principalement les étapes suivantes :

- le cas échéant, la mise en contact du dérivé nucléotidique avec un dérivé hydrophobe, de préférence chargé, lorsque ledit dérivé nucléotidique est

hydrophile et chargé, dans des conditions, telles que décrites ci-dessus, autorisant la formation d'une liaison entre eux, étant entendu que l'expression "liaison" s'entend comme le résultat d'une affinité mutuelle, notamment chimique (par exemple résultant d'un couplage), ou physique (complexation par exemple) ou électrostatique,

- l'incorporation du composé constitué du dérivé nucléotidique lié, le cas échéant, au dérivé hydrophobe sus-mentionné, dans le vecteur de transport, par interpénétration mutuelle mécanique, notamment par encapsulation, ou encore par adsorption de l'un dans l'autre.

Dans le cas de l'utilisation d'un vecteur de transport de nature polymérique, l'étape d'encapsulation du composé constitué du dérivé nucléotidique lié, le cas échéant, au dérivé hydrophobe, dans ce vecteur est réalisée :

- soit par mise en présence dudit composé avec les unités monomères du vecteur suivie d'une étape de polymérisation dudit vecteur englobant alors ledit composé,
- soit au cours même de la polymérisation, c'est-à-dire après le démarrage de la polymérisation mais avant l'achèvement de celle-ci,
- soit par mise en présence dudit composé avec le vecteur sous forme polymérisée, dès lors que l'on peut régler les conditions de cette mise en présence de manière à permettre une rétention physique (ou une adsorption) suffisamment forte dudit composé sur le polymère, pour que le composé adsorbé ou retenu sur le

polymère puisse atteindre en même temps que ce dernier les cellules cibles.

Des conditions optimales dans lesquelles l'encapsulation dudit composé dans des particules submicroscopiques, notamment dans des nanoparticules d'alkylcyanoacrylate telles que les nanoparticules d'isobutylcyanoacrylate, peut être réalisée, sont plus particulièrement décrites dans le brevet européen 064967 sus-mentionné, ainsi que dans la description détaillée qui suit.

Ainsi, l'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de préparation d'une composition telle que décrite ci-dessus, qui comprend l'ajout sous agitation, du composé lié, le cas échéant, à un dérivé hydrophobe, à une solution comprenant un polymère du type sus-mentionné, soit sous forme monomère, soit en cours de polymérisation, soit sous forme polymérisée.

Il peut être davantage précisé que dans le cadre de l'utilisation des nanoparticules sus-mentionnées, l'étape d'encapsulation desdits composés se fera avantageusement en solution à un pH physiologique voisin de 7, et à des concentrations en NaCl (0,15 M) proches des concentrations salines physiologiques.

L'adsorption desdits composés aux protéines plasmatiques, notamment aux lipoprotéines, se fait avantageusement dans les conditions semblables à celles énoncées ci-dessus.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation comprenant une étape d'adsorption desdits composés (constitués de dérivés nucléotidiques associés, le cas échéant, à un dérivé hydrophobe), à

des protéines plasmatiques notamment des lipoprotéines, suivie d'une étape d'encapsulation du complexe précédemment obtenu dans des particules polymériques, notamment dans des nanoparticules telles que définies ci-dessus.

L'invention a également pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant au moins une des compositions sus-mentionnées en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

De telles compositions pharmaceutiques sont plus particulièrement destinées au traitement de maladies d'origine virale (notamment du SIDA), bactérienne, parasitaire, ou tumorale ou de toute autre pathologie liée à une modification du génome d'un individu

Les dosages et les voies d'administration de ces compositions peuvent varier selon le type d'infection devant être traitée.

Dans le cas le plus général, les compositions pharmaceutiques de l'invention se présentent sous forme de préparations injectables en association avec un liquide pharmaceutiquement acceptable, à pH physiologique.

L'invention a également pour objet une méthode de transfection cellulaire comprenant la mise en contact d'une composition selon l'invention comprenant un dérivé nucléotidique déterminé, notamment un ou plusieurs gènes déterminés, avec des cellules pour permettre l'internalisation du dérivé nucléotidique sus-mentionné dans lesdites cellules.

L'invention concerne plus particulièrement une méthode de transfection telle que définie ci-dessus,

dans laquelle ledit dérivé nucléotidique déterminé comprend une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide déterminé, et, le cas échéant, des éléments de régulation permettant l'expression de ce fragment d'acide nucléique dans la cellule hôte, notamment un promoteur reconnu par les polymérases de ladite cellule hôte. L'obtention du polypeptide déterminé se fait par mise en culture des cellules hôtes transformées dans un milieu de culture approprié, suivie de la récupération du polypeptide déterminé à partir de ces cellules ou du milieu de culture.

Ainsi, l'invention a pour objet des compositions telles que décrites ci-dessus dans lesquelles le dérivé nucléotidique associé au vecteur de transport, et, le cas échéant, à un dérivé hydrophobe, code pour un polypeptide déterminé.

L'invention a plus particulièrement pour objet des compositions du type sus-mentionné dans lesquelles le dérivé nucléotidique déterminé est inséré dans la séquence nucléotidique d'un vecteur de gènes, notamment d'un plasmide, ce plasmide étant lui-même associé à un dérivé hydrophobe sus-mentionné, l'ensemble constitué par ce plasmide associé au dérivé hydrophobe, étant lui-même associé à un vecteur de transport tel que décrit ci-dessus.

Ce dérivé nucléotidique compris dans ce plasmide peut également posséder une structure nucléotidique telle qu'elle permette le blocage de la synthèse d'une protéine déterminée. Dans ce cas, une telle composition est particulièrement avantageuse, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, pour le

traitement de pathologies liées à la synthèse d'une (ou plusieurs) protéine déterminée indésirable.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore aux cours de la description qui suit d'exemple d'obtention de compositions de l'invention. Il va de soi que ces exemples revêtent aucun caractère limitatif.

I - ASSOCIATION OLIGONUCLEOTIDES-NANOPARTICULES

Expérience standard :

Dans 1 ml de milieu de polymérisation contenant 1% de Dextran 70 et la quantité nécessaire de HCl pour que le pH du milieu soit égal à 3, on ajoute 10 µl de monomère IsoButyl CyanoAcrylate (IBCA) sous agitation magnétique énergique pour disperser le monomère. Au bout de 10 à 15 minutes où la polymérisation se traduit par une opalescence du milieu, on ajoute la solution éthanolique (80 µl à 200 µl) contenant le complexe entre le mono ou oligonucléotide et l'ion hydrophobe, étudié dans des proportions définies par r, r étant égal au rapport des charges positives aux charges négatives de l'oligonucléotide. On laisse le mélange en contact avec les nanoparticules en cours de formation pendant 45 minutes sous agitation. On neutralise ensuite le milieu avec 7 µl de tampon phosphate 1 M ajusté à pH 7, puis on ajoute 30 µl de NaCl 5 M pour ajuster la concentration ionique du milieu à 0.15 M NaCl. On laisse tourner 30 minutes pour équilibrer le mélange et on centrifuge la solution à 35000 g à 10°C. L'oligonucléotide étant marqué à une extrémité par le phosphore 32, la mesure de la radioactivité du

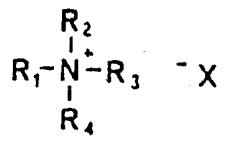
surnageant S et du culot C permet de déterminer le taux d'encapsulation $\tau = 100\ (C/C + S)$.

Les ions hydrophobes utilisés dans les essais qui suivent sont représentés sur les tableaux 1 à 3 suivants :

TABLEAU 1

Code	Formule	Composé
ST	$CH_3-(CH_2)_{17}-NH^+_3$	Stearylamine (1-amino-octadécane)
SP	$CH_3-(CH_2)_{14}-CHOH-CH-CH_2OH$ $\quad\quad\quad

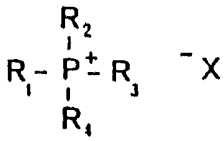
Tableau 2



Code	R_1	R_2, R_3, R_4	X	COMPOSE
A1	CH_3	CH_3	Cl	Tétraméthylammonium, chlorure
A2	n-C_4H_9	n-C_4H_9	Cl	Tétrabutylammonium, chlorure
A3	n-C_6H_{13}	n-C_6H_{13}	Cl	Tétrahexylammonium, chlorure
A4	n-C_8H_{17}	n-C_8H_{17}	Cl	Tétraoctylammonium, chlorure
A5	n-$C_{16}H_{33}$	CH_3	Br	Hexadecyltrimethylammonium, bromure (CTAB)

2649321

Tableau 3



Code	R_1	R_2, R_3, R_4	X	COMPOSE
P1	CH_3	CH_3	Cl	Tétraméthylphosphonium, chlorure
P2	n-C_4H_9	n-C_4H_9	Cl	Tétrabutylphosphonium, chlorure
P3	C_6H_5	C_6H_5	Cl	Tétraphénylphosphonium, chlorure
P4	n-$C_{16}H_{33}$	n-C_4H_9	Br	Hexadecyltributylphosphonium, bromure (CTPB)

2649321

A) Encapsulation de l'adénosine triphosphate

Les essais d'encapsulation de l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) ou du didesoxyadénosine 5'-triphosphate (dd-ATP) en présence d'amines à longue chaîne comme la stéarylamine ou la sphingosine a permis d'atteindre des taux d'encapsulation importants (Tableau 4). Dans ces expériences, le marqueur utilisé est le dérivé radioactif marqué au phosphore-32 correspondant.

TABLEAU 4

N° expérience	Cation	XTP[a]	r	τ%
1	Stearylamine	ATP	200	55
2		dd-ATP	200	46
3	Sphingosine	ATP	200	73
4		dd-ATP	200	77

(a) : La concentration en XTP est maintenue constante et égale à $1,50 \times 10^{-5}$ M en phosphate et celle du cation à 3×10^{-3} M d'où r = 200.

B) Encapsulation d'oligonucléotides

1. <u>Octathymidylate : $p(dT)_8$</u>

La concentration en $p(dT)_8$ est maintenue constante et égale à $1,5 \times 10^{-5}$ M en phosphate ou 1,9 µM en oligonucléotide. Dans les expériences qui suivent, l'oligonucléotide est marqué au ^{32}P à l'extrémité 5' et purifié par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les variations des taux d'encapsulation du cation P_3 (cf tableau 3) marqué au carbone ^{14}C et du $p(dT)_8$ (marqué au ^{32}P) (méthode de double marquage) en fonction de la concentration en P_3 sont présentées sur la figure 1. Dans cette figure, les valeurs de τ représentent celles obtenues sans rajout de NaCl en fin de polymérisation. Les valeurs de τ présentées dans les autres tableaux et figures sont obtenues en présence de 0,15 M NaCl final. Dans le Tableau 5, les résultats montrent que dans de nombreux cas, on peut encapsuler l'oligonucléotide à plus de 90 %, tout en évitant le phénomène de floculation des nanoparticules.

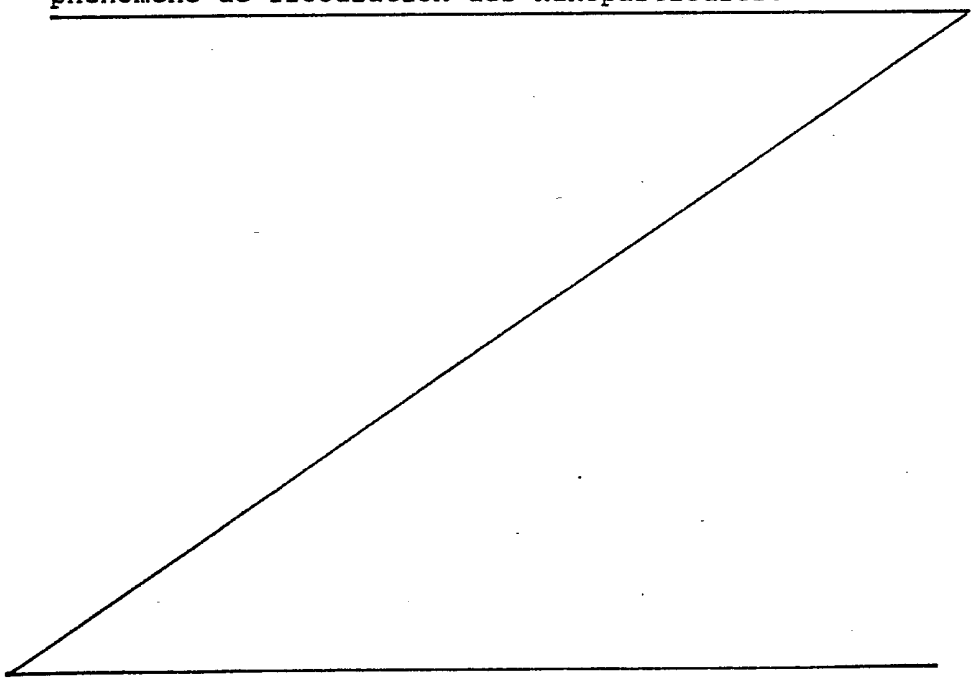


TABLEAU 5

N° d'expérience	Cation	r	τ(%)
5	Tetraoctyl N^+(A4)	200	98[f]
6		50	31,3
7	CTAB (A5)	200	90
8		50	66
9	Tétraphényle P^+(P3)	200	68,4
10		50	41,6
11	CTPB(P4)	200	78,5[f]
12		50	31,6
13	Stearylamine (ST)	200	95[f]
14		50	51,5
15	Sphingosine (SP)	200	96,8
16		50	88
17		20	41,6

f : Observation d'agrégation des nanoparticules ou

floculation aux rapports r élevés en cation hydrophobe.

2. Hexadecathymidylates $p(dT)_{16}$

Dans ces expériences, la concentration en oligonucléotide est égale à 1,84 μM ou 2,94 x 10^{-5} en phosphate. Les résultats présentés dans le Tableau 6 montrent que les cations comportant une longue chaîne hydrocarbonée permettent d'atteindre des taux d'encapsulation élevés (> 95 %) pour des rapport r relativement faibles (r = 20). De plus, l'utilisation de faibles concentrations de cation permettent de réaliser des suspensions stables de nanoparticules sauf dans le cas du DOTMA. L'évolution du taux d'encapsulation (τ) en fonction du rapport r (nombre de cations par phosphate) est présenté sur la figure 2 pour les 3 cations A5,ST et SP.

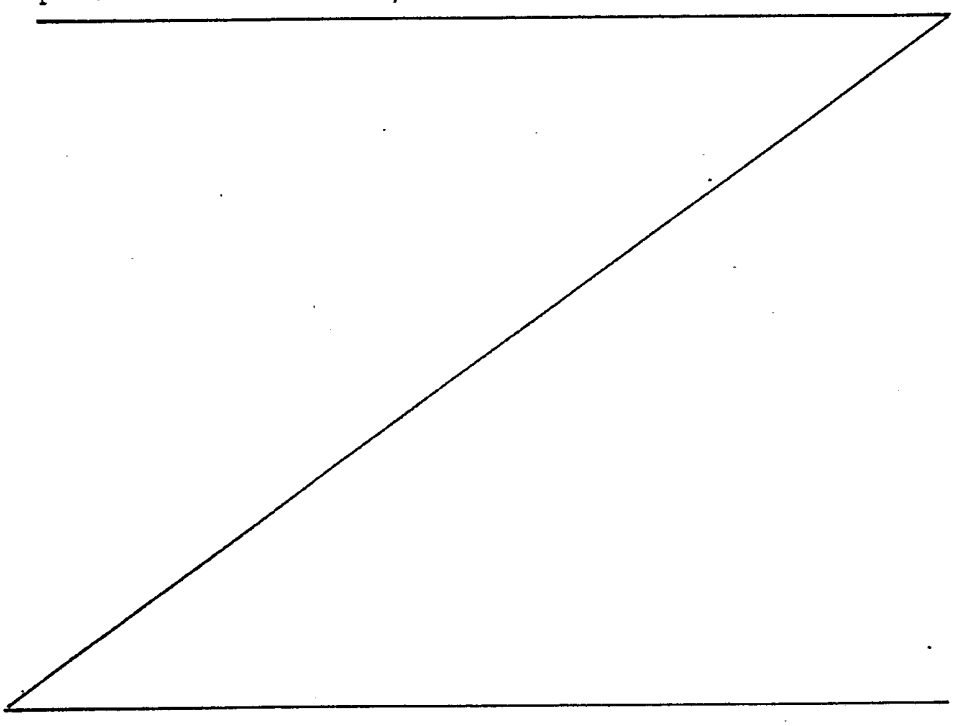


TABLEAU 6

N° d'expérience	Cation	r	τ(%)
18	Tétraoctyl N^+ (14)	20	61,4
19	CTAB (15)	20	98
20	CTPB (P4)	20	96,7
21	Stearylamine (ST)	20	96
22	Sphingosine (SP)	20	97,5
23	DOTMA[a]	7	69,5[f]

a:N-[1(2,3,-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium, chlorure.

f : floculation.

3. Encapsulation en présence de sphingosine (SP) de quelques oligonucléotides de séquence connue dont un oligophosphorothioate

Les résultats sont indiqués sur le tableau 7 suivant.

La concentration en oligonucléotide utilisée est de 0,102 µM en oligonucléotide.

TABLEAU 7

N° d'expérience	Cation	r	τ(%)
24	5'-ATAGTACAGAAA-3' (PO)	50	49
25	5'-ATAGTACAGAAA-3' $(PS)^a$	50	81,2
26	$p(dT)_{16}$	50	30,9
27	5'TCCTGATAAAGGA-GGAGATGAAG-AAAAAATGA-3'	50	36,2

a : oligophosphorothioate dans lequel un atome d'oxygène non pontant est remplacé par un atome de soufre.

Ces expériences montrent qu'à longueur et séquence identiques, un oligophosphorothioate s'encapsule mieux que le composé phosphodiester correspondant. En comparant les expériences n° 26 et 22, on peut voir que l'efficacité d'encapsulation est directement reliée à la concentration du complexe cation-oligonucléotide présent dans le milieu de polymérisation.

4) Encapsulation directe de quelques oligonucléotides modifiés.

Dans les expériences suivantes, sont indiqués les résultats d'encapsulation directe (absence de cations hydrophobes) de quelques oligonucléotides au bout desquels sont accrochés de manière covalente des groupements chimiques divers (cf. Tableau 8) : chaîne hydrocarbonée, intercalant (dérivés de l'acridine), drogue (daunomycine), photosensibilisateur (porphyrine). La structure de ces composés est montrée sur la figure 3. La présence de ces groupements peut conférer à la molécule hybride un caractère hydrophobe accru qui se reflète dans leur taux d'encapsulation dans les nanoparticules ainsi que dans leur pouvoir d'association avec les lipoprotéines (voir plus loin).

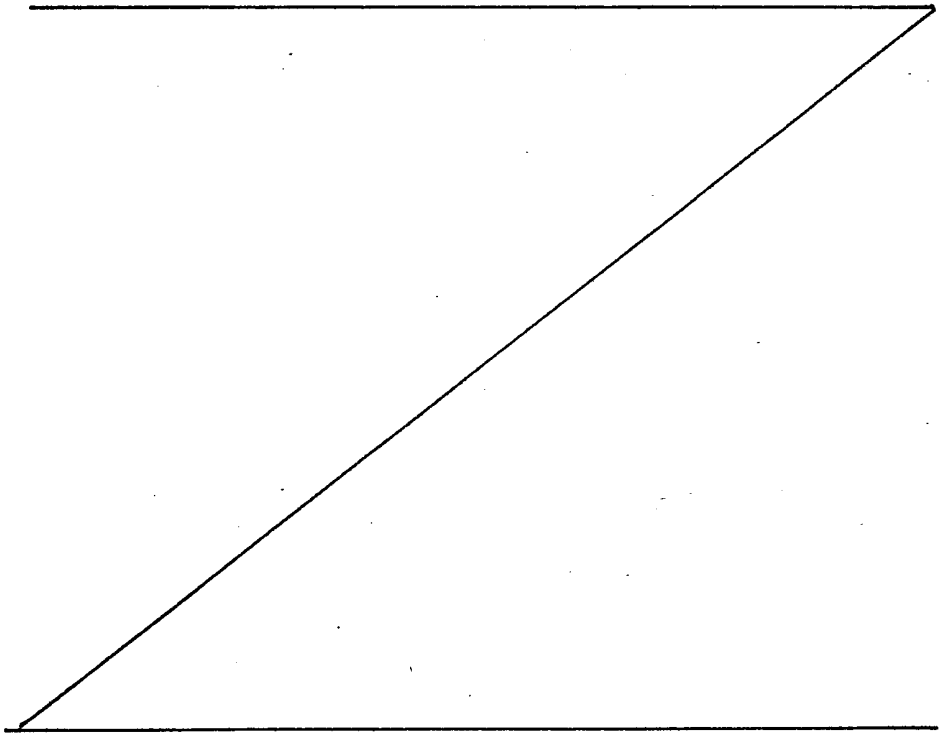


TABLEAU 8

N° d'expérience	oligonucléotide (ON)	[ON]	τ(%)
28	$p(dT)_8$	0,5μM	3
29	$T_8-(CH_2)_5$-Acridine	0,5μM	5
30	$T_7(CH_2)_5$-Porphyrine	0,5μM	98
31	5'-TTTTCCTCCTCT-dauno-mycine	2 μM	79
32	5'-AGCCACACC-$(CH_2)_{11}$-CH_3	12μM	3

Dans les expériences n° 29, 30 et 31, l'encapsulation est suivie par mesures fluorimétriques. Il a été vérifié que les propriétés d'émission des fluorophores n'étaient pas affectées par la présence du polymère.

c) Encapsulation de polynucléotides

Dans les exemples suivants, il apparaît nettement que les nanoparticules de poly(isobutylcyanoacrylate) peuvent encapsuler des polynucléotides en simple brin qu'ils soient constitués de motifs en structure ribo-(polyU) ou désoxyribonucléotide comme le poly(dT) (cf. Talbeau 9). L'exemple des structures en double brin est illustré par le DNA de thymus de veau (non soniqué) (expérience n° 36 et 37).

TABLEAU 9

N° expérience	Cation	PolyN	r	τ(%)
33	Sphingosine (sp)	poly(dT)	3	28
34	Tétraoctyl N+ (A4)	polyU	10	52
35	CTAB (A5)	polyU	20	54
36	CTAB (A5)	DNA	50	76
37	Sphingosine (SP)	DNA	50	96

La concentration du polynucléotide est égale à 4 x 10^{-5} M en phosphate. Ces expériences montrent qu'il est possible d'utiliser ces vecteurs de polymère pour encapsuler des ARN messagers ou du DNA d'organismes supérieurs dont une molécule peut contenir plusieurs milliards de paires de bases.

II Association oligonucléotides-lipoprotéines.

Des lipoprotéines représentées dans cet exemple par la fraction de basse densité, fraction LDL, peuvent fixer des oligonucléotides lorsque ceux-ci portent un groupement hydrophobe comme la porphyrine (figure 4). Les résultats montrent qu'une molécule de LDL par exemple peut fixer jusqu'à 17 molécules d'un

oligoheptathymidylate couplé à une porphyrine (T7-POR). Dans une expérience de contrôle dans les mêmes conditions, un oligonucléotide non couplé (pdT16) n'est pas encapsulé.

L'utilisation de vecteurs comme le LDL pourrait permettre de cibler les oligonucléotides vers certains types de cellules tumorales où les récepteurs de LDL sont exprimés en plus grand nombre que les cellules parentes non transformées.

Les légendes des figures mentionnées ci-dessus sont les suivantes :

- figure 1 : encapsulation de P_3 (□) et de $p(dT)_8$ (0) en fonction de la concentration en P_3. La concentration en oligonucléotides est gardée constante et égale à 1,6 x 10^{-6} M en phosphate, et celle des nanoparticules (NP) à 8 mg/ml. Le pH du milieu de polymérisation est ajusté à 7 après 1 heure de polymérisation par addition de 7 μl de tampon phosphate de sodium (1 M). Dans cette expérience, il n'y a pas d'addition de NaCl en fin de polymérisation.
- figure 2: encapsulation de $p(dT)_{16}$ (2,94 x 10^{-5} M en phosphate) en présence de sphingosine (◆), stearylamine (□) ou CTAB (▲) par des nanoparticules d'IBCA (10 mg/ml). Le pH du milieu de polymériston est ajusté à 7 puis équilibré avec NaCl (0,15 M final) en fin de polymérisation.
- figure 4 : courbe de fixation de l'oligonucléotide T_7-POR sur les LDL (plasma humain) déterminée par mesure de la fluorescence de la porphyrine à 626 nm. La concentration en oligonucléotide est égale à 3,5 μM. La

stoechiométrie du complexe est estimée égale à 17 molécules d'oligonucléotide fixées par molécule de LDL.

REVENDICATIONS

1. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend des composés constitués de dérivés nucléotidiques, d'intérêt thérapeutique et/ou clinique, codant, le cas échéant, pour un polypeptide déterminé, ces dérivés étant hydrophiles, chargés positivement ou négativement, modifiés ou non, et associés à un dérivé hydrophobe possédant, le cas échéant, une charge complémentaire de celle des dérivés nucléotidiques sus-mentionnés.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que les dérivés nucléotidiques sont constitués d'une séquence nucléotidique insérée dans la séquence d'un vecteur, notamment d'un plasmide.

3. Composition selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que le dérivé hydrophobe n'est pas chargé, et est notamment un dérivé du type porphyrine, ou daunomycine.

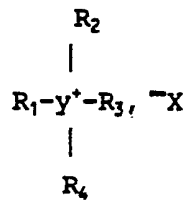
4. Composition selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que le dérivé hydrophobe est chargé et se présente sous forme cationique ou anionique.

5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que le rapport

$$r = \frac{\text{charge du dérivé hydrophobe}}{\text{charge du dérivé nucléotidique,}}$$

est compris entre 1 et 200, de préférence entre 10 et 50.

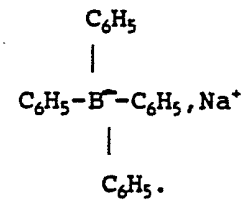
6. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que le dérivé hydrophobe correspond au cation issu du composé de formule générale :



dans laquelle :

- X représente un halogène, notamment un atome de chlore ou de brome,
- Y représente un atome d'azote ou de phosphore,
- les groupes R_1, R_2, R_3, et R_4, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, ou une fonction hydroxyle, ou un halogène, ou un groupe alcoyle ou alcoxy, linéaire ou ramifié ayant de 1 à 25 atomes de carbone, ou un groupe aryle, notamment un groupe phényle, ou polyaromatique pouvant contenir un ou plusieurs hétéroatomes tels que N, S, P, Se,
- l'un au moins de ces groupes R_1, R_2, R_3, ou R_4, représente un groupe alcoyle ou aryle tel que défini ci-dessus.

7. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que le dérivé hydrophobe correspond à l'anion issu du tétraphénylborure de sodium de formule



8. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que les vecteurs de transport sont constitués de nanoparticules à base de polymère, notamment d'un polymère d'alkylcyanoacrylate, ou d'un polymère à base d'acide lactique et d'acide glycolique.

9. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que les vecteurs de transport sont constitués de protéines plasmatiques, notamment des lipoprotéines de faible densité (LDL).

10. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que les vecteurs de transport sont constitués de protéines plasmatiques, notamment des lipoprotéines de faible densité (LDL), elles-mêmes encapsulées dans des nanoparticules telles que définies dans la revendication 8.

11. Composition pharmaceutique , caractérisée en ce qu'elle comprend une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

12. Composition pharmaceutique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est plus particulièrement appropriée au traitement de maladies d'origine virale, bactérienne, parasitaire ou tumorale.

13. Méthode de transfection cellulaire, caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en contact d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 avec des cellules hôtes, dans des conditions permettant l'internalisation du dérivé

nucléotidique compris dans ladite composition à l'intérieur desdites cellules hôtes.

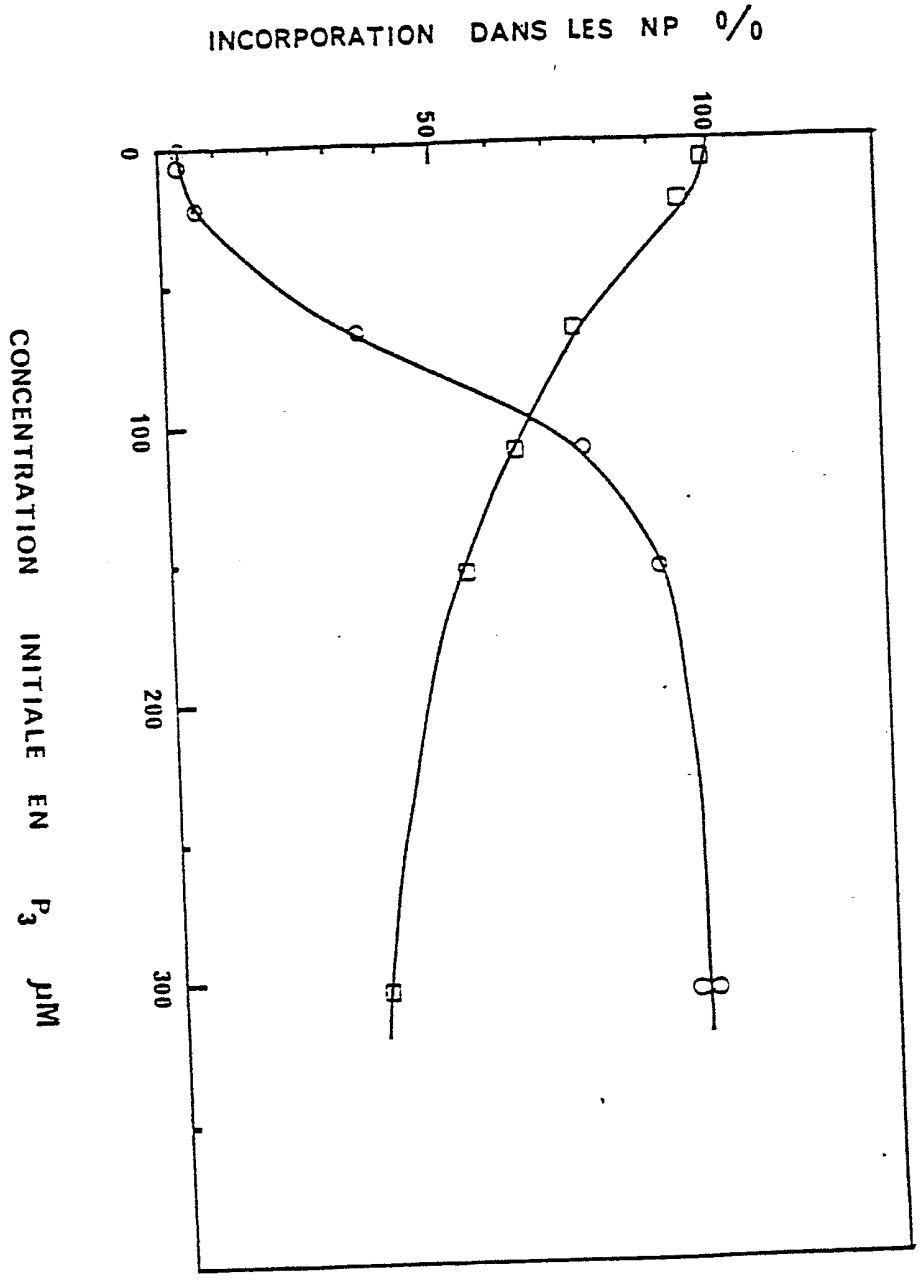

INCORPORATION DANS LES NP %
0
50
100
CONCENTRATION INITIALE EN P_3 µM
100
200
300

Figure 1

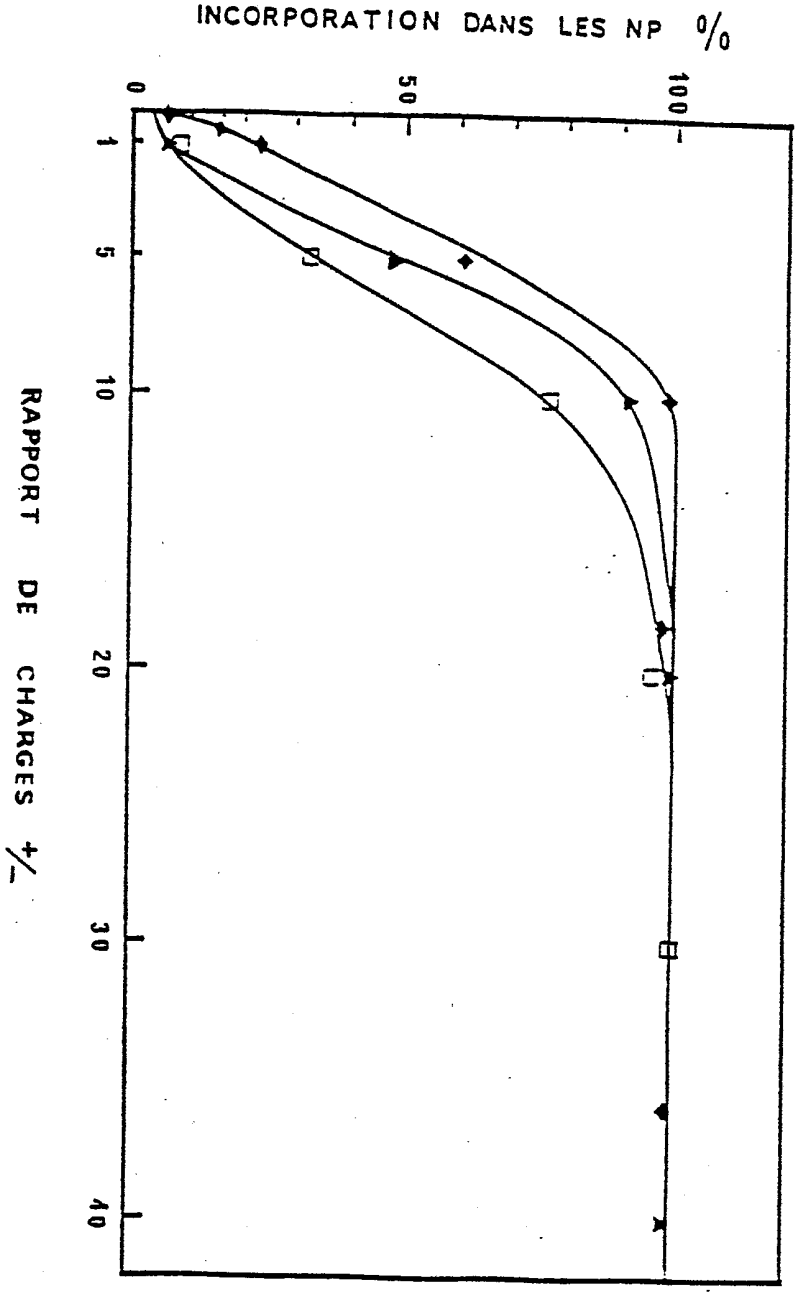
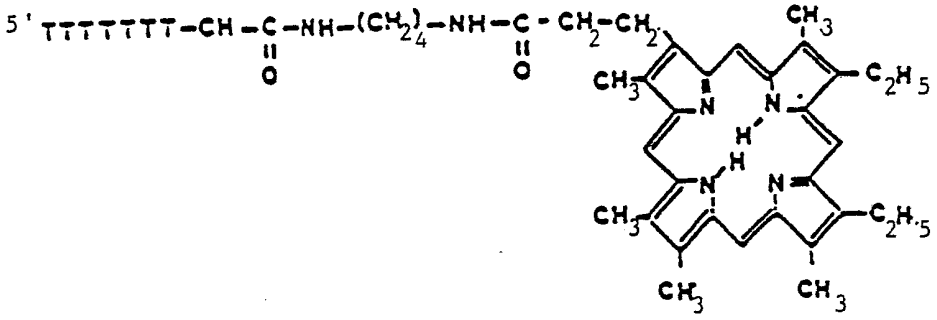
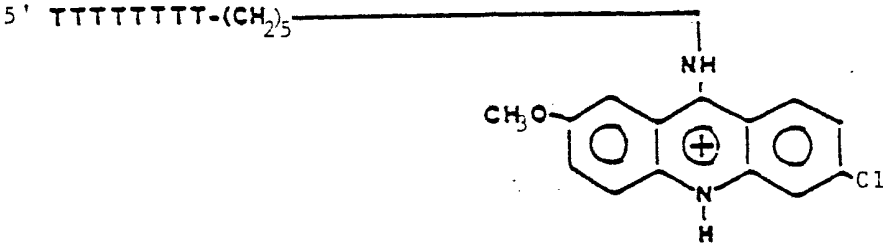

INCORPORATION DANS LES NP %
0
50
100
1
5
10
20
30
40
RAPPORT DE CHARGES +/-

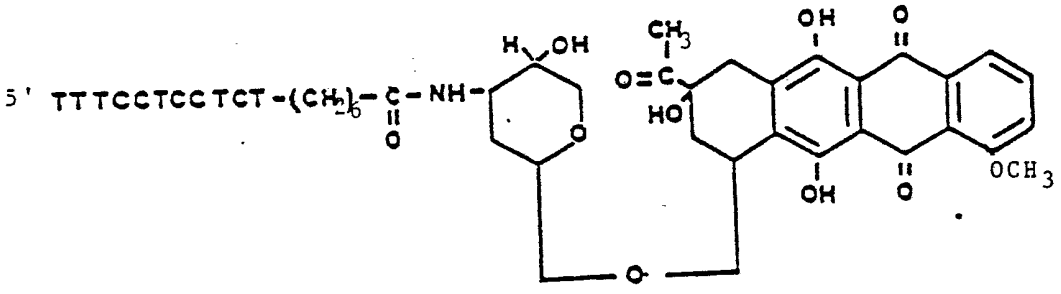
Figure 2



methylpyrroporphyrine XXI



2-methoxy, 6-chloro, 9-amino acridine



daunomycine

Figure 3

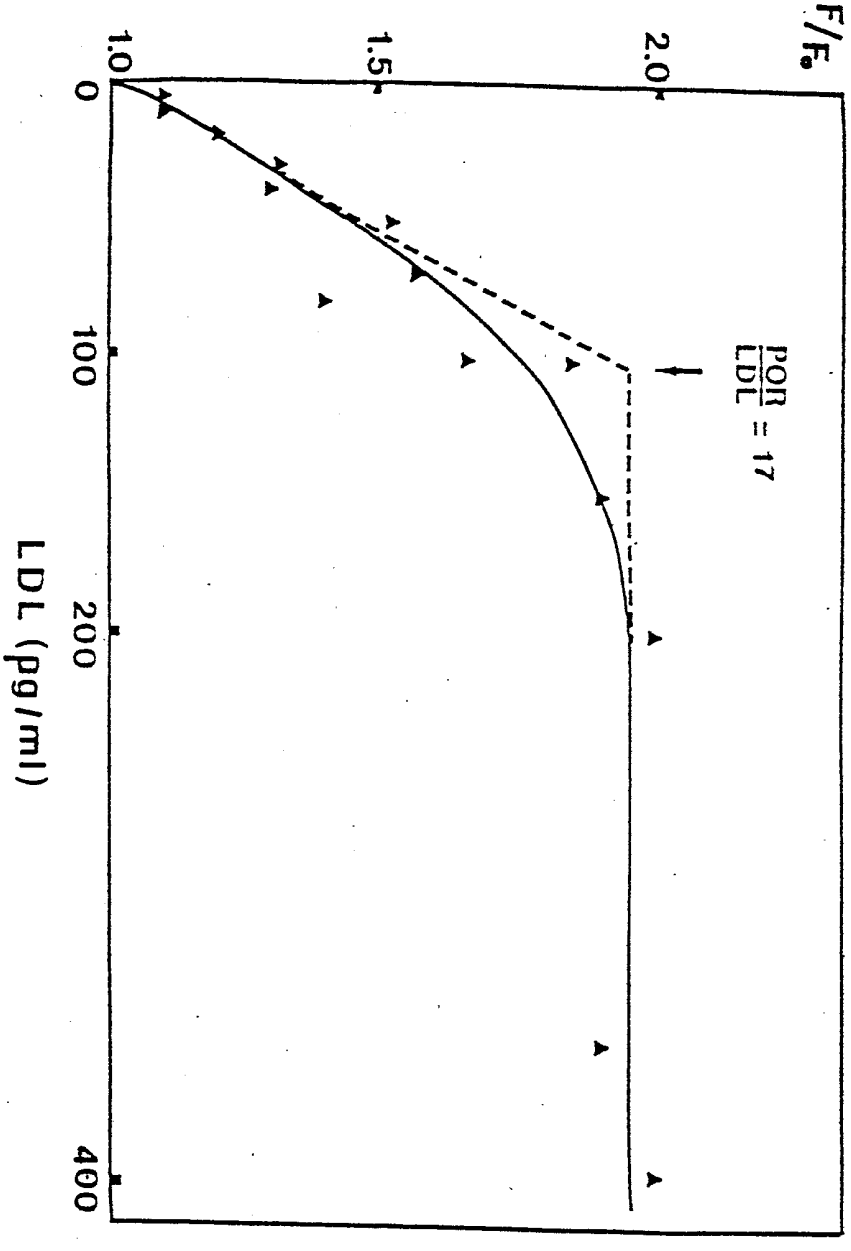


Figure 4