

(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
8 février 2001 (08.02.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/09173 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: **C07K 14/00**

[FR/FR]; 8 Rue de Gesèke, F-59120 Loos (FR). **AURI-
AULT, Claude** [FR/FR]; 60 Rue Louis Guislain, F-59310
Nomain (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/02194

(22) Date de dépôt international: 28 juillet 2000 (28.07.2000)

(74) Mandataires: **LENOIR, Sophie** etc.; Cabinet Orès, 6 Av-
enue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:

99/09928 30 juillet 1999 (30.07.1999) FR

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*):
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-
ENTIFIQUE (CNR S)** [FR/FR]; 3 Rue Michel Ange,
F-75794 Paris Cedex 16 (FR). **INSTITUT PASTEUR DE
LILLE** [FR/FR]; 1 Rue du Professeur A. Calmette, BP
245, F-59019 Lille Cedex (FR).

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): **GRAND-
JEAN, Cyrille** [FR/FR]; 9 Rue Vergniaud, F-75013
Paris (FR). **MELNYK, Oleg** [FR/FR]; 9 Rue G. Péri,
F-59370 Mons en Baroeul (FR). **GRAS-MASSÉ, Hélène**
[FR/FR]; 321 Rue de la Rosière, F-59710 Merignies (FR).
ANGYALOSI, Gerhild [RO/FR]; 11 Rue de la Porte
d'Ypres, F-59800 Lille (FR). **ROMMENS, Corinne**

Publiée:

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

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(54) Title: USE OF QUINIC, SHIKIMIC ACIDS AND THEIR DERIVATIVES FOR PREPARING MANNOSE RECEPTOR LIG-
ANDS

(54) Titre: UTILISATION DES ACIDES QUINIQUE, SHIKIMIQUE ET DE LEURS DERIVES POUR LA PREPARATION DE
LIGANDS DU RECEPTEUR DU MANNOSE

(57) Abstract: The invention concerns the use of quinic, shimic acids and their derivatives for preparing mannose receptor ligands, the resulting ligands and the uses of said ligands, in particular for preparing medicines and, more particularly for preparing vaccines and medicines for vectoring an active principle to target cells expressing the mannose receptor or a receptor related thereto, for transfecting DNA and RNA sequences and numerous other uses in gene therapy, and for preparing laboratory reagents, in particular diagnostic reagents.

(57) Abrégé: La présente invention se rapporte à l'utilisation des acides quinique, shikimique et de leurs dérivés pour la préparation de ligands du récepteur du mannose, aux ligands ainsi préparés, ainsi qu'aux applications de ces ligands, notamment pour la préparation de médicaments et, plus particulièrement pour la préparation de vaccins et de médicaments destinés à assurer la vectorisation d'un principe actif vers des cellules cibles exprimant le récepteur du mannose ou un récepteur lui étant apparenté, la transfection de séquences d'ADN et d'ARN et ses multiples utilisations en thérapie génique, et la préparation de réactifs de laboratoire, notamment de réactifs de diagnostic.

WO 01/09173 A2

UTILISATION DES ACIDES QUINIQUE, SHIKIMIQUE ET DE LEURS DERIVES POUR LA PREPARATION DE LIGANDS DU RECEPTEUR DU MANNOSE

La présente Invention se rapporte à l'utilisation des acides quinique, shikimique et de leurs dérivés pour la préparation de ligands du récepteur du mannose, aux ligands ainsi préparés, ainsi qu'aux applications thérapeutiques et diagnostiques de ces ligands.

Les cellules dendritiques, qui représentent une lignée particulière de leucocytes originaires de la moelle osseuse et qui sont présentes dans pratiquement tous les tissus de l'organisme, jouent un rôle clé dans le contrôle des réponses immunitaires. En effet, ces cellules apparaissent être les seules cellules capables *in vivo* de présenter les antigènes aux lymphocytes T naïfs et matures, et d'induire, par activation de ces lymphocytes T, une réponse immunitaire de type T auxiliaire (J. BLANCHEREAU et R.M. STEINMANN, *Nature*, 1998, 392, 245-252).

L'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques implique une reconnaissance et une internalisation préalables des antigènes par ces dernières. Or, il a été montré que l'internalisation des antigènes par les cellules dendritiques s'effectue non seulement par macropinocytose, mais également par un mécanisme d'endocytose ayant pour médiateur, un récepteur spécifique des hydrates de carbone et dénommé récepteur du mannose (A. AVRAMEAS *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 1996, 26, 394-400).

Le récepteur du mannose appartient à la famille des C-lectines qui représente un groupe de glycoprotéines calcium-dépendantes formant des liaisons non-covalentes avec les hydrates de carbone. Si, comme son nom l'indique, le récepteur du mannose se lie préférentiellement au D-mannose, il apparaît se lier également à d'autres hydrates de carbone comme le L-fucose, le D-glucose et la N-acétyl-D-glucosamine qui, comme le D-mannose, comprennent deux fonctions hydroxyles portées par deux atomes de carbone adjacents du cycle qui les constitue. Il semble que la liaison entre le récepteur du mannose et ces hydrates de carbone s'établisse par la coordination d'un ion calcium entre des résidus acide aminé du site de reconnaissance de ce récepteur et les deux fonctions hydroxyles adjacentes desdits hydrates de carbone (W.I. WEIS *et al.*, *Nature*, 1992, 360, 127-134).

Par ailleurs, comme c'est le cas pour toutes les lectines, la reconnaissance des hydrates de carbone par le récepteur du mannose, bien que spécifique, est faible, de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-3} M. La liaison simultanée de plusieurs molécules d'hydrates de carbone à plusieurs sites de reconnaissance du récepteur du mannose permet de compenser cette faible affinité. Ce phénomène est appelé « effet de groupe ».

Il a également été montré, non seulement que l'internalisation, par les cellules dendritiques, d'antigènes mannosylés est notablement supérieure à celle d'antigènes non-mannosylés, mais qu'une culture de populations clonales de lymphocytes T de spécificité restreinte à certains complexes peptide-HLA de classe II, réalisée en présence, d'une part, de cellules dendritiques et, d'autre part, de protéines ou de peptides mannosylés se traduit par une stimulation de ces lymphocytes de 200 à 10 000 fois plus élevée que celle obtenue lorsque ces mêmes protéines et peptides ne sont pas mannosylés (M.C.A.A. TAN *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27, 2426-2435).

Il est apparu, de ce fait, possible d'induire, de stimuler ou de moduler une réponse immunitaire en favorisant l'internalisation d'un antigène par les cellules dendritiques *via* le récepteur du mannose, par le couplage de cet antigène avec une structure chimique porteuse de plusieurs molécules d'un hydrate de carbone spécifiquement reconnu par ce récepteur (M.C.A.A. TAN *et al.*, *ibid.*).

Ceci présente un intérêt tout particulier en vaccinologie et notamment pour le développement de vaccins à base de peptides synthétiques. En effet, si ces derniers présentent l'avantage d'être à la fois chimiquement définis, de composition précise, affranchis des difficultés de la production biologique, purifiés et, enfin, de distribution aisée en raison de leur stabilité, ils présentent généralement l'inconvénient majeur d'être faiblement immunogènes.

C'est ainsi que les Inventeurs ont proposé de modifier des antigènes peptidiques en les greffant sur une structure dendrimérique comprenant un cœur de type arbre de L-lysine lié à plusieurs restes glycosyles et, notamment, à des restes D-mannose (C. GRANDJEAN *et al.*, 11^{ème} Réunion Peptides et Protéines, 17-22 Janvier 1999, AUSSOIS, FRANCE).

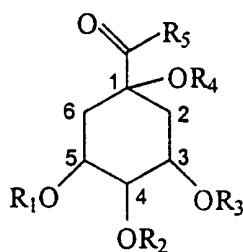
Toutefois, il apparaît que, dans l'optique du développement à une échelle industrielle d'un médicament et, notamment, d'un vaccin, l'utilisation

d'hydrates de carbone naturels comme le D-mannose ou le D-glucose, est susceptible de poser un certain nombre de difficultés, tant sur un plan technique que financier, en raison de ce que ces composés sont difficiles à lier à d'autres structures chimiques et sont instables dans de nombreux milieux réactionnels - en particulier, dans les milieux acides - et dans de nombreux milieux biologiques.

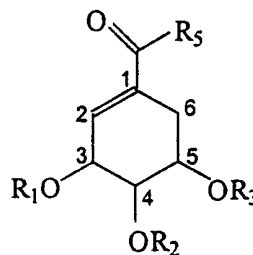
Le problème se pose, par conséquent, de disposer de composés présentant, vis-à-vis du mannose récepteur, une affinité et une spécificité telles qu'ils puissent être reconnus par ce récepteur et se lier sélectivement avec lui, tout en étant dépourvus des inconvénients propres aux hydrates de carbone naturels.

Or, les Inventeurs, toujours dans le cadre de leurs recherches sur le récepteur du mannose, ont constaté que, de manière surprenante, les acides quinique, shikimique et leurs dérivés qui représentent, de par leur nature carbocyclique, des composés chimiquement plus stables que les hydrates de carbone naturels, et donc plus faciles à utiliser dans des processus de synthèse, sont capables de mimer le D-mannose vis-à-vis de son récepteur, c'est-à-dire de se lier sélectivement à ce dernier, et par conséquent de remplacer avantageusement les hydrates de carbone naturels dans la préparation de ligands destinés à favoriser l'internalisation d'une substance par des cellules exprimant ce récepteur ou un récepteur de la famille des C-lectines lui étant apparenté.

La présente Invention a donc pour objet l'utilisation d'au moins un composé répondant à la formule générale (Ia) et/ou d'au moins un composé répondant à la formule générale (Ib) :



(Ia)



(Ib)

dans lesquelles :

- R₁, R₂, R₃ et R₄ représentent, indépendamment les uns des autres, un atome

d'hydrogène ou un groupe protecteur,

- R₅ représente un groupe -OH, un groupe -SH, un groupe -NH-NH₂, un atome d'halogène, ou une chaîne carbonée linéaire, ramifiée ou cyclique, saturée ou insaturée, comprenant de 1 à 18 atomes de carbone et éventuellement de 1 à 12

5 atomes choisis parmi l'oxygène, le soufre et l'azote, ladite chaîne carbonée étant éventuellement substituée par 1 à 16 atomes d'halogène et portant éventuellement au moins un groupe nucléophile ou au moins un groupe électrophile,

en tant que ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose, ou pour la préparation d'un tel ligand.

10 Au sens de la présente Invention, on entend par groupe « *protecteur* » un groupe protecteur d'une fonction hydroxyle ou d'un diol (auquel cas deux groupes choisis parmi R₁, R₂, R₃ et R₄ peuvent être reliés de façon covalente l'un à l'autre pour former ensemble un cycle), tel que défini dans l'ouvrage *Protective Groups in Organic Synthesis*, T.W. GREENE et P.G.M. WUTS, Seconde Edition

15 1991, J. WILEY and Sons. A titre d'exemples et de façon non-limitative, on peut citer les groupes triméthylsilyle, triéthylsilyle, triisopropylsilyle, tertibutyldiméthylsilyle, tertibutyldiphénylsilyle, triméthylsilyléthyléther, *tert*-butoxyméthyle, méthoxyméthyle, benzyloxyméthyle, 2-méthoxyéthoxyméthyle, méthylthiométhyle, acétyle, ou 2',3'-diméthoxybutane-2',3'-diyle.

20 Par ailleurs, on entend par groupe « *nucléophile* » un groupe possédant une paire d'électrons libres, c'est-à-dire un groupe donneur d'électrons, et par groupe « *électrophile* » un groupe possédant une orbitale moléculaire vacante de faible énergie capable d'interagir avec la paire d'électrons libres d'un groupe nucléophile. La présence d'au moins un groupe nucléophile ou électrophile dans les

25 composés de formules (Ia) et (Ib) permet avantageusement leur incorporation dans d'autres structures, telles que des structures porteuses, en faisant réagir ce groupe nucléophile ou électrophile avec des fonctions réactives correspondantes portées par ladite structure, comme cela sera décrit en détails ci-après.

Dans le cadre de la présente Invention, le groupe nucléophile est, de

30 préférence, choisi parmi les groupes amines, thiols, β -aminothiols, alcools, hydrazide et dérivés d'hydrazide, hydrazine et dérivés d'hydrazine, hydroxylamine et dérivés d'hydroxylamine, tandis que le groupe électrophile est, de préférence, choisi parmi les

groupes α -oxo-aldéhydes, $-\text{COR}^a$ (avec par exemple $R^a = \text{H}$, halogène, imidazolyle, hétérocycle aromatique), $-\text{CO}_2R^a$ (avec par exemple $R^a = \text{H}$, aryle, succinimidyle, sulfosuccinimidyle, hétérocycle aromatique) et ses dérivés (anhydrides symétriques, anhydrides mixtes, esters activés), $-\text{OCOR}^a$ (avec par exemple $R^a = \text{halogène}$, imidazolyle, hétérocycle aromatique), $-\text{OCO}_2R^a$ (avec par exemple $R^a = \text{aryle}$, hétéroaryle, succinimidyle, sulfosuccinimidyle), $-\text{OCSR}^a$ (avec par exemple $R^a = \text{halogène}$, imidazolyle, hétérocycle aromatique), $-\text{OCSOR}^a$ (avec par exemple $R^a = \text{aryle}$, succinimidyle, sulfosuccinimidyle, hétérocycle aromatique), $-\text{NR}^a\text{COR}^b$ (avec par exemple $R^a = \text{méthyle}$ et $R^b = \text{halogène}$, imidazolyle, hétérocycle aromatique), $-\text{NR}^a\text{COOR}^b$ (avec par exemple $R^a = \text{H}$ et $R^b = \text{aryle}$, succinimidyle, sulfosuccinimidyle), $-\text{NR}^a\text{CSR}^b$ (avec par exemple $R^a = \text{H}$ et $R^b = \text{halogène}$, imidazolyle, hétérocycle aromatique), $-\text{NR}^a\text{CSOR}^b$ (avec par exemple $R^a = \text{H}$ et $R^b = \text{aryle}$, succinimidyle, sulfosuccinimidyle), $-\text{NCO}$, $-\text{NCS}$, maléimide et halogénures d'alkyles.

A titre d'exemples et de façon non-limitative, dans les formules générales (Ia) et (Ib) :

- des atomes d'halogène convenables sont le brome, le chlore et le fluor ; et
- des chaînes carbonées convenables sont des groupes alkyles (méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, tertibutyle, pentyle, ...), des groupes alkényles (vinyle, allyle, butényle, pentényle, ...), des groupes alkynyles (éthynyle, propynyle, butynyle, pentynyle, ...), des groupes cycloalkyles (cyclopentyle, cyclohexyle, ...), des hétérocycles (pipérazine, ...), des groupes aryles (phényle, crésyle, ...), des groupes hétéroaryles (pyridine, pyrimidine, pyrazine, ...), des groupes polyéthylèneglycols ou encore des polyamines.

Les composés répondant aux formules générales (Ia) et (Ib) constituent des mimes du D-mannose. Ils peuvent être utilisés, en tant que tels, comme ligands du récepteur du D-mannose, ou être liés à d'autres composés pour conduire à l'obtention de ligands au sein desquels ils joueront le rôle de mimes du D-mannose. Aussi, s'il convient que, dans les ligands tels que prêts à être utilisés, les composés de formules générales (Ia) et (Ib) présentent au moins deux fonctions hydroxyles libres vicinales, de manière à être en mesure de mimer le D-mannose et à permettre à ces

ligands d'être reconnus par le récepteur du mannose et de se lier à ce dernier, il n'est toutefois pas nécessaire que ces composés présentent initialement deux fonctions hydroxyles vicinales libres.

Ainsi, conformément à l'Invention, il est tout à fait possible
5 d'utiliser, pour la préparation d'un ligand, au moins un composé de formule (Ia) et/ou au moins un composé de formule (Ib) comprenant, sur deux atomes de carbone adjacents du cycle, deux groupes hydroxyles protégés par un groupe protecteur, les autres groupes portés par les atomes du cycle pouvant être éventuellement eux aussi protégés. Cela sera même souhaitable dans un certain nombre de cas, notamment pour
10 éviter que des groupes portés par les atomes de carbone du cycle du composé de formule générale (Ia) ou (Ib) n'interfèrent lors du couplage dudit composé pour conduire à des cyclisations intramoléculaires ou des dimérisations. Bien entendu, les groupes protégeant les deux fonctions hydroxyles portées par les deux atomes de carbone adjacents du cycle seront éliminés préalablement à toute utilisation du ligand,
15 l'élimination des autres groupes protecteurs étant facultative.

Selon une disposition préférée de l'Invention, les composés de formules générales (Ia) et/ou (Ib) sont choisis de telle sorte que les groupes -OR₂ et -OR₃ soient en relation *trans*, de manière à mimer les deux hydroxyles portés par le cycle du D-mannose qui apparaissent être impliquées dans la liaison entre ce composé
20 et son récepteur.

De préférence, les composés de formule (Ia) et/ou (Ib) sont tels que R₅ représente un groupe hydroxyle (auquel cas le cycle porte, en position 1, un groupe carboxyle).

En effet, la présence d'un groupe carboxyle sur le cycle des
25 composés de formules (Ia) et (Ib) offre l'avantage de conférer à ces composés de nombreuses possibilités de couplage, par exemple par l'intermédiaire d'une liaison de type amide, ester, thioester, hydrazide ou hydroxamate. Par ailleurs, ces couplages peuvent être aisément réalisés par une simple activation de ce groupe carboxyle selon les techniques d'activation classiquement utilisées pour la synthèse peptidique et,
30 notamment, pour la synthèse peptidique sur support solide. Ces techniques sont décrites, par exemple, dans l'ouvrage *The Practice of Peptides Synthesis*, M. et A. BODANSKY, 1984, SPRINGLER-VERLAG, Berlin.

Selon une disposition particulièrement préférée de l'Invention, le composé de formule (Ib) est tel que R_1 , R_2 et R_3 représentent des atomes d'hydrogène et R_5 représente un groupe hydroxyle (-OH). Si, en outre, les groupes -OR₁ et -OR₂ se trouvent en relation *cis*, et les groupes -OR₂ et -OR₃ se trouvent en relation *trans*, la configuration étant 3R, 4S et 5R, le composé résultant consiste en de l'acide (-)-shikimique (ou acide 3,4,5-trihydroxy-1-cyclohexène-1-carboxylique).

Selon une autre disposition préférée de l'Invention, le composé de formule (Ia) est tel que R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent des atomes d'hydrogène et R_5 représente un groupe hydroxyle (-OH). Si, en outre, les groupes -OR₂ et -OR₃ se trouvent en relation *trans*, alors que les groupes -OR₁ et -OR₄ se trouvent chacun en relation *cis* par rapport au groupe -OR₂, et la configuration est 1s_n, 3R, 4s_n et 5R, alors le composé résultant consiste en de l'acide (-)-quinique (ou acide 1,3,4,5-tétrahydroxy-cyclohexane-carboxylique).

Les acides (-)-shikimique et (-)-quinique sont disponibles commercialement, par exemple auprès des Sociétés ALDRICH ou ACROS.

Selon encore une autre disposition préférée de l'Invention, le composé de formule (Ia) est tel que R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent des atomes d'hydrogène et R_5 représente un groupe -NH-(CH₂)₂-SH. Il s'agit alors d'un dérivé de l'acide quinique.

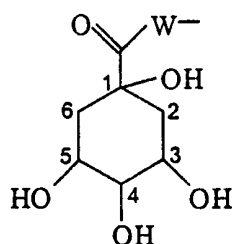
D'une manière générale, il est bien entendu que les formules (Ia) et (Ib), qui représentent les acides quinique et shikimique et certains de leurs dérivés, obtenus par substitution des hydroxyles portés aux positions 2, 3 et 4 (et éventuellement en position 1) du cycle, et par substitution de la fonction carbonyle située en position 1 du cycle (groupe R_5), ne sont pas limitatives, et que tout autre dérivé des acides quinique et shikimique pourrait être utilisé sans sortir du cadre de la présente Invention.

La présente Invention a également pour objet un composé utile en tant que ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose, ou en tant que composé intermédiaire pour la préparation d'un tel ligand, lequel composé étant caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale (III) ci-après :

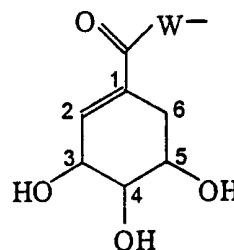


dans laquelle :

- B^I répond à une ou plusieurs formules générales (IIa) ou (IIb) ci-après :



(IIa)



(IIb)

5

où W représente une liaison ou une chaîne carbonée linéaire, ramifiée ou cyclique, saturée ou insaturée, comprenant de 1 à 18 atomes de carbone et éventuellement de 1 à 12 atomes choisis parmi l'oxygène, le soufre et l'azote, ladite chaîne carbonée étant éventuellement substituée par 1 à 16 atomes d'halogène,

- X représente le reste d'un oligopeptide X' comprenant de 1 à 6 acides aminés,
- A représente le reste d'un composé A' au moins difonctionnel,
- Y représente le reste d'un composé d'intérêt Y',
- m est un nombre entier compris entre 1 et 32,
- n est un nombre entier compris entre 0 et 32,
- y est un nombre entier compris entre 1 et 4, et
- M, N et P représentent chacun un groupe de liaison, respectivement entre B^I et A quand $n = 0$ ou B^I et X quand n est différent de 0, entre X et A quand n est différent de 0, et entre A et Y, et comprennent, indépendamment les uns des autres, une fonction choisie parmi les fonctions oxime, hydrazone, amide, ester, thioester, hydrazide, hydroxamate, éther, thioéther, amine, carbonate, carbamate, thiocarbonate, thiocarbamate, urée, thiourée et thiazolidine.

20

Dans la formule (III), ainsi que dans tout ce qui suit, des exemples d'atomes d'halogène et de chaînes carbonées convenables sont tels que décrits précédemment en rapport avec les composés de formules générales (Ia) et (Ib).

25

Le composé répondant à la formule générale (III) comprend donc :

- * en tant qu'éléments obligatoires :
 - un ou plusieurs restes B¹ répondant chacun à l'une des formules générales (IIa) ou (IIb), ce ou ces restes étant destinés à jouer le rôle de mimes du D-mannose vis-à-vis du récepteur du mannose et résultant de la liaison entre un ou plusieurs composés répondant à la formule générale (Ia) et/ou (Ib) précédemment définie et le composé A', éventuellement *via* X', et de la déprotection des groupes hydroxyles, dans le cas où le ou lesdits composés de formule générale (Ia) et/ou (Ib) présente initialement des groupes hydroxyles protégés ;
 - un ou plusieurs restes Y d'un composé Y' correspondant à un composé d'intérêt ;
 - le reste A d'un composé A' présentant au moins une double fonctionnalité, puisque son rôle est de porter à la fois le ou les restes B¹ et le ou les restes Y ;
- et
- * en tant qu'élément(s) accessoire(s), le ou les restes X d'un composé X', ce ou ces restes X jouant le rôle, lorsqu'ils sont présents, de bras espaceur entre B¹ et A, de façon à contrôler la distance entre les différents restes B¹, lorsque plusieurs d'entre eux sont présents dans le composé de formule générale (III) (c'est-à-dire lorsque m est supérieur à 1). Bien que des restes X de nature oligopeptidique aient été décrits, on ne sortirait pas du cadre de la présente Invention en utilisant, en tant que composé X', des composés de nature différente, pourvu qu'ils soient aptes à jouer le rôle de bras espaceur entre B¹ et A. A titre d'exemples et de façon non limitative, on peut citer l'acide mercaptopropionique, les thioamines, les bromoamines et les bras espaceurs du type polyéthylèneglycol comme le 4,7,10-trioxa-1,13-tridécane diamine.

Au sens de la présente Invention, on entend par « *composé d'intérêt* » un composé dont on cherche à favoriser l'internalisation par des cellules *via* le récepteur du mannose ou un récepteur de la famille des C-lectines apparenté à ce dernier (cellules dendritiques, cellules des lignées monocytes-macrophages, ...).

A cette fin, le composé d'intérêt peut être lié au reste A, à raison de 1 à 4 molécules de composé d'intérêt par molécule de composé de formule générale

(III), par des groupes de liaison P résultant chacun de la réaction entre deux groupes fonctionnels portés, pour le premier, par ledit composé d'intérêt et pour le second, par le composé A'. On obtient un ligand apte, de par la présence du ou des restes B¹, à se lier spécifiquement au récepteur du mannose ou à tout récepteur apparenté à ce dernier et, de par sa liaison avec le composé d'intérêt, à favoriser l'internalisation de ce dernier par les cellules exprimant ce type de récepteur.

Selon une disposition avantageuse de l'Invention, le composé A' est formé d'un enchaînement comprenant plusieurs restes d'un composé au moins trifonctionnel, liés les uns aux autres par des liaisons covalentes, et propre à offrir, au niveau des groupes fonctionnels libres de ces restes (c'est-à-dire des groupes fonctionnels qui ne sont pas engagés dans une liaison covalente), plusieurs sites d'ancrage pour le ou les composés de formule générale (Ia) et/ou (Ib) ou, lorsque X est présent, le composé X', et pour le composé Y'.

Selon une modalité préférée de cette disposition, le composé A' comprend de 2 à 32 et, de préférence, de 4 à 16 restes d'un composé trifonctionnel.

Conformément à l'Invention, le composé A' peut se présenter soit sous une forme linéaire, soit sous une forme ramifiée et, notamment, de type arborescente (dite « dendrimérique »). Des exemples de structures ramifiées particulièrement bien adaptées à la préparation d'un ligand du récepteur du mannose selon l'Invention sont illustrés dans les Figures 1A et 1B qui représentent, de manière très schématique, un composé A' sous la forme de deux dendrimères différents.

De préférence, le composé A' comprend un enchaînement d'acides aminés, identiques ou différents, sélectionnés dans le groupe constitué par la lysine, l'hydroxylysine, la sérine, la thréonine, la cystéine, l'ornithine, l'acide aspartique et l'acide glutamique. Cet acide aminé peut être aussi bien de la série L que de la série D et le composé A' peut même comprendre à la fois des résidus de la série L et des résidus de la série D.

Un composé A' à base de lysine est préféré, l'utilisation de la lysine étant en effet particulièrement bien adaptée à la réalisation d'un ligand du récepteur du mannose selon l'Invention, dans la mesure où il a été montré que des macromolécules à base de lysine sont dénuées d'immunogénicité intrinsèque (TAM, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 540).

Toutefois, il est possible d'utiliser, en tant que composé A', des enchaînements de composés trifonctionnels autres que les acides aminés cités ci-dessus, pour autant qu'ils présentent une biocompatibilité satisfaisante. A titre d'exemples et de façon non-limitative, on peut citer la 3,3'-iminobis(propylamine), la
5 2,2'-iminobis(éthylamine), l'acide gallique, le tris(2-carboxyéthyl)nitrométhane (M. BRETTEICH *et al.*, *Synlett*, 1998, 1396), le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (P. R. ASHTON *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 3429) et la (dihydroxy)propylamine.

Accessoirement, le composé A' peut comprendre, en outre, un ou plusieurs restes correspondant à un ou plusieurs composés différents du composé au
10 moins trifonctionnel qui en constitue l'élément de base. Ce ou ces restes n'ont en principe pas vocation à assurer une quelconque liaison entre les différents éléments composant le ligand. En fait, leur présence est soit destinée à conférer à ce ligand des caractères additionnels tels qu'une ou plusieurs possibilités supplémentaires de couplage (par exemple, en vue de la réalisation ultérieure d'un dimère de ce ligand),
15 soit liée à la nécessité d'utiliser, au cours de sa préparation, des composés additionnels, tels que des bras espaceurs. Il va de soi que ces composés, tout en étant différents du composé au moins trifonctionnel constituant l'élément de base du composé A', seront de préférence de la même nature que celui-ci. Ainsi, par exemple, ils seront préférentiellement des acides aminés dans le cas où le composé A' comprend
20 un acide aminé.

Conformément à l'Invention, n, qui représente le nombre de restes X présents dans le composé de formule générale (III), peut être :

- soit égal à 0, auquel cas le ou les restes B¹ sont directement liés au reste A,
- 25 • soit compris entre 1 et 32, auquel cas, si n est égal à 1, le ou les restes B¹ sont liés au reste A par l'intermédiaire d'un seul reste X, tandis que, si n est différent de 1, chaque reste X peut servir d'élément de liaison entre un ou plusieurs restes B¹ et le reste A.

Quant aux groupes de liaison M, N et P, ils sont choisis,
30 indépendamment les uns des autres, parmi les groupes de liaison qui comprennent une fonction choisie parmi les fonctions oxime, hydrazone, amide, ester, thioester, hydrazide, hydroxamate, éther, thioéther, amine, carbonate, carbamate, thiocarbonate,

thiocarbamate, urée, thiourée et thiazolidine. A titre d'exemples et de façon non-limitative :

- une liaison oxime peut être formée par réaction d'un groupe O-alkylamine avec un groupe carbonyle,
- 5 - une liaison hydrazone peut être formée par réaction d'un groupe hydrazine avec un groupe carbonyle,
- une liaison amide (respectivement, ester) peut être formée par réaction d'un groupe amine (respectivement, alcool) avec un groupe acide activé ou anhydride ou halogénure d'acide,
- 10 - une liaison thioester peut être formée par réaction d'un groupe thiol avec un groupe acide activé ou anhydride ou halogénure d'acide,
- une liaison hydrazide peut être formée par réaction d'un groupe hydrazine avec un groupe acide activé, anhydride ou halogénure d'acide,
- une liaison éther peut être formée par réaction d'un groupe alcool
- 15 avec un groupe halogénure d'alkyle,
- une liaison thioéther peut être formée par réaction d'un thiol avec un groupe halogénure d'alkyle,
- une liaison amine peut être formée par réaction entre un groupe amine et un halogénure d'alkyle,
- 20 - une liaison carbonate peut être formée par réaction d'un groupe chloroformate avec un groupe alcool,
- une liaison carbamate peut être formée par réaction d'un groupe chloroformate avec un groupe amine,
- une liaison thiocarbonate peut être formée par réaction d'un
- 25 groupe chlorothioformate avec un groupe alcool,
- une liaison thiocarbamate peut être formée par réaction d'un groupe chlorothioformate avec un groupe amine,
- une liaison urée peut être formée par réaction d'un groupe isocyanate avec un groupe amine,
- 30 - une liaison thiourée peut être formée par réaction d'un groupe isothiocyanate avec un groupe amine,

– une liaison thiazolidine peut être formée par réaction d'un groupe β -aminothiol avec un groupe carbonyle, tandis que

– une liaison hydroxamate peut être formée par réaction entre un groupe acide activé et un groupe hydroxylamine.

5 On comprendra dès lors que, dans la formule générale (III), B^1 , A et X représentent les restes de composés portant naturellement des groupes fonctionnels propres à conduire, par réaction les uns sur les autres, à l'obtention des groupes de liaison M, N et P tels que définis ci-dessus, ou de composés ayant été modifiés de manière à porter de tels groupes fonctionnels.

10 A cet égard, il convient de préciser que, conformément à l'Invention, le composé répondant à la formule générale (III) peut être préparé :

– soit par une synthèse convergente, c'est-à-dire par assemblage de composés disponibles dans le commerce et éventuellement modifiés pour les besoins de la préparation du composé répondant à la formule générale (III), et/ou de composés
15 préalablement synthétisés.

Ainsi, par exemple, le composé de formule générale (III) peut être obtenu en couplant, dans un premier temps, le ou les composés répondant à la formule générale (Ia) et/ou (Ib) avec le composé X' , puis en couplant le composé résultant de ce premier couplage avec le composé A' , et enfin en couplant le composé résultant de
20 ce deuxième couplage avec le composé Y' , ce dernier couplage étant éventuellement suivi de la déprotection des groupes hydroxyles portés par le ou les restes B^1 , dans le cas où le ou les composés de formule (Ia) et/ou (Ib) portent de tels groupes.

En variante, le composé de formule générale (III) peut être obtenu en couplant un composé résultant du couplage entre un ou plusieurs composés
25 répondant à la formule générale (Ia) et/ou (Ib) et le composé X' , avec un composé résultant, lui, du couplage entre le composé A' et le composé Y' , ce dernier couplage pouvant, là encore, être suivi d'une déprotection telle que susdite.

Bien entendu, tout autre ordre d'assemblage peut également être envisagé pour autant qu'il permette d'obtenir un composé répondant à la formule
30 générale (III).

– soit par une stratégie de synthèse récurrente, notamment dans le cas où les composés Y' , A' et X' sont constitués par des acides aminés. Ainsi, les

composés Y', A' et X' peuvent être formés et assemblés les uns aux autres par addition successive des acides aminés qui les composent, par exemple selon les techniques de synthèse peptidique sur support solide dérivées de la méthode initialement décrite par MERRIFIELD (*The Chemistry of Solid Phase Peptide Synthesis*, STEWART et
5 YOUNG Ed., 1984).

– soit encore par une stratégie de synthèse pour partie convergente et pour partie récurrente.

Selon une disposition préférée de l'Invention, le composé répond à la formule générale (III) dans laquelle m est un nombre entier compris entre 4 et 16, n
10 est un nombre entier compris entre 2 et 8, X représente le reste d'un oligopeptide comprenant de 2 à 4 résidus d'acides aminés, tandis que A représente le reste d'un enchaînement comprenant de 2 à 8 résidus de lysine et se présentant sous la forme d'un dendrimère.

Selon une autre disposition préférée de l'Invention, le composé de
15 formule générale (III) est tel que B¹ représente le reste d'un ou plusieurs composés choisis parmi l'acide (-)-shikimique et l'acide (-)-quinique.

Selon l'usage auquel est destiné le ligand, le composé d'intérêt Y' peut être un antigène et, notamment, un antigène vaccinal tel qu'un peptide de synthèse correspondant à un ou plusieurs épitopes d'une protéine d'un agent
20 pathogène, un antigène sous-unité protéique ou polysaccharidique, une fraction bactérienne ou virale purifiée, un anticorps tel qu'une immunoglobuline ou un sérum antilymphocytes, un acide nucléique ou un fragment d'un acide nucléique (séquence d'ARN ou d'ADN) codant pour une protéine d'intérêt ou pour un ou plusieurs déterminants antigéniques de cette protéine, un principe actif médicamenteux tel qu'un
25 immunostimulant, un immunosupresseur, un cytostatique ou un antibiotique, et peut, à ce titre, être aussi bien une substance de nature protéinique, peptidique, osidique ou polyosidique, lipidique, lipoprotéinique, lipopolyosidique, polynucléotidique, qu'un composé issu de la chimie.

Le composé d'intérêt peut également être un marqueur détectable
30 propre à permettre une révélation de la présence du ligand dans le milieu où il se trouve, tel qu'un radioisotope, un fluorochrome ou une enzyme.

Bien entendu, il est aussi possible que le composé d'intérêt Y' soit

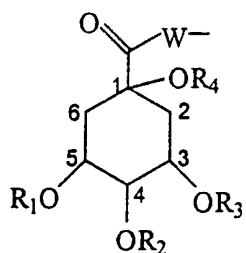
constitué d'une association de plusieurs substances de nature différente comme par exemple, un antigène ou un anticorps lié à un marqueur détectable.

La présente Invention a aussi pour objet un composé utile en tant que composé intermédiaire pour la préparation d'un ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose, lequel composé est caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale (V) ci-après :

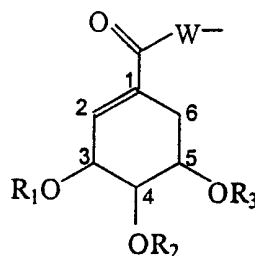


dans laquelle :

10 - B^2 répond à une ou plusieurs formules générales (IVa) ou (IVb) ci-après :



(IVa)



(IVb)

où R_1 , R_2 , R_3 , R_4 et R_5 sont tels que définis précédemment en rapport avec les composés de formules générales (Ia) et (Ib), et où W est tel que défini précédemment en rapport avec les composés de formules générales (IIa) et (IIb),

- X représente le reste d'un oligopeptide X' comprenant de 1 à 6 acides aminés,
- A représente le reste d'un composé A' au moins difonctionnel,
- m est un nombre entier compris entre 1 et 32,
- 20 - n est un nombre entier compris entre 0 et 32, et
- M et N représentent chacun un groupe de liaison, respectivement entre B^2 et A quand $n = 0$ ou B^2 et X quand n est différent de 0, et entre X et A quand n est différent de 0, et comprennent, indépendamment l'un de l'autre, une fonction choisie parmi les fonctions oxime, hydrazone, amide, ester, thioester, hydrazide,
- 25 hydroxamate, éther, thioéther, amine, carbonate, carbamate, thiocarbonate,

thiocarbamate, urée, thiourée et thiazolidine.

Ainsi, dans la formule générale (V), le ou les restes B^2 résultent du couplage d'un ou plusieurs composés répondant à la formule générale (Ia) et/ou (Ib) avec le composé A', éventuellement *via* X'.

5 Dans le composé de formule générale (V), M, N, m, n, ainsi que les composés A' et X', sont tels que décrits en relation avec la formule générale (III).

Par ailleurs, le composé de formule générale (V) peut être, comme le composé répondant à la formule générale (III), préparé par une synthèse convergente, par une synthèse récurrente, ou encore par une synthèse pour partie convergente et
10 pour partie récurrente.

Selon une disposition préférée de l'Invention, le composé de formule générale (V) est tel que B^2 représente un reste d'un ou plusieurs composés choisis parmi l'acide (-)-shikimique et l'acide (-)-quinique, éventuellement sous forme protégée.

15 La présente Invention a encore pour objet un composé utile en tant que composé intermédiaire pour la préparation d'un ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose, lequel composé est caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale (VI) ci-après :

20 $(B^1M)_m A$ (VI)

dans laquelle :

- B^1 et M ont la même signification que dans la formule générale (III),
- m est un nombre entier compris entre 50 et 500, et
- A représente le reste d'un polymère A' capable de former un complexe non-
25 covalent avec un composé d'intérêt, tel qu'un acide nucléique.

Au sens de la présente Invention, on entend par « polymère » un ensemble de molécules de poids moléculaire variable, résultant de l'enchaînement de plusieurs monomères.

Ce polymère est choisi parmi des composés capables de donner lieu,
30 au contact d'un composé d'intérêt, à la formation d'un complexe non-covalent avec ce composé, par exemple par l'intermédiaire de liaisons ioniques, de liaisons dipolaires

ou d'interactions électrostatiques, le complexe ainsi obtenu étant alors susceptible d'être utilisé en tant que ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté à ce dernier.

De préférence, le polymère A' est un polymère cationique. A titre d'exemples et de façon non-limitative, des polymères cationiques convenables sont des polymères de lysine tels que ceux commercialisés par la Société SIGMA sous les références P0296, P6403, P4408, P7886, P0899, P1149 ou encore P0124, et des polyéthylèneimines, tels que celui commercialisé par la Société FERMENTAS sous la référence EXGEN 500 en tant que réactif de transfection cellulaire.

La présente Invention a également pour objet un composé utile en tant que ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose, lequel composé est caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme d'un complexe non-covalent entre un composé répondant à la formule générale (VI) telle que définie ci-dessus et un composé d'intérêt, tel qu'un acide nucléique.

Les ligands conformes à l'Invention sont de grand intérêt. En effet, tout en étant aptes à être reconnus de manière très satisfaisante par le récepteur du mannose et à se lier spécifiquement avec lui, ils présentent l'avantage de pouvoir être préparés aisément et à des coûts compatibles avec une exploitation industrielle, notamment par les nombreuses techniques de synthèse peptidique sur support solide.

Ces ligands sont susceptibles de trouver de nombreuses applications telles que :

- la préparation de médicaments et, plus particulièrement, la préparation de vaccins et de médicaments destinés à assurer la vectorisation d'un principe actif vers des cellules cibles exprimant le récepteur du mannose ou un récepteur lui étant apparenté,
- la transfection de séquences d'ADN et d'ARN et ses multiples utilisations en thérapie génique ; dans ce dernier cas, on utilisera des ligands se présentant sous la forme de complexes non-covalents entre un composé de formule générale (VI) et une séquence polynucléotidique, et
- la préparation de réactifs de laboratoire et, notamment, de réactifs de diagnostic.

La présente Invention a encore pour objet l'utilisation d'au moins un composé répondant à la formule générale (Ia) et/ou d'au moins un composé répondant à la formule générale (Ib) pour la préparation d'un médicament capable de se lier au récepteur du mannose ou à tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose.

La présente Invention a encore pour objet un composé utile en tant que ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose, tel que précédemment défini, pour l'utilisation en tant que médicament.

Un tel médicament est susceptible de trouver en premier lieu des applications dans toutes les indications thérapeutiques dans lesquelles on recherche une induction, une modulation ou une suppression des réponses immunitaires et, plus particulièrement, de celles qui sont sous le contrôle des cellules T. A titre d'exemples et de façon non-limitative, on peut citer :

- la prévention et le traitement des maladies infectieuses et, notamment, la vaccinologie, auquel cas le composé d'intérêt sera un antigène vaccinal ou un acide nucléique ou un fragment d'acide nucléique codant pour une protéine vaccinale ou pour un ou plusieurs déterminants antigéniques d'une telle protéine, et l'immunothérapie anti-infectieuse non-spécifique ;
- le traitement des maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux disséminé, la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de WEGENER ;
- le traitement des déficits immunitaires congénitaux ou acquis ;
- la prévention ou le traitement des états d'hypersensibilité ;
- le traitement des pathologies cancéreuses ; et
- la prévention des rejets dans les greffes d'organes.

Ce médicament est également susceptible d'être utilisé pour la vectorisation d'un principe actif non-immunomodulateur vers des cellules cibles exprimant un récepteur de la famille des C-lectines. Ainsi, par exemple, les composés utiles en tant que ligands conformes à l'Invention peuvent trouver des applications en antibiothérapie, pour la vectorisation d'antibiotiques telles que les fluoroquinones ou la colistine vers des cellules des lignées des monocytes-macrophages infectées par des bactéries ou par des mycobactéries, ou dans le traitement de maladies liées à une

déficience enzymatique cellulaire comme la maladie de GAUCHER, auquel cas ils serviront à vectoriser l'enzyme déficiente jusqu'aux cellules de KUPFER.

La présente Invention a encore pour objet un composé utile en tant que ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines
5 apparenté au récepteur du mannose, tel que précédemment défini, pour l'utilisation *in vitro*.

La présente Invention a, en outre, pour objet un réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend un composé utile en tant que ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du
10 mannose, tel que précédemment défini.

Outre les dispositions qui précèdent, la présente Invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront du complément de description qui suit, qui se rapporte à des exemples de préparation de composés utiles en tant que composés intermédiaires pour la préparation de ligands du récepteur du mannose conformes à
15 l'Invention, de ligands du récepteur du mannose conformes à l'Invention et de démonstration des propriétés biologiques de ces ligands, ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

- les Figures 1A et 1B illustrent deux exemples de conformations ramifiées susceptibles d'être présentées par le composé A' ;
- 20 - les Figures 2A, 2B et 2C illustrent les structures chimiques de six composés utiles en tant que composés intermédiaires pour la préparation de ligands conformes à l'Invention ;
- les Figures 3 et 4 illustrent les structures chimiques de 4 ligands conformes à l'Invention préparés à partir des composés montrés sur les Figures 2A et
25 2B ;
- la Figure 5 illustre les structures chimiques de deux ligands répondant à la formule (III) conforme à l'Invention, dénommés 33F et 34F ;
- les Figure 6 et 7 illustrent les structures chimiques de quatre ligands répondant à la formule (III) conforme à l'Invention, dénommés 41F, 42F, 43F
30 et 44F ;
- les figures 8 et 9 illustrent les structures chimiques d'un dérivé de l'acide quinique (composé G), de deux dendrimères (composés H et I) et de deux

antigènes peptidiques (composés J et K) utilisables pour former des ligands répondant à la formule (III) conforme à l'Invention, dénommés 51 et 52 ;

- les Figures 10 et 11 illustrent les structures chimiques de deux ligands répondant à la formule (III) conformes à l'invention, dénommés 51 et 52 ;

5 - la Figure 12 illustre la capacité du méthyl-quinat à inhiber l'internalisation du composé 31F, porteurs de résidus du D-mannose, comme décrit dans l'exemple 8 ci-après ;

- la Figure 13 illustre, sous la forme de courbes, les valeurs moyennes des intensités de fluorescence présentées par des cellules dendritiques
10 traitées par 2 ligands conformes à l'Invention (-●- et -◆-) et par 2 composés témoins (-△- et -□-) à des concentrations comprises entre 1 et 10 µM ;

- la Figure 14 illustre, sous la forme de courbes, les valeurs moyennes des intensités de fluorescence présentées par des cellules dendritiques traitées par 2 ligands conformes à l'Invention (-●- et -◆-) et par 2 composés témoins
15 (-△- et -□-) à une concentration de 5 µM après une préincubation desdites cellules en présence de solutions de mannane de concentrations comprises entre 10⁻⁴ et 10 mg/ml ;

- la Figure 15 illustre le pourcentage d'internalisation spécifique de ligands di-, tétra- ou octavalents par le récepteur du mannose, comme décrit dans
20 l'exemple 8 ci-après ;

- la Figure 16 illustre la structure chimique d'un ligand dénommé 61F, constitué d'un dendrimère comprenant 4 résidus L-lysine portant 4 restes de D-mannose, ainsi qu'une molécule de fluorescéine (FITC), comme décrit dans l'exemple 9 ci-après ;

25 - la Figure 17 illustre le pourcentage de cellules positives détectées lors de l'incubation de cellules Cos-1 avec différents composés, tel que décrit dans l'exemple 9 ci-après.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustrations de l'objet de l'Invention et n'en constituent en aucune
30 manière une limitation.

Dans ce qui suit, on utilisera les formules suivantes :

Ac₂O : anhydride d'acétyle

- Boc : t-butyloxycarbonyle
'Bu : *tert*-butyle
DCC : dicyclohexylcarbodiimide
DCM : dichlorométhane
5 DIEA : diisopropyléthylamine
DMF : diméthylformamide
éq. : équivalent
EDTA : éthylène diamide tétraacétique
ESI-MS : spectrométrie de masse à électrospray
10 Fmoc : 9-fluorénylméthoxycarbonyle
HOBT : *N*-hydroxybenzotriazole
HBTU : *N*-oxyde d'hexafluorophosphate de [(1*H*-benzotriazol-1-yl) (diméthylamino)-méthylène]-*N*-méthylméthanaminium
MBHA : 4-méthylbenzhydramine
15 Mtt : 4-méthyltritile
NMP : *N*-méthylpyrrolidone
PBS : tampon phosphate
Pmc : 2,2,2,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulfonyle
RMN : résonance magnétique nucléaire
20 RP-HPLC : chromatographie liquide haute performance en phase inverse
TFA : acide trifluoroacétique
TNBS : acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique
TOF-PDMS : spectrométrie à temps de vol et désorption plasma
Trt : tritile
25 Par ailleurs, dans le cadre des exemples qui suivent :
- la mesure des rotations optiques a été effectuée avec un polarimètre PERKIN-ELMER 241 et les valeurs $[\alpha]_D$ sont exprimées en unités de 10^{-1} degrés.cm²/g ;
 - les chromatographies liquides haute performance en phase inverse semi-préparatives et analytiques ont été réalisées à l'aide d'un système SHIMADZU
- 30 LC-9A ou LC-4A, en utilisant une colonne BECKMANN ultrapore C-8 (300 Å, 5 µm, 4,6 x 250 mm) ou HYPERSIL hyperprep C-18 (300 Å, 8 µm, 15 x 500 mm), un débit de 1 ou de 3 ml/min, une détection à 215 ou à 230 nm, et l'un des 5

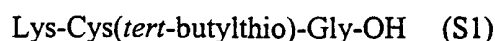
systèmes d'élution suivants :

- système A : TFA à 0,05% dans de l'eau
- système B : TFA à 0,05% dans un mélange acétonitrile/eau (80:20)
- système C : TFA à 0,05% dans un mélange acétonitrile/eau (60:40)
- 5 – système D : tampon phosphate 50 mM, pH 6,95
- système E : un mélange de tampon phosphate 50 mM, pH 6,95, et d'acétonitrile (50:50)
- système F : TFA à 0,05% dans un mélange eau/isopropanol (60:40) ;
- les spectres TOF-PDMS ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre de masse à désorption par plasma APPLIED BIOSYSTEMS Bio-Ion 20 ;
- 10 • les spectres ESI-MS ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre de masse à source d'ionisation par électrospray Micromass Quatro II ; tandis que
- les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre de masse BRUKER DRX 300 ou DRX 600 ; les déplacements chimiques sont exprimés en
- 15 ppm, en prenant comme standard interne, le tétraméthylsilane, celui du sel de sodium de l'acide triméthylsilylpropionique deutéré.

EXEMPLE 1 : PREPARATION DE COMPOSES UTILES EN TANT QUE COMPOSES INTERMEDIAIRES POUR LA PREPARATION DE LIGANDS CONFORMES A L'INVENTION

Six composés se présentant sous la forme de dendrimères et répondant à la formule générale (V) dans laquelle :

- m représente un nombre entier égal à 4, 8 ou 16,
- B^2 représente un reste acide (-)-shikimique ou (-)-quinique,
- 25 • n est un nombre entier égal à 2, 4 ou 8 (dans le cas où m est respectivement égal à 4, 8 et 16),
- X représente le reste d'un tripeptide de séquence (S1) ci-après :



30

- A représente le reste d'un dendrimère comprenant 2, 4 ou 8 (dans le cas où m est

respectivement égal à 4, 8 et 16) résidus L-lysine et présentant, d'une part, 2, 4 ou 8 groupes chloroacétyles pour sa liaison avec un nombre équivalent de tripeptides et, d'autre part, un groupe amine libre propre à permettre sa liaison avec une molécule d'intérêt,

- 5 • M représente un groupe amide (-CO-NH-), tandis que N représente un groupe thioéther (-CH₂-S-CH₂-CO-),

ont été préparés.

La préparation de ces composés a été réalisée en utilisant une stratégie de synthèse convergente, c'est-à-dire en procédant :

- 10 – en premier lieu, à la préparation des dendrimères A',
– puis, à la préparation des tripeptides de séquence (S1) et à leur couplage avec deux molécules d'acide (-)-shikimique ou (-)-quinique, et
– enfin, au couplage des dendrimères A' et des tripeptides porteurs des restes acide (-)-shikimique ou (-)-quinique, par déprotection de la fonction thiol de ces
15 tripeptides et par formation d'une liaison thioéther entre cette fonction thiol et un groupe chloroacétyle desdits dendrimères A'.

Les structures chimiques de ces composés, qui seront dénommés dans ce qui suit :

- 20 • composés 21, 23 et 25, pour ce qui est des composés comprenant respectivement 4, 8 et 16 restes acide (-)-shikimique, et
• composés 22, 24 et 26, pour ce qui est des composés contenant respectivement 4, 8 et 16 restes acide (-)-quinique,

sont représentées sur les Figures 2A, 2B et 2C.

1.1 - Préparation des dendrimères A'

- 25 Chaque dendrimère A' a été préparé à une échelle de 0,5 mmole par une synthèse sur support solide, à partir de 15 g d'une résine MBHA initialement chargée à 0,4 mmoles/g (Société SENN CHEMICALS) et en utilisant :

- une stratégie Boc/benzyle pour la protection des acides aminés à coupler,
• un mélange HBTU/HOBt/DIEA dans du DMF, en tant que réactifs d'activation
30 pour les couplages des acides aminés, et
• des tests à la ninhydrine (KAISER *et al.*, *Anal. Biochem.*, 1970, 34, 595) et au TNBS (HANCOCK et BATTERSBY, *Anal. Biochem.*, 1976, 71, 261) pour le

contrôle des opérations de couplage et de déprotection.

Afin d'abaisser la charge en fonctions amines libres de la résine à une valeur de 0,1 mmoles/g, 0,25 équivalent (par fonction amine devant réagir) de Boc- β -Ala-OH a été, dans un premier temps, couplé à cette résine, en présence d'un
5 mélange HBTU/HOBt/DIEA (0,25 : 0,25 : 0,75 éq. par fonction amine devant réagir) dans du DMF (durée de la réaction : 1 heure). Puis, les groupes amines de la résine restées libres ont été protégés par acétylation, en faisant réagir la résine avec un mélange Ac₂O/DIEA/DCM (5:10:85) pendant 10 minutes.

Le deuxième couplage - correspondant en fait au premier couplage
10 d'une L-lysine - a été réalisé en utilisant 4 équivalents (par fonction amine devant réagir) de Boc-L-Lys(2-chlorobenzoyloxycarbonyl)-OH, c'est-à-dire d'une L-lysine dont la chaîne latérale est protégée par un groupe 2-chlorobenzoyloxycarbonyl, en présence d'un mélange HBTU/HOBt/DIEA (4:4:12 éq. par fonction amine devant réagir) dans du DMF (durée de la réaction : 45 minutes).

15 Le troisième couplage a, lui, été effectué en utilisant 4 équivalents de Boc-L-Lys(Boc)-OH, en présence d'un mélange HBTU/HOBt/ DIEA (4:4:12 éq. par fonction amine devant réagir) dans du DMF (durée de la réaction : 45 minutes).

A l'issue de ce troisième couplage, un tiers de la résine a été déprotégé, puis acylé par 8 équivalents d'anhydride chloroacétique préformé (*via* une
20 activation par du DCC), pour obtenir un dendrimère (dénommé composé 13 dans ce qui suit) comprenant 2 résidus L-lysine et présentant d'une part, un groupe amine libre (qui n'est autre que le groupe ϵ -amine de la première L-lysine ayant été couplée à la β -alanine) et d'autre part, 2 groupes chloroacétyles.

Les deux autres tiers de la résine ont fait l'objet d'un quatrième
25 couplage pour obtenir la fixation de deux L-lysines supplémentaires. Ce couplage a été réalisé avec 4 équivalents de Boc-L-Lys(Boc)-OH, en présence d'un mélange HBTU/HOBt/DIEA (4:4:12 éq. par fonction amine devant réagir) dans du DMF (durée de la réaction : 45 minutes).

A l'issue du quatrième couplage, la moitié de la résine restante (soit
30 1/3 de la quantité de résine initiale) a été à son tour déprotégée et acylée par 8 équivalents d'anhydride chloroacétique préformé pour obtenir un dendrimère (dénommé composé 14 dans ce qui suit) comprenant 4 résidus L-lysine et présentant à

la fois un groupe amine libre et 4 groupes chloroacétyles.

La seconde moitié de la résine restante a été soumise à un cinquième couplage avec 4 équivalents de Boc-L-Lys(Boc)-OH, comme décrit précédemment. Les opérations de déprotection et d'acylation de la résine par l'anhydride chloroacétique ont été reconduites encore une fois pour obtenir un

5 dendrimère à 8 résidus L-lysine (dénommé composé 15 dans ce qui suit) présentant un groupe amine libre et 8 groupes chloroacétyles.

En pratique, lors de chaque opération de couplage, l'HBTU (1 équ. par rapport à l'acide aminé à coupler), après dissolution dans le DMF, a été ajouté à

10 une solution contenant l'acide aminé à coupler (0,25 équ. par rapport aux fonctions -NH₂ pour la β -alanine, et 4 équ. pour le couplage des lysines), de l'HOBt (1 équ. par rapport à l'acide aminé) et de la DIEA (3 équ. par rapport à l'acide aminé) dans du DMF. L'ensemble a été mélangé pendant 1 minute à température ambiante, puis ajouté à la résine préalablement imbibée par du DMF. La suspension a été agitée

15 mécaniquement pendant toute la durée de la réaction.

Par ailleurs, entre chaque opération de couplage, la résine a été successivement filtrée, lavée 3 fois avec du DMF (3 x 2 minutes) et du DCM (3 x 2 minutes), traitée par un mélange TFA/DCM (50:50, 1 x 2 minutes, 1 x 20 minutes) propre à permettre le clivage des groupements protecteurs Boc, lavée

20 à nouveau par du DCM (2 x 2 minutes), neutralisée avec un mélange DIEA/DCM (5:95 ; 3 x 1 minute) et lavée une dernière fois avec du DCM (2 x 1 minute).

Le clivage des dendrimères et leur déprotection ont été obtenus en faisant réagir la résine avec 11 ml d'un mélange HF/anisole (10:1) par gramme de résine, à 0°C et pendant 60 minutes. A la suite de quoi, ils ont été successivement

25 précipités dans du *tert*-butylméthyléther froid, centrifugés, dissout dans de l'eau, lyophilisés et purifiés par une RP-HPLC semi-préparative [gradient (A/B) : 100:0 à 50:50 en 120 minutes].

Ont été ainsi obtenus :

- 160 mg de dendrimère 13 (Rdt : 52%) ; spectre TOF-PDMS : m/z 498 (M+H)⁺ ;
- 30 • 215 mg de dendrimère 14 (Rdt : 42%) ; spectre TOF-PDMS : m/z 928 (M+Na)⁺ ;
et
- 182 mg de dendrimère 15 (Rdt : 20%) ; spectre TOF-PDMS : m/z 1726 (M+H)⁺.

1.2 – Préparation des tripeptides porteurs des restes acide (-)-shikimique et (-)-quinique

La préparation des tripeptides porteurs des restes acide (-)-shikimique et (-)-quinique a été réalisée sur support solide, en synthétisant dans un premier temps le peptide de séquence (S1) et en couplant dans un deuxième temps une molécule de ce tripeptide avec 2 molécules d'acide (-)-shikimique ou 2 molécules dérivées de l'acide (-)-quinique, par formation d'une liaison entre les groupes amine de la L-lysine N-terminale dudit tripeptide et le groupe carboxyle desdits acides.

Ont été ainsi obtenues :

- 10 • d'une part, la N^{α},N^{ϵ} -di-[(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4,5-trihydroxy-1-cyclohexenecarbox-1-yl]-L-lysyl-[*S*-(*tert*-butylthio)]-L-cystéyl-glycine, qui sera dénommée composé 1 dans ce qui suit, et
- d'autre part, la N^{α},N^{ϵ} -di-[(1*S*_n,3*R*,4*S*_n,5*R*)-1,3,4,5-tétrahydroxy-1-cyclohexanecarbox-1-yl]-L-lysyl-[*S*-(*tert*-butylthio)]-L-cystéyl-glycine, qui sera dénommée
- 15 composé 3 dans ce qui suit.

a) Préparation du composé 1

Le composé 1 a été préparé à une échelle de 2 mmoles à l'aide d'une résine Fmoc-glycine *p*-benzyloxybenzyle (disponible sous la dénomination commerciale Fmoc-Gly-O-Wang auprès de la Société NOVABIOCHEM) chargée à 0,8 mmoles/g, et en utilisant :

- 20 • une stratégie Fmoc pour la protection des fonctions amine des acides aminés à coupler,
- un mélange HBTU/DIEA dans de la NMP, en tant que réactifs d'activation pour les couplages des acides aminés,
- 25 • un mélange pipéridine/NMP pour éliminer les groupements protecteurs Fmoc, et
- des tests à la ninhydrine et au TNBS pour le contrôle des réactions de couplage et de déprotection.

Après élimination des groupements Fmoc protégeant les fonctions amine des résidus glycine de la résine, par traitement de cette dernière par un mélange pipéridine/NMP (20:80) pendant 20 minutes, le couplage du résidu *S*-(*tert*-butylthio)-L-cystéine a été réalisé en utilisant 2 équivalents (par groupe amine devant réagir) de Fmoc-L-Cys(*tert*-butylthio)-OH en présence du mélange HBTU/DIEA (2:3 éq.) dans

de la NMP (durée de la réaction : 40 minutes). L'utilisation d'un groupe *tert*-butylthiol comme groupement protecteur de la fonction thiol du résidu L-cystéine a été choisie en raison de ce que ce groupe est à la fois peu sensible aux conditions réactionnelles utilisées au cours des opérations de couplage et de clivage, tout en étant susceptible
5 d'être aisément éliminé par l'action de trialkylphosphines.

Ce premier couplage a été suivi d'un second couplage destiné à fixer la L-lysine du tripeptide, lequel a été effectué en utilisant 2 équivalents de Fmoc-L-Lys(Fmoc)-OH en présence de 5 équivalents de mélange HBTU/DIEA (2:3 éq.) dans de la NMP (durée de la réaction : 40 minutes).

10 Puis, il a été procédé au couplage des deux molécules d'acide (-)-shikimique en activant 2 équivalents (par fonction amine devant réagir) de cet acide par un mélange HBTU/DIEA (1:1 éq.) dans de la NMP pendant 30 secondes, et en ajoutant ledit acide à la résine préalablement imbibée dans du NMP (durée de la réaction : 40 minutes).

15 Au terme de cette opération de couplage, le solvant a été filtré, la résine a été lavée successivement avec de la NMP (3 x 2 minutes) et du DCM (3 x 2 minutes), puis séchée.

Le clivage du composé 1 a été réalisé en traitant la résine par 25 ml d'un mélange TFA/H₂O/Me₂S (95:2,5:2,5) à la température ambiante pendant
20 2 heures. La solution a été concentrée sous pression réduite et le résidu ainsi obtenu a été dissous dans de l'eau, puis soumis à une lyophilisation conduisant à l'obtention d'1,64 g d'une poudre jaune pâle. 107 mg de cette poudre ont été purifiés par une RP-HPLC semi-préparative [gradient (A/B) : 100:0 à 50:50 en 110 minutes], ce qui a permis d'obtenir, après lyophilisation, 15 mg de composé 1 pur, soit un rendement de
25 14%.

Le composé 1 présente les caractéristiques suivantes :

Rotation optique : $[\alpha]_D^{25}$ -117 (c 0.19, H₂O) ;

Spectre RMN ¹H : δ_H (300 MHz; H₂O-D₂O 90:10) 1.16 (3 x 3 H, 3 s, C(CH₃)₃), 1.14-1.35 (2 H, m, 2 lysyl γ -H), 1.37-1.44 (2 H, m, 2 lysyl δ -H), 1.62-1.75 (2 H, m, 2 lysyl
30 β -H), 2.00-2.11 (2 H, m, 2 6-H), 2.59 (1 H, dd, J 11.3 et J 17.4, 1 6-H), 2.60 (1 H, dd, J 11.1 et J 17.0, 1 6-H), 2.90 (1 H, dd, $J_{\alpha,\beta}$ 7.0 et $J_{\beta,\beta'}$ 14.1, 1 cystéyl β -H), 3.04-

3.16 (2 H, m, 2 lysyl ϵ -H), 3.09 (1 H, dd, $J_{\alpha,\beta}$ 4.9 et $J_{\beta,\beta'}$ 14, 1 cystéyl β -H), 3.58 et 3.59 (2 H, 2 dd, $J_{3,4}$ 4.6 et $J_{4,5}$ 9.2, 2 4-H), 3.73-3.76 (2 H, m, 2 glycyl α -H), 3.83-3.88 (2 H, m, 2 5-H), 4.17 (1 H, m, lysyl α -H), 4.25-4.29 (2 H, m, 2 3-H), 4.52 (1 H, m, 1 cystéyl α -H), 6.22 et 6.28 (2 H, 2 br d, $J_{2,3}$ 4.0, 2 2-H), 7.86 (1 H, t, $J_{e,NH}$ 5.4, 1 lysyl ^eNH), 8.02 (1 H, t, $J_{\alpha,NH}$ 5.6, 1 glycyl NH), 8.06 (1 H, d, $J_{\alpha,NH}$ 6.6, 1 lysyl ^aNH), 8.32 (1 H, d, $J_{\alpha,NH}$ 7.7, 1 cystéyl NH);

Spectre RMN ^{13}C : δ_C (81.3 MHz; H_2O-D_2O 90:10) 22.9 (lysyl γ -C), 28.3 (lysyl δ -C), 29.4 ($C(CH_3)_3$), 30.7 (lysyl β -C), 31.7 et 31.5 (2 6-C), 39.8 (lysyl ϵ -C), 40.6 (cystéyl β -C), 41.8 (glycyl α -C), 48.7 ($C(CH_3)_3$), 53.3 (cystéyl α -C), 54.9 (lysyl α -C), 66.3 et 66.8 (2 4-C et 2 5-C), 71.9 et 72.0 (2 3-C), 131.1 et 132.1 (2 1-C), 133.1 et 133.7 (2 2-C), 170.5, 171.0, 172.7, 173.4 et 174.6 (5 $XC=O$) ;

Spectre TOF-PDMS : m/z 729 ($M+Na$) $^+$.

Les constantes de couplage entre les protons 3-H/4-H et 4-H/5-H des deux restes acide (-)-shikimique présents dans le composé 1 telles que déterminées par spectrométrie RMN ^1H sont respectivement de 4,6 et 9,2 Hz. Ces constantes sont compatibles avec une orientation pseudo-équatoriale des fonctions hydroxyles portées par les atomes de carbone situés en positions 4 et 5 desdits acides et viennent confirmer l'analogie de structure existant entre l'acide (-)-shikimique et le D-mannose.

b) Préparation du composé 3

Le composé 3 a été préparé à une échelle de 2 mmoles à l'aide d'une résine Fmoc-glycine *o*-methoxy-*p*-(benzyloxy)benzyle (disponible sous la dénomination commerciale Fmoc-Gly-Sasrin auprès de la Société BACHEM) chargée à 0,8 mmoles/g et en utilisant :

- une stratégie Fmoc/*tert*-butyle pour la protection des acides aminés à coupler,
- un mélange HBTU/DIEA dans de la NMP, en tant que réactifs d'activation pour les couplages des acides aminés,
- un mélange pipéridine/NMP pour éliminer les groupements protecteurs Fmoc, et
- des tests à la ninhydrine et au TNBS pour le contrôle des opérations de couplage et de déprotection.

Les couplages de la S-(*tert*-butylthio)-L-cystéine et de la L-lysine ont été réalisés dans des conditions identiques à celles utilisées pour la préparation du

composé 1.

Par contre, le couplage des deux molécules d'acide (-)-quinique a été, lui, effectué selon un protocole opératoire différent de celui utilisé pour le couplage de l'acide (-)-shikimique. En effet, il s'est avéré que l'activation de l'acide (-)-quinique se traduisait immédiatement par la formation d'une γ -lactone bicyclique, par estérification entre le groupe carboxyle porté par le carbone situé en position 1 et le groupe hydroxyle porté par le carbone situé en position 3 de cet acide, et qu'il était donc nécessaire de protéger les fonctions hydroxyle de l'acide (-)-quinique avant de procéder à son couplage.

Il a donc été choisi de soumettre l'acide (-)-quinique à une peracétylation par de l'anhydride acétique, de manière à obtenir l'acide (1*S*_n,3*R*,4*S*_n,5*R*)-1,3,4,5-tétraacétoxycyclohexane-1-carboxylique qui n'est autre que le dérivé tétraacétylé de l'acide (-)-quinique et qui sera dénommé composé 9 dans ce qui suit, puis de transformer ce dernier en son fluorure d'acide (dénommé composé 18 dans ce qui suit) en traitant le composé 9 par du fluorure de cyanuryle.

Pour ce faire, une goutte d'acide perchlorique a été ajoutée, à température ambiante et sous agitation, à une suspension contenant 4 g (21 mmoles) d'acide (-)-quinique dans 30 ml d'un mélange acide acétique/Ac₂O (2:1). L'agitation a été poursuivie pendant 12 heures au terme desquelles le mélange résultant a été dilué avec du chloroforme et soumis à une extraction par une solution saturée en bicarbonate de sodium, puis par de l'eau. La couche organique a été séchée par du sulfate de sodium, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le résidu a été précipité par addition de pentane pour donner 6,45 g de composé 9, soit un rendement de 86%.

La transformation de l'acide 9 en son fluorure a été réalisée en ajoutant, goutte à goutte et sous agitation, 937 μ l (11,10 mmoles) de fluorure de cyanuryle à une solution comprenant 500 mg (1,39 moles) de composé 9 dans 6 ml de chlorure de méthylène et 112 μ l (1,39 mmoles) de pyridine, et en portant le mélange résultant à reflux pendant 2 heures. Un précipité blanc s'étant formé, ce mélange a été filtré, puis il a été soumis à une extraction par de l'eau. L'élimination du solvant de la couche organique, après séchage de cette dernière par du sulfate de sodium, a conduit à l'obtention d'une huile correspondant au composé 18 et qui a été soumise à un séchage sous vide pendant plusieurs heures.

Les composés 9 et 18 présentent les caractéristiques spectrales suivantes :

Composé 9 :

Spectre RMN ^1H : δ_{H} (300 MHz; CDCl_3) 1.87 (1 H, dd, $J_{5,6}$ 10.2 et $J_{6,6'}$ 13.6, 6-H),
5 1.96, 1.98, 2.03 et 2.08 (4 x 3 H, 4 s, 4 CH_3), 1.98-2.03 (1 H, m, 6'-H), 2.36 (1 H, dd,
 $J_{2,2'}$ 15.9 et $J_{2,3}$ 3.3, 2-H), 2.50 (1 H, dd, $J_{2,2'}$ 15.9 et $J_{2,3}$ 3.2, 2'-H), 4.97 (1 H, dd, $J_{3,4}$
3.4 et $J_{4,5}$ 9.4, 4-H), 5.31 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 9.4, $J_{5,6}$ 10.2 et $J_{5,6'}$ 4.2, 5-H), 5.50 (1 H, m, 3-
H) ;

Spectre RMN ^{13}C : δ_{C} (81.3 MHz; CDCl_3) 21.0, 21.1, 21.2 et 21.4 (4 CH_3), 32.0 et
10 36.3 (2-C et 6-C), 66.7, 67.7 et 71.3 (3-C, 4-C et 5-C), 78.8 (1-C), 170.1-170.5 (4
 CO_2Me), 173.1 (CO_2H) ;

Composé 18 :

Spectre RMN ^1H : δ_{H} (300 MHz; CDCl_3) 1.97-2.05 (1 H, m, 6-H), 2.03, 2.06, 2.08 et
2.16 (4 x 3 H, 4 s, 4 CH_3), 2.45 (1 H, dd, $J_{2,2'}$ 15.4 et $J_{2,3}$ 3.7, 2-H), 2.50-2.66 (2 H, m,
15 2'-H et 6'-H), 5.08 (1 H, dd, $J_{3,4}$ 3.5 et $J_{4,5}$ 9.1, 4-H), 5.38 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 9.1, $J_{5,6'}$ 9.1
et $J_{5,6}$ 5.1, 5-H), 5.56 (1 H, m, 3-H) ;

Spectre RMN ^{13}C : δ_{C} (81.3 MHz; CDCl_3) 20.4, 20.6, 20.8 et 20.9 (4 CH_3), 31.9 et 35.4
(2-C et 6-C), 66.0, 68.2 et 70.4 (3-C, 4-C et 5-C), 76.7 ($J_{\text{C,F}}$ 53.2, 1-C), 160.3 ($J_{\text{C,F}}$
373.4, COF), 169.6, 169.7, 169.8 et 169.8 (4 CO_2Me).

20 Le couplage des deux molécules de composé 18 a été réalisé en
acylant la résine une première fois par 2 équivalents (par fonction amine devant
réagir) de composé 18 en présence de 3 équivalents de DIEA dans de la NMP (durée
de la réaction : 60 minutes), puis, après avoir lavé la résine avec de la NMP (3 x 2
minutes) et du DCM (3 x 2 minutes), en l'acylant une seconde fois, mais en utilisant 1
25 équivalent des différents réactifs.

Au terme de cette opération de couplage, le solvant a été filtré, la
résine a été lavée successivement avec de la NMP (3 x 2 minutes) et du DCM (3 x 2
minutes), puis séchée.

Le clivage du composé 3 a été obtenu en traitant la résine par 20 ml
30 d'un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}/^i\text{Pr}_3\text{SiH}$ (95:2:3) (4 x 5 minutes). La solution a été
concentrée sous pression réduite et le résidu ainsi obtenu a été dissout dans de l'eau,

puis soumis à une lyophilisation conduisant à l'obtention d'1,40 g d'un composé brut qui a été dissout dans 25 ml de méthanol. A la solution ainsi obtenue, a été ajouté, goutte à goutte et sous agitation, du méthylate de sodium méthanolique 1 M jusqu'à l'obtention d'un pH d'environ 9, puis on a laissé ce mélange réagir pendant 3 heures, en contrôlant le déroulement de la réaction par une RP-HPLC. Le mélange a été ensuite concentré sous pression réduite. Un échantillon de 100 mg du résidu a été purifié par une RP-HPLC semi-préparative [gradient (A/B) : 100:0 à 90:10 en 10 minutes, puis 90:10 à 50:50 en 70 minutes] pour conduire à l'obtention, après lyophilisation, de 41 mg de composé 3 pur, soit un rendement de 59%.

Le composé 3 présente les caractéristiques suivantes :

Rotation optique : $[\alpha]_D^{25} -73$ (c 0.49, H₂O) ;

Spectre RMN ¹H : δ_H (300 MHz; H₂O-D₂O 90:10) 1.12 (3 x 3 H, s, 3 CH₃), 1.15-1.22 (2 H, m, 2 lysyl γ -H), 1.34 (2 H, quintet, $J_{\gamma,\delta}$ 7.2 et $J_{\delta,\epsilon}$ 7.2, 2 lysyl δ -H), 1.57-1.90 (10 H, m, 2 lysyl β -H, 4 2-H et 4 6-H), 2.83 (1 H, dd, $J_{\alpha,\beta}$ 8.6 et $J_{\beta,\beta'}$ 14, 1 cystéyl β -H), 3.02 (3 H, m, 1 cystéyl β -H et 2 lysyl ϵ -H), 3.33 (2 H, dd, $J_{3,4}$ 9.6 et $J_{4,5}$ 2.9, 2 4-H), 3.79 (2 H, d, $J_{\alpha,NH}$ 5.8, 2 glycyll α -H), 3.80-3.90 (2 H, m, 2 5-H), 4.01 (2 H, br s, 2 3-H), 4.11 (1 H, dt, $J_{\alpha,NH}$ 7.0 et $J_{\alpha,\beta}$ 7.2, 1 lysyl α -H), 4.54 (1 H, dt, $J_{\alpha,NH}$ 7.6 et $J_{\alpha,\beta}$ 6.0, 1 cystéyl α -H), 8.02 (1 H, t, $J_{\alpha,NH}$ 5.9, 1 lysyl ϵ NH), 8.11 (1 H, d, $J_{\alpha,NH}$ 7.0, 1 lysyl α NH), 8.21 (1 H, t, $J_{\alpha,NH}$ 5.8, 1 glycyll NH), 8.35 (1 H, d, $J_{\alpha,NH}$ 7.6, 1 cystéyl NH) ;

Spectre RMN ¹³C : δ_C (81.3 MHz; H₂O-D₂O 90:10) 22.7 (lysyl γ -C), 28.3 (lysyl δ -C), 29.4 (C(CH₃)₃), 30.9 (lysyl β -C), 37.5 (2 2-C), 39.4 (lysyl ϵ -C), 40.7 (cystéyl β -C et 2 6-C), 41.8 (glycyll α -C), 48.6 (C(CH₃)₃), 53.1 (cystéyl α -C), 54.4 (lysyl α -C), 66.7 et 66.8 (2 3-C), 70.8 (2 5-C), 75.4 (2 4-C), 77.2 (2 1-C), 172.5, 173.4, 174.4, 177.1 et 177.4 (5 XC=O) ;

Spectre ESI-MS : m/z 741 (M-H)⁺.

Les constantes de couplage entre les protons 3-H/4-H et 4-H/5-H des deux restes acide (-)-quinique présents dans le composé 3 telles que déterminées par spectrométrie RMN ¹H sont respectivement de 9,6 et 2,9 Hz. Ces constantes sont compatibles avec une conformation « chaise » du cyclohexane plaçant le groupe amide en position équatoriale, les hydroxyles 3 et 4 en relation *trans* di-équatoriale et les hydroxyles 4 et 5 en relation *cis* équatoriale-axiale.

1.3 - Couplages des dendrimères A' et des tripeptides porteurs des restes acide (-)-shikimique et (-)-quinique

Les couplages des composés 13, 14 et 15 et des composés 1 et 3 ont été réalisés selon une procédure comprenant 2 étapes, à savoir :

- 5 • une première étape visant à réduire la liaison disulfure (S-SBu') que présente chacun des composés 1 et 3, en traitant ces composés par du tri-*n*-butylphosphine dans un mélange *n*-propanol/eau dégazés (50:50), de manière à obtenir l'élimination du groupe protecteur *tert*-butylthiol porté par chacun des composés 1 et 3 et, partant, la déprotection de leur fonction thiol, et
 - 10 • une seconde étape visant à faire réagir les composés 1 et 3 ainsi réduits avec les composés 13, 14 et 15, dans un mélange DMF/eau dégazés (90:10) et en présence de carbonate de potassium, de manière à obtenir la formation d'une liaison thioéther entre la fonction thiol des composés 1 et 3 et l'une des fonctions chloroacétyles des composés 13, 14 et 15.
- 15 Ainsi, à une solution contenant 1,5 équivalent (par groupe chloroacétyle devant réagir à la deuxième étape) de composé 1 ou de composé 3 dans 1 ml d'un mélange *n*-propanol/eau dégazés (50:50), a été ajouté 1 équivalent de tri-*n*-butylphosphine. Chaque mélange réactionnel a été laissé, sous agitation et sous azote, à température ambiante pendant 24 heures, puis les solvants et le *tert*-butylmercaptan
- 20 libéré ont été évaporés sous pression réduite et les résidus ont été séchés sous vide pendant 15 minutes.

Chacun de ces résidus, après dissolution dans un mélange DMF/eau dégazés (90:10), a été ajouté à 1 équivalent (1-5 μ moles) d'un composé 13, 14 ou 15 et à 20 équivalents de carbonate de potassium. Chaque mélange réactionnel a été laissé,

25 sous agitation et à température ambiante, pendant 72 à 96 heures - les réactions étant contrôlées par des RP-HPLC -, puis, dilué dans de l'eau et lyophilisé. Les résidus ont été alors purifiés par des RP-HPLC semi-préparatives.

Ont été ainsi obtenus :

- 30 • 3,39 mg de composé 21 (Rdt : 61%) en utilisant un gradient (A/C) : 100:0 à 70:30 en 70 minutes,
- 5,98 mg de composé 22 (Rdt : 66%) en utilisant un gradient (A/C) : 100:0 à 75:25 en 25 minutes, puis isocratique,

- 2,25 mg de composé **23** (Rdt : 42%) en utilisant un gradient (A/C) : 100:0 à 80:20 en 35 minutes, puis isocratique,
- 5,75 mg de composé **24** (Rdt : 56%) en utilisant un gradient (A/C) : 100:0 à 75:25 en 25 minutes, puis isocratique,
- 5 • 3,15 mg de composé **25** (Rdt : 43%) en utilisant un gradient (A/C) : 100:0 à 75:25 en 40 minutes, puis isocratique, et
- 7,03 mg de composé **26** (Rdt : 61%) en utilisant un gradient (A/C) 100:0 à 80:20 en 35 minutes, puis isocratique,

se présentant tous sous la forme d'une poudre blanche.

- 10 Les composés **21** à **26** présentent les caractéristiques spectrales suivantes :

Composé 21 :

Spectre RMN ^1H :

- δ_{H} (600 MHz; $\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$ 90:10) 1.31-1.46 (8 H, m, 8 lysyl γ -H), 1.43-1.60 (6 H, m, 6 lysyl δ -H), 1.64 (2 H, m, 2 lysyl δ -H), 1.68-1.89 (8 H, m, 8 lysyl β -H), 2.17-2.23 (4 H, m, 4 6-H), 2.46 and 2.51 (2 x 1 H, 2 dt, $J_{\alpha,\alpha'}$ 15.4 and $J_{\alpha,\beta}$ 6.2, 2 alanyl α -H), 2.70-2.80 (4 H, m, 4 6'-H), 2.89-2.95 (2 H, m, 2 cystéyl β -H), 2.96-3.01 (2 H, m, 2 lysyl ϵ -H), 3.06 (2 H, dd, $J_{\alpha,\beta}$ 5.3 and $J_{\beta,\beta'}$ 14.9, 2 cystéyl β' -H), 3.21 (2 H, m, 2 lysyl ϵ -H), 3.25 (2 H, m, 2 lysyl ϵ -H), 3.27 (1 H, d, J 16.5, CHH), 3.30 (1 H, d, J 16.5, CHH), 3.33 (2 H, s, CH_2), 3.41-3.50 (2 x 1 H, 2 ddt, $J_{\alpha,\beta}$ 6.2, $J_{\beta,\beta'}$ 12.6 and $J_{\beta,\text{NH}}$ 6.2, 2 β -alanyl β -H), 3.71-3.76 (4 H, m, 4 4-H), 3.95 (4 H, d, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 6.3, 4 glycyl α -H), 4.00-4.05 (4 H, m, 4 5-H), 4.25 (2 H, dt, $J_{\alpha,\beta}$ 5.6 and $J_{\alpha,\text{NH}}$ 6.3, 2 lysyl α -H), 4.32-4.38 (4 H, m, 4 lysyl α -H), 4.42-4.44 (4 H, m, 4 3-H), 4.58-4.62 (2 H, m, 2 cystéyl α -H), 6.38 and 6.44 (2 x 2 H, 2 br d, $J_{2,3}$ 4.0, 2 x 2 2-H), 6.90 (1 H, s, NHH), 7.54 (br s, $^{\epsilon}\text{NH}_2$), 7.60 (1 H, s, NHH), 8.07 (2 H, t, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 6.8, 2 lysyl $^{\epsilon}\text{NH}$), 8.15 (1 H, t, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 6.2, β -alanyl NH), 8.24 (1 H, t, $J_{\epsilon,\text{NH}}$ 6.3, 1 lysyl $^{\epsilon}\text{NH}$), 8.25-8.27 (2 H, m, 2 lysyl $^{\alpha}\text{NH}$), 8.31 and 8.32 (2 x 1 H, 2 t, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 6.3, 2 glycyl NH), 8.42 (1 H, d, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 6.8, 1 lysyl $^{\alpha}\text{NH}$), 8.47 (1 H, d, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 6.3, 1 lysyl $^{\alpha}\text{NH}$), 8.61 (2 H, d, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 7.6, 2 cystéyl NH) ;

Spectre ESI-MS : m/z 1660.4 (M-H) $^-$, 829.9 (M-2H) $^{2-}$.

Composé 22 :**Spectre RMN ^1H :**

δ_{H} (300 MHz; $\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$ 90:10) 1.22-1.28 (8 H, m, 8 lysyl γ -H), 1.34-1.43 (6 H, m, 6 lysyl δ -H), 1.52 (2 H, m, 2 lysyl δ -H), 1.57-1.64 (8 H, m, 8 lysyl β -H), 1.65-1.99 (16 H, m, 8 2-H and 8 6-H), 2.33 (2 H, t, $J_{\alpha,\beta}$ 6.3, 2 β -alanyl α -H), 2.69-2.84 (4 H, m, 2 cystéyl β -H and 2 lysyl ϵ -H), 2.92 (2 H, dd, $J_{\alpha,\beta}$ 5.3 and $J_{\beta,\beta'}$ 14, 1 2 cystéyl β -H), 2.98-3.11 (6 H, m, 6 lysyl ϵ -H), 3.15 and 3.19 (2 x 2 H, 2 s, 2 CH_2), 3.23 and 3.34 (2 x 1 H, 2 ddt, $J_{\alpha,\beta}$ 5.3, $J_{\beta,\beta'}$ 13.0 and $J_{\beta,\text{NH}}$ 5.7, 2 β -alanyl β -H), 3.38 (4 H, dd, $J_{3,4}$ 3.1 and $J_{4,5}$ 9.7, 4 4-H), 3.76 and 3.77 (4 H, 2 t, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 6.3, 2 glycyl α -H), 3.87-3.96 (4 H, m, 4 5-H), 4.06 (4 H, br s, 4 3-H), 4.10-4.16 (4 H, m, 4 lysyl α -H), 4.60-4.64 (2 H, m, 2 cystéyl β -H), 6.73 and 7.42 (2 x 1 H, 2 s, NH_H and NH_H), 7.96 (1 H, t, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 5.7, β -alanyl NH), 8.07 (1 H, t, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 6.3, 1 lysyl $^{\epsilon}\text{NH}$), 8.10 (1 H, t, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 6.9, 1 lysyl $^{\epsilon}\text{NH}$), 8.11 (2 H, t, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 6.3, 2 glycyl NH), 8.12 (1 H, t, $J_{\epsilon,\text{NH}}$ 6.8, 1 lysyl $^{\epsilon}\text{NH}$), 8.13 (2 H, d, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 6.8, 2 lysyl $^{\alpha}\text{NH}$), 8.25 (1 H, d, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 6.7, 1 lysyl $^{\alpha}\text{NH}$), 8.29 (1 H, d, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 6.3, 1 lysyl $^{\alpha}\text{NH}$), 8.39 (2 H, d, $J_{\alpha,\text{NH}}$ 7.6, 2 cystéyl NH ;

Spectre ESI-MS : m/z 1732.5 (M-H) $^-$, 865.6 (M-2H) $^{2-}$.

Composé 23 :

Spectre ESI-MS : mesuré : 3235.0, calculé : 3235.6, m/z 1616.4 (M-2H) $^{2-}$, 1077.3 (M-3H) $^{3-}$, 807.7 (M-4H) $^{4-}$.

Composé 24 :

Spectre ESI-MS : mesuré : 3379.0, calculé : 3379.7, m/z 1688.3 (M-2H) $^{2-}$, 1125.3 (M-3H) $^{3-}$, 843.8 (M-4H) $^{4-}$.

Composé 25 :

Spectre ESI-MS : mesuré : 6382.0, calculé : 6383.0, m/z 1594.5 (M-4H) $^{4-}$, 1275.5 (M-5H) $^{5-}$, 1062.8 (M-6H) $^{6-}$, 910.8 (M-7H) $^{7-}$.

Composé 26 :

Spectre ESI-MS : mesuré : 6671.0, calculé : 6671.2, m/z 2221.9 (M-3H) $^{3-}$, 1666.7 (M-4H) $^{4-}$, 1333.1 (M-5H) $^{5-}$, 1110.8 (M-6H) $^{6-}$, 952.0 (M-7H) $^{7-}$.

EXEMPLE 2 : PREPARATION DE LIGANDS CONFORMES A L'INVENTION

Quatre ligands - qui seront dénommés ligands 21F, 22F, 23F et 24F dans ce qui suit - et répondant à la formule générale (III) dans laquelle :

- 5 • m représente un nombre entier égal à 4 ou 8,
 - B¹ représente un reste acide (-)-shikimique ou (-)-quinique,
 - n est un nombre entier égal à 2 ou 4 (dans le cas où m est respectivement égal à 4 et 8),
 - X représente le reste d'un tripeptide de séquence (S1) telle que définie dans
10 l'exemple 1,
 - A représente le reste d'un dendrimère A' comprenant 2 ou 4 (dans le cas où m est respectivement égal à 4 et 8) résidus L-lysine et présentant, d'une part, 2 ou 4 groupes chloroacétyles pour sa liaison avec un nombre équivalent de tripeptides et, d'autre part, un groupe amine libre propre à permettre sa liaison avec Y,
 - 15 • Y représente le reste d'une molécule de fluorescéine,
 - M représente un groupe amide (-CO-NH-), N représente un groupe thioéther (-CH₂-S-CH₂-CO-), tandis que P représente un groupe thiourée (-NH-CS-NH-),
- ont été préparés en couplant les composés 1 et 3, après déprotection de leur fonction thiol dans des conditions identiques à celles décrites au § 1.4 dudit exemple 1, avec
20 des composés 13 et 14 ayant préalablement réagi avec du FITC.

Ainsi, comme décrit au § 1.4 de l'exemple 1, à une solution contenant 1,5 équivalent (par groupe chloroacétyle devant réagir ultérieurement) de composé 1 ou de composé 3 dans 1 ml d'un mélange *n*-propanol/eau dégazés (50:50), a été ajouté 1 équivalent de tri-*n*-butylphosphine. Chaque mélange réactionnel a été
25 laissé, sous agitation et sous azote, à température ambiante pendant 24 heures, puis les solvants ont été évaporés sous pression réduite et les résidus ont été séchés sous vide pendant 15 minutes.

Par ailleurs, 1 équivalent (1-2,5 µmoles) de composé 13 ou 14 a été mis à réagir avec 1,1 équivalent de FITC et 4 équivalents de diisopropyléthylamine
30 dans 1 ml de DMF dégazé, à température ambiante et à l'obscurité, pendant 4 heures au terme desquelles chaque mélange réactionnel a été ajouté à une solution comprenant l'un des résidus précédemment obtenus dans 300 µl d'eau dégazée. Les

parois des récipients contenant lesdits mélanges réactionnels ont été rincées avec 200 µl de DMF dégazé et le pH des différents mélanges réactionnels a été amené à une valeur de 8-8,5 par addition de carbonate de potassium.

Ces mélanges réactionnels ont ensuite été laissés à l'obscurité pendant 48 heures, les réactions étant contrôlées par des RP-HPLC. Puis, chaque mélange réactionnel a été dilué dans de l'eau contenant 10% d'acide acétique et lyophilisé et les résidus ont été purifiés par des RP-HPLC semi-préparatives.

Ont été ainsi obtenus :

- 1,82 mg de ligand **21F** (Rdt : 46%) en utilisant un gradient (A/C) : 100:0 à 75:25 en 15 minutes, puis 75:25 à 65:35 en 30 minutes,
 - 1,42 mg de ligand **22F** (Rdt : 27%) en utilisant un gradient (A/C) : 100:0 à 75:25 en 15 minutes, puis 75:25 à 65:35 en 30 minutes,
 - 4,56 mg de ligand **23F** (Rdt : 62%) en utilisant un gradient (A/C) : 100:0 à 85:15 en 15 minutes, puis 85:15 à 70:30 en 30 minutes,
 - 3,57 mg de ligand **24F** (Rdt : 50%) en utilisant un gradient (A/C) : 100:0 à 85:15 en 15 minutes, puis 85:15 à 70:30 en 30 minutes,
- se présentant tous sous la forme d'une poudre blanche.

Les structures chimiques de ces ligands sont représentées sur les Figures 3 et 4.

Leurs spectres ESI-MS sont les suivants :

- ligand **21F** : m/z 2123.5 (M-H)⁻, 1062.3 (M-2H)²⁻
- ligand **22F** : mesuré : 2051.0, calculé : 2051.2, m/z 1026.1 (M-2H)²⁻
- ligand **23F** : mesuré : 3769.0, calculé : 3769.1, m/z 1254.9 (M-3H)³⁻, 941.2 (M-4H)⁴⁻
- ligand **24F** : mesuré : 3624.0, calculé : 3624.1, m/z 1207.0 (M-3H)³⁻, 905.4 (M-4H)⁴⁻.

EXEMPLE 3 : PREPARATION DE LIGANDS CONFORMES A L'INVENTION

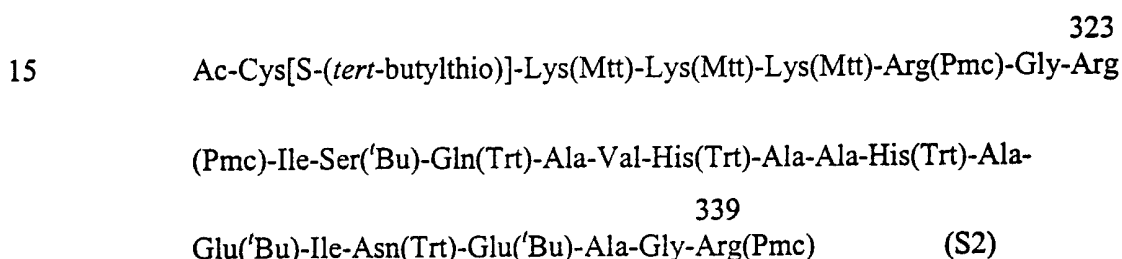
Deux ligands répondant à la formule générale (III) dans laquelle :

- m est un nombre entier égal à 3,
- B¹ représente un reste acide (-)-shikimique ou (-)-quinique,

- n est un nombre entier égal à 0 (en sorte que X est absent),
 - A représente le reste d'un enchaînement linéaire A' comprenant 3 résidus L-lysine et présentant 3 groupes amines libres pour son couplage avec les trois molécules d'acide (-)-shikimique ou (-)-quinique et étant, d'autre part, lié à Y *via* une liaison amide,
 - Y représente un composé d'intérêt formé par trois résidus Arg-Gly-Arg liés à un épitope de classe II, en l'espèce le peptide 323-339 d'ovalbumine de poule (qui sera dénommé Ova 323-339 dans ce qui suit),
 - M et P représentent un groupe amide (-CO-NH-),
- ont été préparés.

La préparation de ces ligands a été réalisée en procédant :

- en premier lieu, à la synthèse, sur un support solide, d'un peptide présentant la séquence (S2) suivante :



20

dans laquelle :

- les 17 résidus acide aminé situés à l'extrémité C-terminale correspondent à la séquence du peptide Ova 323-339,
- le groupe formé par les 3 résidus Arg-Gly-Arg situés en amont de la séquence dudit peptide Ova 323-339 représente un groupe sensible aux endopeptidases,
- le groupe formé par les 3 résidus Lys-Lys-Lys correspond à l'enchaînement des L-lysine, tandis que
- le résidu S-(*tert*-butylthio)-L-cystéine acétylée situé à l'extrémité N-terminale est destiné à permettre un couplage ultérieur du ligand, par exemple pour l'obtention d'un dimère ;
- puis, au couplage des résidus L-lysine de ce peptide et des acides (-)-shikimique et (-)-quinique (sous la forme de son dérivé tétra-*O*-acétylé), par formation d'une liaison amide entre les groupes ε-amine desdits résidus L-lysine et les groupes

30

carboxyles desdits acides.

Ces ligands seront dénommés respectivement ligand 25 et ligand 28 dans ce qui suit.

- Le peptide de séquence (S2) a été synthétisé à une échelle de
- 5 0,25 mmole à partir de 337 mg d'une résine MBHA Rink amide chargée à 0,74 mmoles/g (Société SENN CHEMICALS), et en utilisant :
- une stratégie Fmoc/*tert*-butyle pour la protection des acides aminés à coupler,
 - un groupe 2,2,2,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulfonyl comme groupement protecteur des chaînes latérales des L-arginines,
 - 10 - un groupe *tert*-butyle comme groupement protecteur des chaînes latérales des L-sérine et acides L-glutamique,
 - un groupe trityle comme groupement protecteur des chaînes latérales de la L-asparagine, de la L-glutamine et des L-histidines,
 - un groupe 4-méthyltrityle comme groupement protecteur des chaînes latérales des
 - 15 L-lysines,
 - un mélange HBTU/HOBt/DIEA dans du DMF, en tant que réactifs d'activation pour le couplage des acides aminés,
 - un mélange pipéridine/DMF pour éliminer les groupements protecteurs Fmoc, et
 - des tests à la ninhydrine et au TNBS pour le contrôle des opérations de couplage et
 - 20 de déprotection.

Les couplages des 20 premiers acides aminés ont été réalisés de façon automatisée au moyen d'un synthétiseur APPLIED BIOSYSTEMS ABI431, tandis que les couplages des L-lysines et de la S-(*tert*-butylthio)-L-cystéine ont été effectués manuellement.

- 25 Dans tous les cas, ces couplages ont été réalisés en utilisant 4 équivalents (par fonction amine devant réagir) d'acide aminé, en présence du mélange HBTU/HOBt/DIEA (4:4:12 éq. par fonction amine devant réagir) dans du DMF, et en activant les acides aminés pendant 1 minute avant de les ajouter à la résine. En pratique, le HBTU (4 éq.) a été dissout dans du DMF, puis ajouté à une
- 30 solution contenant l'acide aminé à coupler, l'HOBt (4 éq.) et la DIEA (8 éq.) dans du DMF. L'ensemble a été mélangé pendant 1 minute, puis ajouté à la résine préalablement imbibée par du DMF. Le mélange réactionnel résultant a été agité

mécaniquement pendant toute la durée de la réaction, c'est-à-dire pendant 40 minutes pour les couplages automatisés et 45 minutes pour les couplages manuels.

Les couplages des L-lysines et de la S-(*tert*-butylthio)-L-cystéine ont tous été suivis d'un traitement de la résine par un mélange Ac₂O/DIEA/DCM (5:10:85) d'une durée de 10 minutes destiné à acétyler les groupes amines qui n'auraient pas été couplés.

Par ailleurs, entre chaque opération de couplage, la résine a été successivement filtrée, lavée avec du DMF (3 x 2 minutes) et du DCM (3 x 2 minutes), traitée par un mélange pipéridine/DMF (20:80) pour obtenir le clivage des groupements Fmoc, et lavée à nouveau avec du DMF (2 x 2 minutes) et du DCM (3 x 1 minute).

A l'issue du couplage de la S-(*tert*-butylthio)-L-cystéine et de son acétylation, les groupes protecteurs 4-méthyltrityles des résidus L-lysine ont été hydrolysés en lavant la résine avec un mélange TFA/DCM (1:99) en flux continu jusqu'à disparition de sa coloration jaune.

Les couplages du peptide de séquence (S2) avec les acides (-)-shikimique et (-)-quinique ont été réalisés en faisant réagir, à température ambiante et pendant 45 minutes, des fractions de la résine ainsi lavée avec 4 équivalents d'acide (-)-shikimique ou 4 équivalents d'acide tétra-*O*-acétyl(-)-quinique préalablement activés par 4 équivalents de HBTU et 4 équivalents de HOBt, en présence de 12 équivalents de DIEA dans du DMF, et en contrôlant les réactions par des tests à la nynyhydrine et au TNBS.

Le clivage des produits résultants et leur déprotection ont été réalisés en traitant la résine par 10 ml d'un mélange TFA/H₂O/Pr₃SiH (95:2,5:2,5) par gramme de résine, à température ambiante et pendant 90 minutes. A la suite de quoi, ils ont été successivement précipités dans du diéthyléther froid, centrifugés, dissout dans de l'eau, lyophilisés et purifiés par une RP-HPLC semi-préparative [gradient (A/B) : 100:0 à 50:50 en 120 minutes].

Ont été ainsi obtenus :

- 48 mg de ligand **25** (Rdt : 29%) en utilisant un gradient (A/B) : 100:0 à 50:50 en 100 minutes ; et
- 25 mg d'un composé **26** (Rdt : 15%) en utilisant un gradient (A/B) : 100:0 à 60:40

en 100 minutes.

Ce composé 26 a été soumis à une désacylation pour obtenir le ligand 28. Pour ce faire, à 23 mg du composé 28 en solution dans 10 ml de méthanol distillé sur magnésium, ont été ajoutés 300 µl d'une solution 1M de méthanolate de sodium dans du méthanol. Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante, sous azote, pendant 45 minutes et la réaction a été stoppée par l'addition de quelques gouttes d'acide acétique. Le brut réactionnel a été concentré sous pression réduite et a été purifié par RP-HPLC en utilisant un gradient (A/B) : 100 :0 à 80 :20 en 30 minutes, puis 80 :20 à 70 :30 en 25 minutes, puis isocratique pendant 10 minutes pour conduire à 15 mg de ligand 28 (Rdt : 75%).

Les spectres ESI-MS des ligands 25 et 28 sont les suivants :

- ligand 25 : mesuré : 3228.0, calculé : 3228.7, m/z 1076.9 (M+3H)³⁺, 808.0 (M+4H)⁴⁺, 646.7 (M+5H)⁵⁺
- ligand 28 : mesuré : 3283, calculé : 3282.7, m/z 1641.9 (M+2H)²⁺, 1094.9 (M+3H)³⁺, 821.4 (M+4H)⁴⁺, 657.4 (M+5H)⁵⁺.

EXEMPLE 4 : PREPARATION DE LIGANDS CONFORMES A L'INVENTION

Deux ligands répondant à la formule générale (III) conforme à l'invention (Figure 5), dans laquelle :

- m est un nombre entier égal à 2,
- n est un nombre entier égal à 1,
- y est un nombre entier égal à 1,
- B¹ représente un reste acide (-)-quinique (ligand 33F) ou (-)-shikimique (ligand 34F),
- A représente le reste d'un dipeptide comprenant 1 résidu L-lysine et 1 résidu β-alanine (N^α-(chloroacétyl)-L-lysyl-β-alanine-amide, dont la structure chimique est représentée sur la Figure 5),
- X représente un tripeptide de formule (S1), telle que définie dans l'exemple 1,
- Y représente le reste d'une molécule de fluorescéine,
- M, N et P représentent respectivement un groupe amide (-CO-NH-), thioéther (-CH₂-S-CH₂-CO-) et thiourée (-NH-CS-NH-),

ont été préparés.

a) Préparation du dipeptide N^α-(chloroacétyl)-L-lysyl-β-alanine-amide.

Ce dipeptide est synthétisé manuellement à l'aide d'une résine Rink amide-AM-PS (0.70 mmol/g, Senn Chemicals) en utilisant une stratégie Fmoc/*tert*-butyle, à une échelle de 0.7 mmole. Le couplage est suivi par un test au TNBS : du HBTU dissous dans du NMP (4 équ.), est ajouté à un mélange de l'acide aminé (4 équ.), d'HOBt (4 équ.) et de DIEA (8 équ.) dans le NMP. Après 1 minute d'agitation, le mélange réactionnel est ajouté à la peptidyl-résine (1 équ.) préalablement imbibée de NMP comprenant du DIEA (4 équ.), et agité pendant 40 minutes. La peptidyl-résine (c'est-à-dire la séquence peptidique sur support solide) est filtrée, lavée par du NMP (3 x 2 minutes) et du CH₂Cl₂ (3 x 2 minutes). Les groupements protecteurs Fmoc sont supprimés par un traitement avec de la pipéridine à 20% dans le NMP (1 x 2 minutes, 1 x 20 minutes), suivi d'un lavage avec du NMP (2 x 2 minutes) et du CH₂Cl₂ (2 x 1 minutes). Après la seconde étape de couplage, la peptidyl-résine est déprotégée et acylée en utilisant un excès (4 équ.) d'anhydride chloroacétique, préparé *via* une activation DIC. Enfin, le dipeptide est séparé du support et déprotégé sous l'action d'un mélange TFA-TIS-H₂O 90:5:5 (11 ml par gramme de peptidyl-résine), pendant 1,5 h à température ambiante, précipité dans un mélange diéthyléther-heptane (1:1) froid, centrifugé, dissous dans l'eau et lyophilisé. Le dipeptide (184 mg, 65%) est obtenu sous la forme d'une poudre blanche après purification par RP-HPLC (avec le gradient suivant : 100:0 à 90:10 (A/B) en 20 minutes), suivie d'une lyophilisation. Son analyse est la suivante : TOF-PDMS *m/z* 292.6 (M+H)⁺; RMN ¹H (D₂O-H₂O 10:90): δ 8.37 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, lysyl ^αNH), 8.07 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, β-alanyl NH), 7.40 (s large, 1H, NH₂), 4.11 (dt, *J* = 6.8 et 6.8 Hz, 1H, lysyl α-H), 4.01 (s, 2H, CH₂), 3.31 (dt, *J* = 5.7 et 6.6 Hz, 2H, β-alanyl β-H), 2.84-2.81 (m, 2H, lysyl ε-H), 2.33 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, β-alanyl α-H), 1.72-1.53 (m, 4H, lysyl β- et δ-H), 1.42-1.22 (m, 2H, lysyl γ-H); RMN ¹³C (D₂O-H₂O 10:90): δ 175.7, 172.4, et 168.6 (3 CON), 53.2 (lysyl α-C), 41.0 (CH₂), 38.4 (lysyl ε-C), 34.8 et 33.5 (β-alanyl α-C et β-C), 29.4 (lysyl β-C), 25.3 (lysyl δ-C), 21.0 (lysyl γ-C).

b) Obtention des ligands répondant à la formule générale (III) conforme à l'invention.

Le couplage du dipeptide préparé en a) avec, d'une part, les tripeptides porteurs des restes (-)-shikimique (composé 1) et (-)-quinique (composé 3), dont la synthèse est décrite dans l'exemple 1, et d'autre part, avec une molécule de fluorescéine, est effectué conformément au protocole décrit dans l'exemple 2. On obtient ainsi les ligands **33F** et **34F**.

5,04 mg (80% de rendement) de ligand **33F** ont été obtenus sous la forme d'une poudre blanche, après purification par RP-HPLC (gradient : 100:0 à 85:15 (A/C) en 15 minutes, puis 85:15 à 75:25 (A/C) en 30 minutes, puis gradient isocratique), suivie d'une lyophilisation. Analyse du ligand **33F** : ESI-MS positive m/z 1300.3 (M+H)⁺, 650.8 (M+2H)²⁺; RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 10.2 (s large, 1H, NH-fluor), 8.40-8.32 (m, 3H, H-fluor, lysyl ^αNH et lysyl ^εNH), 8.31 (t, J = 5.1 Hz, 1H, glycyl NH), 8.24 (d, J = 7.8 Hz, lysyl ^αNH), 8.10 (t, J = 5.2 Hz, 1H, β-alanyl NH), 7.82-7.80 (m, 2H, cysteinyl NH et lysyl ^εNH), 7.80 (d, J = 8.3 Hz, H-fluor), 7.41 (s large, 1H, NHH), 7.22 (d, J = 8.3 Hz, H-fluor), 6.90 (s large, 1H, NHH), 6.74-6.60 (m, 6H, 6 H-fluor).

2,42 mg (80% de rendement) de ligand **34F** ont été obtenus sous la forme d'une poudre blanche, après purification par RP-HPLC (gradient : 100:0 à 85:15 (A/C) en 15 minutes, puis 85:15 à 70:30 (A/C) en 50 minutes), suivie d'une lyophilisation. Analyse du ligand **34F** : ESI-MS positive m/z 1264.4 (M+H)⁺, 632.8 (M+2H)²⁺; RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 10.07 (s, 1H, OH), 9.81 (s large, 1H, NH-fluor), 8.22 (t, J = 5.7 Hz, 1H, glycyl NH), 8.20 (s large, 1H, H-fluor), 8.11 (d, J = 8.0 Hz, 2H, 2 lysyl ^αNH), 8.01 (t, J = 5.6 Hz, 1H, lysyl ^εNH), 7.99 (t, J = 5.8 Hz, β-alanyl NH), 7.77 (t, J = 5.6 Hz, 1H, lysyl ^εNH), 7.75 (d, J = 7.6 Hz, 1H, cysteinyl NH), 7.69 (d large, J = 8.3 Hz, H-fluor), 7.28 (s large, 1H, NHH), 7.12 (d, J = 8.3 Hz, H-fluor), 6.80 (s large, 1H, NHH), 6.74-6.60 (m, 6H, 6 H-fluor), 6.31 et 6.22 (2 s larges, 2 shikimoyl H-2).

EXEMPLE 5 : PREPARATION DE LIGANDS CONFORMES A L'INVENTION

Quatre ligands répondant à la formule générale (III) conforme à l'invention, dans laquelle :

- 5 • m est un nombre entier égal à 8,
 - n est un nombre entier égal à 4,
 - y est un nombre entier égal à 1,
 - B¹ représente un reste acide (-)-shikimique ou (-)-quinique,
 - Y représente le reste d'une molécule de fluorescéine,
 - 10 • A représente le reste d'un dendrimère A' comprenant 4 résidus L-lysine et présentant 4 groupes chloroacétyles pour sa liaison avec 4 tripeptides, et un groupe amine libre propre à permettre sa liaison avec Y,
 - X représente le reste d'un tripeptide de séquence (S2) ou (S3), telles qu'elles seront définies ci-dessous,
 - 15 • M, N et P représentent respectivement un groupe amide (-CO-NH-), thioéther (-CH₂-S-CH₂-CO-) et thiourée (-NH-CS-NH-),
- ont été préparés selon le protocole suivant.

- a) Préparation du composé Q, dérivé de l'acide quinique dans lequel les hydroxyles situés aux positions 3 et 4 sont protégés sous forme d'un diacétal
- 20 (Figure 6).

Le composé Q, à savoir l'acide (1s_n, 3R, 4s_n, 5R, 2'S, 3'S)-3,4-0-(2',3'-diméthoxybutane-2',3'-diyl)-1,3,4,5-tétrahydroxycyclohexane-1-carboxylique, est obtenu à partir 980 mg (3.06 mmol) de l'ester méthylique de l'acide 3,4-0-(2',3'-diméthoxybutane-2',3'-diyl)-1,3,4,5-tétrahydroxycyclohexane-1-carboxylique (décrit

25 par J.L. MONTCHAMP *et al.* dans *J. Org. Chem.*, 1996, 61, 3897-3899) dissous dans 12 ml d'une solution MeOH-aq/NaOH 0.1 M (1:1). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h et concentré sous pression réduite. Le résidu est séparé à l'aide d'EtOAc et d'acide citrique aqueux (0,1 M). La phase aqueuse est extraite deux fois avec EtOAc. Les phases organiques sont réunies, séchées sur

30 Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite. On obtient 780 mg (rendement de 80%) du composé Q après cristallisation dans Et₂O-heptane. RMN ¹H : δ (DMSO-d₆) 4.05 (1 H, ddd, J 4.6, 10.1 et 12.6 Hz, H-5), 3.89 (1 H, s large, H-3), 3.31 (1 H, dd,

J 2.8 et 10.1 Hz, H-4), 3.15 (2 x 3 H, s, 2 OCH₃), 1.89 (1 H, dd, J 4.6 et 12.6 Hz, H-6), 1.74-1.64 (3 H, m, 2 H-2 et H-6'), 1.23 et 1.14 (2 x 3 H, 2 s, 2 CH₃); RMN ¹³C : δ (DMSO-*d*₆) 177.0 (COO), 76.0 (C-1), 73.9 (C-4), 69.0 (C-3), 63.8 (C-5), 48.1 et 48.0 (2 OCH₃), 39.1 et 39.5 (C-2 et C-6), 18.6 (2 CH₃).

5 b) Préparation des tripeptides de séquences (S2) et (S3).

Ces tripeptides présentent les séquences suivantes :

Lys-Cys(tert-butylthio)-Gly-OH (S2)

Lys-Cys(tert-butylthio)-Arg-NH₂ (S3)

Les tripeptides (S2) et (S3) sont respectivement neutres et chargés
10 positivement en milieu physiologique, par opposition au peptide (S1) décrit dans l'exemple 1, qui est chargé négativement en milieu physiologique.

Ils sont obtenus selon le même protocole que celui décrit dans l'exemple 1 pour la synthèse du peptide (S1), si ce n'est que les synthèses ont été réalisées à partir d'une résine Rink amide-AM-PS (0.70 mmol/g, Senn Chemicals), à
15 une échelle de 0.2 mmole. Le groupement protecteur du Fmoc-L-Arg-OH est un groupe 2,2,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulfonyle.

c) Couplage de l'acide shikimique et du dérivé de l'acide quinique (composé Q) sur les peptides (S2) et (S3).

0,2 mmole de chaque peptidyl-résine (c'est-à-dire la séquence
20 peptidique sur support solide), à savoir 0,2 mmole de séquence (S2), d'une part, et 0,2 mmole de séquence (S3), d'autre part, sont mis en présence de 123 mg (0.4 mmol, 2 équ.) du composé Q, en présence de BOP (177 mg, 0,4 mmol, 2 équ.) et de DIEA (140 µl, 0,8 mmol, 4 équ.) dans le DMF pendant 1 h et à température ambiante. La peptidyl-résine est ensuite lavée par du DMF (2 x 2 minutes) et du CH₂Cl₂ (3 x 1
25 minute). Le couplage est effectué une seconde fois.

Par ailleurs, 0,2 mmole de chaque peptidyl-résine sont mis en présence de 61 mg (0,44 mmol, 2,2 équ.) d'acide shikimique, en utilisant un activation par HBTU-HOBt-DIEA [(166 mg, 0,44 mmol, 2,2 équ.), (67 mg, 0,44 mmol, 2,2 équ.), (146 ml, 0,84 mmol, 4,2 équ.)] dans le NMP, pendant 40 minutes à température
30 ambiante. La peptidyl-résine est ensuite lavée par du DMF (2 x 2 minutes) et du CH₂Cl₂ (3 x 1 minute). Le couplage est effectué une seconde fois.

Les peptidyl-résines sont ensuite lavées par Et₂O. Les peptides sont

séparés du support solide au moyen d'un traitement par un mélange TFA-H₂O-iPr₃SiH 95:2.5:2.5 (10 ml par gramme de peptidyl-résine), pendant 1 h à température ambiante, précipités dans un mélange diéthyléther-heptane froid, centrifugés, dissous dans l'eau, puis lyophilisés. On obtient les peptides (S2)q, (S2)s, (S3)q et (S3)s, qui
 5 correspondent respectivement aux tripeptides (S2) et (S3) portant deux restes d'acide quinique (peptides (S2)q et (S3)q) ou deux restes d'acide shikimique (peptides (S2)s et (S3)s), comme représentés sur les Figures 6 et 7.

• *Peptide (S2)q*

Il s'agit du N^α,N^ε-di-[(1s_n,3R,4s_n,5R)-1,3,4,5-tétrahydroxycyclohexane-1-carbox-1-yl]-L-lysyl-[S-(*tert*-butylthio)]-L-cysteinyl-glycine-amide. On
 10 obtient 35.6 mg (rendement de 24%) de ce produit sous la forme d'une poudre blanche, après purification par RP-HPLC [gradient: 100:0 à 72:28 (A/B) pendant 20 minutes, puis 72:28 à 62:38 (A/B) pendant 30 minutes] suivie d'une lyophilisation.
 RMN ¹H : δ (D₂O-H₂O 5:95) 8.50 (1 H, d, J 6.9 Hz, Cysteinyl NH), 8.35 (1 H, t, J 5.9
 15 Hz, Glycyl NH), 8.16 (1 H, d, J 6.9 Hz, Lysyl ^αNH), 8.12 (1 H, d, J 6.1 Hz, Lysyl ^εNH), 7.30 et 7.00 (2 x 1 H, 2 s large, NH₂), 4.52 (1 H, m, Cysteinyl αH), 4.16 (1 H, dt, J 6.9 et 5.9 Hz, Lysyl αH), 4.09-4.08 (2 H, m, 2 H-3), 3.97-3.90 (2 H, m 2 H-5), 3.85 (1 H, dd, J 5.9 et 10.4 Hz, Glycyl αH), 3.72 (1 H, dd, J 5.9 et 10.4 Hz, Glycyl αH), 3.43-3.38 (2 H, m, H-4), 3.14-3.09 (2 H, m, Lysyl εH and Cysteinyl βH), 2.94 (1
 20 H, dd, J 8.5 et 14.0, Cysteinyl βH), 2.05-1.65 (6 H, m, 2 H-2, 2 H-6 et Lysyl βH), 1.45-1.38 (1 H, m, Lysyl δH), 1.23-1.19 (2 H, m, Lysyl γH), 1.20 (3 x 3 H, s, 3 CH₃);
 RMN ¹³C: δ (D₂O-H₂O 5:95) 177.5, 177.2, 174.7, 174.3 et 172.8 (5 CON), 77.1 (2 C-1), 75.5 et 75.4 (2 C-4), 70.8 (2 C-3), 66.8 et 66.7 (2 C-5), 54.4 (Lysyl αC), 53.5 (Cysteinyl αC), 48.6 [C(CH₃)₃], 42.8 (Glycyl αC), 40.7 (2 C-6), 40.3 (Cysteinyl βC),
 25 39.4 4 (Lysyl εC), 37.5 (2 C-2), 30.8 (Lysyl βC), 29.4 [C(CH₃)₃], 28.3 (Lysyl δC), 22.7 (Lysyl γC); *m/z* (TOF-PDMS) 765 (M+Na)⁺.

• *Peptide (S2)s*

Il s'agit du N^α,N^ε-di-[(3R,4S,5R)-3,4,5-trihydroxy-1-cyclohexene-carbox-1-yl]-L-lysyl-[S-(*tert*-butylthio)]-L-cysteinyl-glycine-amide. On obtient 56 mg
 30 (rendement de 40%) de ce produit sous la forme d'une poudre blanche, après purification par RP-HPLC [gradient: 100:0 à 90:10 (A/B) pendant 10 minutes, puis

90:10 à 85:15 (A/B) pendant 15 minutes, puis gradient isocratique (A/B)] suivie d'une lyophilisation. RMN ^1H : δ (D_2O - H_2O 5:95) 8.46 (1 H, d, J 7.1 Hz, Cysteinyl NH), 8.27 (1 H, t, J 5.8 Hz, Glycyl NH), 8.08 (1 H, d, J 6.2 Hz, Lysyl $^{\alpha}\text{NH}$), 7.87 (1 H, t, J 5.5 Hz, Lysyl $^{\epsilon}\text{NH}$), 7.26 et 7.0 (2 x 1 H, s large, NH_2), 6.28 et 6.22 (2 x 1 H, 2 d larges, J 3.7 Hz, 2 H-2), 4.50 (1 H, m, Cysteinyl αH), 4.26 (2 H, m, 2 H-3), 4.17 (1 H, dt, J 6.2 et 6.4, Lysyl αH), 3.89-3.83 (2 H, m, 2 H-5), 3.80 et 3.76 (2 x 1 H, 2 dd, J 5.8 et 15.4 Hz, 2 Glycyl αH), 3.71-3.54 (2 H, m, 2 H-4), 3.12-3.06 (2 H, m, Lysyl ϵH et Cysteinyl βH), 2.90 (1 H, dd, J 8.9 et 14.0 Hz, Cysteinyl βH), 2.62-2.53 (2 H, m, 2 H-6), 2.05 (2 H, dd, J 6.9 et 18.7 Hz, 2 H-6'), 1.76-1.56 (2 H, m, 2 Lysyl βH), 1.43-1.37 (2 H, m, 2 Lysyl δH), 1.27-1.15 (2 H, m, 2 Lysyl γH), 1.15 (3 x 3 H, s, 3 CH_3); RMN ^{13}C : δ (D_2O - H_2O 5:95) 175.0, 174.4, 172.9, 171.0 et 170.5 (5 CON), 133.7 et 133.0 (2 C-2), 132.2 et 131.0 (2 C-1), 72.0 et 71.9 (2 C-3), 66.8 et 66.3 (2 C-4 et 2 C-5), 55.0 (Lysyl αC), 53.7 (Cysteinyl αC), 48.7 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 42.7 (Glycyl αC), 40.2 (Cysteinyl βC), 39.8 (Lysyl ϵC), 31.7 et 31.5 (2 C-6), 30.6 (Lysyl βC), 29.4 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 28.3 (Lysyl δC), 22.9 (Lysyl γC); m/z (TOF-PDMS) 729 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

• *Peptide (S3)q*

Il s'agit du N^{α},N^{ϵ} -di-[(1*s_n*,3*R*,4*s_n*,5*R*)-1,3,4,5-tétrahydroxycyclohexane-1-carbox-1-yl]-L-lysyl-[*S*-(*tert*-butylthio)]-L-cysteinyl-L-arginine-amide. On obtient 45 mg (rendement de 24%) de ce produit sous la forme d'une poudre blanche, après purification par RP-HPLC [gradient: 100:0 à 85:15 (A/B) pendant 15 minutes, puis 85:15 à 75:25 (A/B) pendant 30 minutes] suivie d'une lyophilisation. RMN ^1H : δ (D_2O - H_2O 5:95) 8.39 (1 H, d, J 7.0 Hz, Cysteinyl NH), 8.27 (1 H, d, J 7.5 Hz, Lysyl $^{\alpha}\text{NH}$), 8.14 (1 H, d, J 6.9 Hz, Arginyl $^{\alpha}\text{NH}$), 8.12 (1 H, t, J 6.1 Hz, Lysyl $^{\epsilon}\text{NH}$), 7.42 et 7.0 (2 H, 2 s, NH_2), 7.1 (1 H, t, J 5.3 Hz, Arginyl $^{\delta}\text{NH}$), 6.55 (s large, guanidinium), 4.50 (1 H, m, Cysteinyl αH), 4.30-4.10 (2 H, m, Arginyl αH et Lysyl αH), 4.09 (2 H, s large, 2 H-3), 3.98-3.89 (2 H, m, 2 H-5), 3.43-3.37 (2 H, m, 2 H-4), 3.10-3.05 (5 H, m, 2 Arginyl δH , 2 Lysyl ϵH et Cysteinyl βH), 2.97 (1 H, dd, J 8.9 et 14.0 Hz, Cysteinyl βH), 1.95-1.54 (8 H, m, 2 Arginyl βH , 2 Lysyl βH , 2 H-2 et 2 H-6), 1.55-1.48 (2 H, m, 2 Arginyl γH), 1.49-1.32 (2 H, m, 2 Lysyl δH), 1.27-1.15 (2 H, m, 2 Lysyl γH), 1.20 (3 x 3 H, s, 3 CH_3); RMN ^{13}C : δ (D_2O - H_2O 5:95) 177.5, 177.2,

176.2, 174.5 et 172.1 (5 CON), 157.3 [NH(C=NH)NH₂], 77.2 (2 C-1), 75.5 (2 C-3), 70.9 et 70.8 (2 C-5), 66.8 et 66.7 (2 C-4), 55.6 (Cysteinyl αH), 53.6 (Lysyl αH et Arginyl αH), 48.8 [C(CH₃)₃], 41.0 et 40.5 (Cysteinyl βH et Arginyl δH), 40.7 (2 C-6), 39.4 (Lysyl εH), 37.5 (2 C-2), 30.9 (Lysyl βH), 29.4 [C(CH₃)₃], 28.6 et 28.4 (Lysyl δH et Arginyl βH), 24.9 (Arginyl γH), 22.7 (Lysyl γH); *m/z* (TOF-PDMS) 842 (M+H)⁺.

• *Peptide (S3)s*

Il s'agit du *N*^α,*N*^ε-di-[(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4,5-trihydroxy-1-cyclohexene-carbox-1-yl]-L-lysyl-[*S*-(*tert*-butylthio)]-L-cysteinyl-L-arginine-amide. On obtient 48 mg (rendement de 26%) de ce produit sous la forme d'une poudre blanche, après purification par RP-HPLC [gradient: 100:0 à 90:10 (A/B) pendant 10 minutes, puis 90:10 à 85:15 (A/B) pendant 12 minutes, puis gradient isocratique] suivie d'une lyophilisation. RMN ¹H : δ (D₂O-H₂O 5:95) 8.40 (1 H, d, *J* 6.8 Hz, Cysteinyl NH), 8.14 (1 H, d, *J* 7.8 Hz, Lysyl αNH), 8.11 (1 H, d, *J* 7.7 Hz, Arginyl αNH), 7.92 (1 H, t, *J* 5.7 Hz, Lysyl εNH), 7.39 et 7.05 (2 x 1 H, 2 s large, NH₂), 7.07 (1 H, t, *J* 5.4 Hz, Arginyl δNH), 8.40 (1 H, d, *J* 6.8 Hz, Cysteinyl NH), 6.55 (s large, guanidinium), 6.36 et 6.27 (2 x 1 H, 2 d large, *J* 3.9 Hz, 2 H-2), 4.52 (1 H, m, Cysteinyl αH), 4.33-4.28 (2 H, m, 2 H-3), 4.21-4.16 (2 H, m, Lysyl αH and Arginyl αH), 3.92-3.88 (2 H, m, 2 H-5), 3.64-3.60 (2 H, m, 2 H-4), 3.15-2.96 (6 H, m, 2 Cysteinyl βH, 2 Lysyl εH, 2 Arginyl δH), 2.65-2.53 (2 H, m, 2 H-6), 2.10 (2 H, d large, *J* 6.6 Hz, 2 H-6'), 1.78-1.65 (4 H, m, 2 Lysyl βH et 2 Arginyl βH), 1.54-1.40 (2 H, m, 2 Lysyl δH et 2 Arginyl γH), 1.31 (3 x 3 H, s, 3 CH₃); RMN ¹³C : δ (D₂O-H₂O 5:95) 176.3, 174.9, 172.3, 171.0 et 170.5 (5 CON), 157.2 [NH(C=NH)NH₂], 133.6 et 133.0 (2 C-2), 132.4 et 131.1 (2 C-1), 72.0 (2 C-3), 66.8 et 66.2 (2 C-4 and 2 C-5), 55.2 et 54.0 (Lysyl αC et Arginyl αC), 53.6 (Cysteinyl αC), 48.9 [C(CH₃)₃], 41.0 (Cysteinyl βC), 40.1 (Arginyl δC), 39.7 (Lysyl εC), 31.6 (2 C-6), 30.6 (Lysyl βC), 29.4 [C(CH₃)₃], 28.5 et 28.3 (Arginyl βC et Lysyl δC), 24.9 (Arginyl γC), 22.9 (Lysyl γC); *m/z* (TOF-PDMS) 805 (M+Na)⁺.

d) Préparation du ligand 41F (Figure 6).

6 éq. du peptide (S2)q sont mis en solution dans un mélange dégazé

de nPrOH-H₂O 50:50 (1 ml). On y introduit 6 éq. de nBu₃P. Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 h, sous azote. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est encore séché sous vide pendant 15 minutes. On ajoute 500 µl du mélange dégazé DMF-aq NaOAc 0.1 M (90:10), puis 0,9 µmol (1 éq.) du dendrimère de L-lysine 14, dont la préparation est décrite dans l'exemple 1. Le milieu réactionnel est agité pendant 24 h à température ambiante, l'avancement de la réaction étant suivi par RP-HPLC. De l'isothiocyanate de fluorescéine (4 éq.) est ajouté et le milieu est agité sous azote et à l'abri de la lumière pendant une nuit. Le milieu est dilué dans de l'eau, lyophilisé et purifié par RP-HPLC [gradient: 100:0 à 85:15 (A/B) pendant 15 minutes, puis 85:15 à 80:20 (A/B) pendant 15 minutes, puis gradient isocratique] pour donner 2,38 mg (rendement de 72%) du ligand 41F sous la forme d'une poudre blanche. Son analyse est la suivante : ESI-MS trouvé 3763.0, calculé 3765.1 ; m/z 1883.0 (M+2H)²⁺, 1255.5 (M+3H)³⁺.

e) Préparation des ligands 42F (Figure 6), 43F et 44F (Figure 7).

6 éq. du peptide (S2)s (ou du peptide (S3)s, ou encore du peptide (S3)q) sont mis en solution dans un mélange dégazé de nPrOH-H₂O 50:50 (1 ml). On y introduit 6 éq. de nBu₃P. Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 h, sous azote. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est encore séché sous vide pendant 15 minutes, puis dissous dans 50 µl d'eau. 1 éq. (0,5-1 µmol) du dendrimère de L-lysine 14, dont la préparation est décrite dans l'exemple 1, dans 300 µl de DMF comprenant 4 éq. de DIEA est ajouté à 1 éq. d'isothiocyanate de fluorescéine. Le mélange est agité sous azote et à l'abri de la lumière pendant 2 h. Une fois la réaction achevée (d'après son suivi par RP-HPLC), le mélange est ajouté au milieu réactionnel contenant les composés peptidiques. Le pH du mélange est ajusté à 8-8,5 par ajout de K₂CO₃ solide. Le mélange est agité sous azote et à l'abri de la lumière pendant 24 h, à température ambiante, dilué dans de l'eau, lyophilisé et purifié par RP-HPLC pour donner les ligands 42F, 43F ou 44F.

On obtient 1,3 mg (rendement de 36%) du ligand 42F sous la forme d'une poudre blanche, après purification par RP-HPLC HPLC [gradient: 100:0 à 82:18 (A/B) pendant 18 minutes, puis 82:18 à 72:28 (A/B) pendant 30 minutes], suivie d'une lyophilisation. Son analyse est la suivante : ESI-MS trouvé 3620.0, calculé 3621.0 ; m/z 1207.7 (M+3H)³⁺, 1001.8 (M+3H-C₂₅H₃₈N₅O₁₁)³⁺, 905.9

$(M+4H)^{4+}$.

On obtient 1,3 mg (rendement de 36%) du ligand **43F** sous la forme d'une poudre blanche, après purification par RP-HPLC HPLC [gradient: 100:0 à 82:18 (A/B) pendant 18 minutes, puis 82:18 à 72:28 (A/B) pendant 30 minutes],
 5 suivie d'une lyophilisation. Son analyse est la suivante : ESI-MS trouvé 4160.0, calculé 4161.7 ; m/z 1387.6 $(M+3H)^{3+}$, 1041.0 $(M+4H)^{4+}$, 833.0 $(M+5H)^{5+}$.

On obtient 1,3 mg (rendement de 36%) du ligand **44F** sous la forme d'une poudre blanche, après purification par RP-HPLC HPLC [gradient: 100:0 à 82:18 (A/B) pendant 18 minutes, puis 82:18 à 75:25 (A/B) pendant 21 minutes, puis
 10 gradient isocratique], suivie d'une lyophilisation. Son analyse est la suivante : ESI-MS trouvé 4016, calculé 4017.6 ; m/z 1339.9 $(M+3H)^{3+}$, 1005.2 $(M+4H)^{4+}$, 804.4 $(M+5H)^{5+}$.

15 **EXEMPLE 6 : PREPARATION DE LIGANDS CONFORMES A L'INVENTION**

Deux ligands répondant à la formule générale (III) conforme à l'invention, dans laquelle :

- m est un nombre entier égal à 4 ou à 8,
- n est un nombre entier égal à 0 (et donc X est absent),
- 20 • y est un nombre entier égal à 1,
- B¹ représente un reste acide (-)-quinique,
- Y représente le reste d'un antigène,
- A représente le reste d'un dendrimère A' comprenant 8 (dans le cas du ligand **51** représenté sur la Figure 10) ou 4 (dans le cas du ligand **52** représenté sur la
 25 Figure 11) résidus L-lysine,
- M et P représentent respectivement des groupes thioéther (-CH₂-S-CH₂-CO-) et hydrazone (-CO-CH=N-NH-CH₂-CO-),

ont été préparés selon le protocole suivant.

Ces ligands sont obtenus par ligation de dérivés de l'acide quinique,
 30 à savoir l'acide quinique fonctionnalisé par une fonction thiol (composé **G**), à un dendrimère de lysine (dendrimère **H** ou **I**) et à un antigène peptidique (antigène **J** ou **K**), selon le protocole décrit ci-après.

a) Préparation du dérivé de l'acide quinique (composé G, Figure 8).

Le composé G représente le disulfure de 2-{*N,N*-di-[(1*S*_n,3*R*,4*S*_n,5*R*)-1,3,4,5-tétrahydroxycyclohexane-1-carboxamido-1-yl]}éthyl. Il est obtenu en mélangeant, pendant une nuit et à 50°C, 52 mg (0,3 mmol) d'acide quinique lactone et
5 34 mg (1 éq.) de chlorhydrate de cystéamine, dans de l'eau dégazée contenant du K₂CO₃ solide (pH 8-9). Le mélange est ensuite agité à température ambiante pendant 24 h, en présence d'air, avant d'être purifié par RP-HPLC [gradient: 100:0 à 80:20 (A/C) pendant 15 minutes, puis isocratique], puis lyophilisé pour donner le composé G (70 mg, 71%) sous la forme d'une poudre blanche. Son analyse est la suivante :
10 RMN ¹H : δ = 8.24 (t, ³J(H,H) = 5.8 Hz, 2 H; 2 NH), 4.05 (ddd, ³J(H,H) = 3, 3 et 6.2 Hz, 2 H; 2 H-3), 3.90 (ddd, ³J(H,H) = 4.7, 9 et 11.6 Hz, 2 H; 2 H-5), 3.40 (t, ³J(H,H) = 6.4 Hz, 4 H; 2 CH₂), 3.38 (dd, ³J(H,H) = 3 et 9 Hz, 2 H; 2 H-4), 2.73 (t, ³J(H,H) = 6.4 Hz, 4 H; 2 CH₂), 1.94-1.83 (m, 6 H; 4 H-2 et 2 H-6), 1.77 (dd, ³J(H,H) = 11.6 et 13.4 Hz, 2 H; 2 H-6'); RMN ¹³C : δ = 177.5 (2 CON), 77.8 (2 C-1), 75.4 (2 C-4), 70.8 (2
15 C-3), 66.7 (2 C-5), 40.7 (2 C-6), 38.5, 37.5 et 37.1 (4 CH₂ et 2 C-2); TOF-PDMS: *m/z* 469 [M+H]⁺.

b) Préparation des dendrimères H (Figure 8) et I (Figure 9).

- *Fonctionnalisation d'une résine amino-PEGA par un bras espaceur.*

20 On ajoute successivement, à une solution d'ester diméthylque de l'acide (+)-2,3-*O*-isopropylidene-D-tartarique (733 µl), 7.2 µl (4 éq.) d'eau et 59.6 µl (4 éq.) de 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undéc-7-ène, à température ambiante. Le milieu réactionnel est agité pendant 1 h, puis ajouté à 0.1 mmol d'une résine amino-PEGA (0.4 mmol/g) imbibée dans une quantité minimale de DMF, la résine ayant, au
25 préalable, été neutralisée par 5% DIEA dans le CH₂Cl₂ (2 x 1 minute) et le DMF (3 x 1 minute). On ajoute ensuite du BOP (177 mg, 4 éq.) dans le DMF (1 ml) et le mélange obtenu est agité à température ambiante pendant 40 minutes. La résine est lavée par du DMF (4 x 2 minutes) et du CH₂Cl₂ (2 x 2 minutes). Elle est imbibée de DMF et acylée par du 1,3-diaminopropane (0.65 ml) à température ambiante pendant
30 1 h. Enfin, la résine est lavée par du DMF (3 x 1 minute) et du CH₂Cl₂ (2 x 2 minutes).

- *Synthèse des dendrimères à base de L-lysine.*

Ces dendrimères sont synthétisés sur la résine amino-PEGA fonctionnalisée comme indiqué ci-dessus (0.2 mmol/g, Senn Chemicals) en utilisant une stratégie Fmoc/*tert*-Butyle, à une échelle de 0,1 mmole. Les étapes de couplage
5 sont réalisées à l'aide d'un excès de 10 (pour les deux premiers couplages) ou de 4 éq. en acides aminés par rapport aux groupements amines réactionnels, l'activation étant effectuée par le mélange HBTU-HOBt-DIEA dans le NMP. Les couplages sont suivis, par exemple, par le test du TNBS, comme décrit dans l'exemple 4.

Le Fmoc- β -Ala-OH est d'abord couplé à la résine. Les résidus
10 lysines sont ensuite introduits : la première lysine introduite est protégée par un groupement Boc, les autres lysines étant ajoutées sous la forme de leurs dérivés Fmoc-L-Lys(Fmoc)-OH. Après les quatrième et cinquième étapes de couplage, les peptides sont déprotégés en phase solide et acylés, dans du DMF, en utilisant un excès (4 éq.) d'anhydride chloroacétique, préparé en utilisant une activation au DCC. La peptidyl-
15 résine est lavée par du DMF (3 x 1 minute), par du CH₂Cl₂ (3 x 2 minutes) et par Et₂O (2 x 1 minute), puis séchée. Les groupements Boc du ϵ -NH₂ du premier résidu lysine et du groupe isopropylidène du bras espaceur fixé sur le support sont éliminés par un traitement avec un mélange TFA-H₂O-anisole 95:2.5:2.5 (10 ml), pendant 2 h à température ambiante. La peptidyl-résine est lavée par du CH₂Cl₂ (5 x 1 minute) et par
20 Et₂O (2 x 1 minute), puis séchée et imbibée d'AcOH aqueux. On y ajoute du NaIO₄ (128.3 mg, 6 éq.) dissous dans un mélange AcOH aqueux (33%)/H₂O 1:1 (2 ml). Le mélange est agité pendant 5 minutes, puis 200 μ l d'éthylène glycol y sont ajoutés. La résine est lavée à l'eau (2 x 6 ml) et les filtrats récupérés sont purifiés par RP-HPLC.

Après purification par RP-HPLC [gradient: 100:0 à 50:50 (A/B)
25 pendant 120 minutes] et lyophilisation, on obtient 28 mg (rendement de 31%) du dendrimère **H** sous la forme d'une poudre blanche. Son analyse est la suivante : m/z (ESI-MS positive) 1038.4 (M+H₂O)⁺, 1020.3 (M+H)⁺.

Après purification par RP-HPLC [gradient: 100:0 à 90:10 (A/B)
pendant 10 minutes, puis 90:10 à 70:30 (A/B) pendant 40 minutes, puis isocratique] et
30 lyophilisation, on obtient 45 mg (rendement de 23,5%) du dendrimère **I** sous la forme d'une poudre blanche. Son analyse est la suivante : m/z (ESI-MS positive) 1855.5 (M+H₂O)⁺, 1838.3 (M+H)⁺, 919.5 (M+2H)²⁺.

c) Préparation des antigènes peptidiques J et K (Figure 8).

Les épitopes (séquences peptidiques dénomées HA³⁰⁷⁻³¹⁹ et TT⁸³⁰⁻⁸⁴⁶ sur la Figure 8) sont synthétisés sur une échelle de 0.25 mmole à l'aide d'une résine Rink amide-Nleu-AM-PS (0.38 mmol/g, Senn Chemicals), sur un synthétiseur
5 automatique de peptides Applied Biosystems A431. Le groupement protecteur des chaînes latérales du Fmoc-L-Lys-OH est le groupe Boc ; le groupement protecteur pour Fmoc-L-Ser-OH, Fmoc-L-Glu-OH, Fmoc-L-Thr-OH, Fmoc-L-Tyr-OH et Fmoc-L-Asp-OH sont le *tert*-butyle ; le groupement protecteur pour Fmoc-L-Asn-OH, Fmoc-L-Gln-OH et Fmoc-L-His-OH est le groupe trityle ; le groupement protecteur pour
10 Fmoc-L-Arg-OH est le groupe 2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyle.

- Préparation de l'antigène J (H₂N-Gly-HA³⁰⁷⁻³¹⁹).

Une fois la synthèse peptidique effectuée, la peptidyl-résine (0,125 mmol) est déprotégée et couplée deux fois manuellement en utilisant un excès de 4 équ. d'anhydride bromoacétique, préparé par une activation au DIC (pendant 20
15 minutes) dans le DMF, suivie d'un lavage au DMF (3 x 1 minute) et au CH₂Cl₂ (3 x 2 minutes). 66 mg (4 équ.) de *tert*-butylcarbazate sont ajoutés à la peptidyl-résine imbibée de DMF contenant du DIEA (174 µl 8 équ.). Le mélange est agité une nuit, puis lavé par du DMF (3 x 1 minute), du CH₂Cl₂ (3 x 2 minutes) et par Et₂O (2 x 1 minutes). Enfin, le peptide est séparé du support et déprotégé au moyen du mélange
20 TFA-anisole-H₂O 95:2.5:2.5 (10 ml), pendant 3 h à température ambiante, précipité dans du diéthyléther froid, centrifugé, dissous dans l'eau et lyophilisé. On obtient 101 mg (rendement de 40%) de l'antigène J sous la forme d'une poudre blanche après purification par RP-HPLC semi-préparative [gradient: 100:0 à 50:50 (A/F) pendant 90 minutes] et lyophilisation. L'analyse de l'antigène J par ESI-MS positive est la
25 suivante : *m/z* 1575 (M+H)⁺.

- Préparation de l'antigène K (H₂N-Gly-TT⁸³⁰⁻⁸⁴⁶).

On procède comme indiqué ci-dessus en rapport avec la préparation de l'antigène J, aux différences près que :

- le peptide est séparé du support et déprotégé au moyen du mélange
30 TFA-iPr₃SiH-H₂O 95:2.5:2.5 (10 ml), pendant 1,5 h,
- le gradient, pour la purification de l'antigène par RP-HPLC, est le suivant : 100:0 à 75:25 (A/F) pendant 25 minutes, puis isocratique (A/F).

Après purification par RP-HPLC et lyophilisation, l'antigène **K** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche, avec un rendement de 15%. Son analyse par ESI-MS positive est la suivante : calculé 2052.5, trouvé 2052.0 ; m/z : 1026.7 $[M+2H]^{2+}$, 684.8 $[M+3H]^{3+}$, 514.0 $[M+4H]^{4+}$.

5 d) Préparation des ligands 51 et 52.

- Ligand 51 (Figure 10).

Le composé **G** (1,5 éq. / groupes chloroacétiques à substituer), dont la préparation est décrite au paragraphe a) ci-dessus, est dissous dans le mélange nPrOH-H₂O 1:1 (500 µl). On ajoute du tri-n-butylphosphine (1 éq.). Après une nuit à
10 température ambiante sous atmosphère d'azote, le mélange est concentré sous pression réduite pendant 20 minutes, repris dans 500 µl d'eau et ajouté à 0,8 µmol (1 éq.) de dendrimère **I** dissous dans 600 µl de DMF. Le pH est ajusté à 8-8,5 par addition de potassium de carbonate solide. Le mélange est agité pendant 24 à 48 h à température ambiante et sous atmosphère d'azote. On ajoute ensuite 350 µl d'un
15 tampon citrate/phosphate et l'antigène peptidique **J**. Le pH est ajusté à 5,2 par addition d'HCl aqueux 1N. Le mélange est agité pendant 12 h à température ambiante, dilué dans de l'eau, congelé et lyophilisé. 1,52 mg du ligand **51** (rendement de 35%) sont obtenus, sous la forme d'une poudre blanche, après purification par RP-HPLC [gradient: 100:0 à 90:10 (A/B) pendant 10 minutes, puis 90:10 à 75:25 (A/B) pendant
20 50 minutes] et lyophilisation. Son analyse par ESI-MS positive est la suivante : calculé 5114.1, trouvé 5112 ; m/z : 1704.9 $[M+3H]^{3+}$, 1278.9 $[M+4H]^{4+}$, 1030.9 $[M+5H+K]^{5+}$, 859.3 $[M+5H+K]^{6+}$.

- Ligand 52 (Figure 11).

Le composé **G** (1,5 éq. / groupes chloroacétiques à substituer) est
25 dissous dans le mélange nPrOH-H₂O 1:1 (500 µl). On ajoute du tri-n-butylphosphine (1 éq.). Après une nuit à température ambiante sous atmosphère d'azote, le mélange est concentré sous pression réduite pendant 20 minutes. En parallèle, 0.4 µmol du dendrimère **H** sont mis en présence de 1 éq. d'antigène **K** dans le mélange 'BuOH-H₂O (180-20 µl), à température ambiante et sous atmosphère d'azote. Une fois la
30 réaction terminée (suivie par RP-HPLC), le milieu réactionnel est ajouté au composé **G** préparé ci-dessus et le pH est ajusté à 8-8.5 par addition de potassium de carbonate

solide. Le ligand **52** est ensuite isolé comme décrit ci-dessus pour le ligand **51**. 0,71 mg du ligand **52** (rendement de 42%) sont obtenus, sous la forme d'une poudre blanche, après purification par RP-HPLC [gradient: 100:0 à 75:25 (A/B) pendant 20 minutes, puis 75:25 à 60:40 (A/B) pendant 30 minutes] et lyophilisation. Son analyse
5 par ESI-MS positive est la suivante : calculé 3913.6, trouvé 3912 ; m/z : 1305.0 $[M+3H]^{3+}$, 979.1 $[M+4H]^{4+}$, 783.6 $[M+5H]^{5+}$.

**EXEMPLE 7 : PREPARATION DE COMPOSES UTILES EN TANT QUE
COMPOSES INTERMEDIAIRES POUR LA PREPARATION DE LIGANDS
10 CONFORMES A L'INVENTION**

Deux composés répondant à la formule générale (VI) conforme à l'invention, dans laquelle :

- m est un nombre entier égal à 58 environ (pour le composé dénommé « 5% QuinPEI » dans ce qui suit) et 116 environ (pour le composé
15 dénommé « 10% QuinPEI » dans ce qui suit) ,

- B^1 représente un reste acide (-)-quinique,
- M représente une fonction amide (-CO-NH-),
- A représente le reste d'un polymère linéaire de polyéthylèneimine (PEI),

ont été préparés par condensation du PEI sur l'acide quinique 1,5-lactone (γ -lactone
20 résultant de l'estérification entre le groupe carboxyle porté par le carbone situé en position 1 et le groupe hydroxyle situé en position 5 de l'acide (-)-quinique), selon le protocole suivant.

L'acide D(-)-quinique (Aldrich) est transformé en 1,5- γ -lactone bicyclique (aussi dénommée "quinide") par chauffage dans du toluène, en présence
25 d'acide *p*-toluènesulfonique, comme décrit notamment par H.O.L. FISCHER dans *Chem. Ber.*, 1921, 54, 775-785, par M. PHILIPPE *et al.* dans *J. Antibiotics*, 1982, 25, 1507-1512 et par P.Q. HUANG *et al.* dans *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 8299-8302.
La lactone (10,1 mg, 58,1 μ mol) réagit avec 50 mg de PEI (25 kDa, Aldrich), ce qui correspond à 1162 μ mol de groupes amino, en supposant une masse moléculaire
30 moyenne en poids de 43 Da pour l'unité répétitive du PEI. La réaction est effectuée dans 2 ml d'eau, pendant 24 h et à 50°C. Le milieu réactionnel est ensuite dilué et

lyophilisé. On obtient du PEI substitué, à un taux de 5%, par de l'acide quinique (dénommé ci-après "5% QuinPEI"). En utilisant deux fois plus de lactone (20,2 mg, 116,2 μmol), on obtient du PEI substitué, à un taux de 10%, par de l'acide quinique (dénommé ci-après "10% QuinPEI").

5 L'achèvement de la réaction est indiqué, par analyse RMN ^1H et ^{13}C du milieu réactionnel, par l'absence du signal correspondant à la quinide (la condensation de la quinide sur le PEI se traduit en effet par l'ouverture du cycle de la lactone). Les résultats sont confirmés par quantification de la quantité d'acide quinique couplée sur le PEI, réalisée par spectroscopie RMN ^1H sur des échantillons
10 des produits obtenus, purifiés par ultrafiltration sur des membranes amicon® (30000 Da, Millipore). La teneur du PEI en acide quinique est confirmée en comparant les surfaces des pics des protons des CH_2 du squelette du polymère et des protons H-4, H-5 and H-6 des résidus d'acide quinique.

Le PEI est un polymère branché présentant des amines secondaires
15 et primaires. L'étude du spectre RMN ^1H permet de distinguer les acides quiniques liés *via* une liaison amide secondaire ou tertiaire (ces derniers étant signalés par un indice '). Ainsi, 5% QuinPEI et 10% Quin PEI contiennent respectivement 30 et 26% de résidus d'acide quinique branchés *via* une liaison amide tertiaire, le reste étant des liaisons amides secondaires.

20 Dans les données qui suivent (analyses RMN ^1H et ^{13}C effectuées dans D_2O - H_2O 10:90), la référence interne est le sel de sodium de l'acide 3-(triméthylsilyl) [2,2,3,3- d_4] propionique.

5% QuinPEI: RMN ^1H δ 4.06 (s large, H-3'), 3.98 (ddd, $J = 1.1$, 3.3 et 7 Hz, H-3), 3.95-3.85 (m, 1 H, H-5'), 3.85 (ddd, J 4.8, 9.1 et 10.5 Hz, H-5), 3.39
25 (dd, $J = 1.1$ et 9.1 Hz, H-4 and H-4'), 3.20, 3.06, 2.71, 2.60 et 2.51 (5 s large, CH et CH_2 PEI), 1.80-1.68 (m, 4 H, H-2, H-2', H-6 et H-6'); RMN ^{13}C δ 180.7 (CON'), 177.5 (CON), 77.4 (C-1), 77.1 (C-1'), 75.7 (C-4), 75.5 (C-4'), 70.9 (C-3 et C-3'), 67.5 (C-5), 66.7 (C-5'), 56.5-46.0 (C PEI), 41.1 et 40.8 (C-6 et C-6'), 39.7-37.0 (C PEI), 38.0 (C-2 et C-2').

30 10% QuinPEI: RMN ^1H δ 4.05 (d large, H-3'), 3.96 (ddd, $J = 3.2$, 3.2 et 7 Hz, H-3), 3.95-3.85 (m, H-5'), 3.85 (ddd, J 4.8, 9.1 et 10.8 Hz, H-5), 3.37 (dd,

$J = 3.2$ et 9.1 Hz, H-4 et H-4'), 3.17, 3.00, 2.65, 2.57 et 2.49 (5 s large, CH et CH₂ PEI), 1.72-1.69 (m, 4 H, H-2, H-2', H-6 et H-6'); RMN ¹³C δ 181.7 (CON'), 177.3 (CON), 77.4 (C-1), 77.1 (C-1'), 75.7 (C-4), 75.5 (C-4'), 70.9 (C-3 et C-3'), 67.5 (C-5), 66.7 (C-5'), 55.4-46.0 (C PEI), 41.0 (C-6 et C-6'), 40.0-38.0 (C PEI), 37.9 (C-2 et C-2').

EXEMPLE 8 : ACTIVITE BIOLOGIQUE DES LIGANDS CONFORMES A L'INVENTION

L'activité biologique des ligands conformes à l'Invention a été vérifiée par une série d'expérimentations *in vitro* visant à tester leur aptitude à être internalisés, *via* le récepteur du mannose, par des cellules dendritiques obtenues à partir de sang périphérique humain.

Les expérimentations rapportées ici ont été réalisées avec les composés suivants :

- le méthyl-quinat (c'est-à-dire l'ester méthylique de l'acide quinique), qui est décrit par E. DELFOURNE *et al.* dans *J. Chem. Res.*, 1991, 56-57,
- le méthyl- α -D-mannopyranoside, commercialisé par la Société LANCASTER,
- les ligands liés à de la fluorescéine 23F et 24F dont la préparation est décrite dans l'exemple 2 ci-avant,
- un composé, qui sera dénommé composé 30F dans ce qui suit et se différenciant des ligands 23F et 24F en ce qu'il comprend 8 chaînes polyhydroxylées de configuration *galacto* au lieu des 8 restes acide (-)-shikimique ou (-)-quinique, ce composé étant destiné à servir de "témoin" négatif en raison de la faible affinité que présente le récepteur du mannose vis-à-vis du D-galactose et des composés apparentés à ce dernier, et
- un composé, qui sera dénommé composé 31F dans ce qui suit et se présentant sous la forme d'un dendrimère constitué par 8 résidus L-lysine et 8 restes D-mannose, ce composé étant, lui, destiné à servir de "témoin" positif puisque le récepteur du mannose se lie préférentiellement au D-mannose.

1) - Protocole

a) Préparation des composés 30F et 31F.

Le composé 30F a été préparé selon un protocole opératoire

consistant :

- dans un premier temps, à synthétiser un tripeptide de séquence (S1) dans des conditions analogues à celles décrites au § 1.2 de l'exemple 1 ci-avant pour la préparation du composé 1 ;
- 5 • puis, après clivage de ce tripeptide, par traitement de la résine par 25 ml d'un mélange TFA/H₂O/Me₂S (95:2,5:2,5) à la température ambiante pendant 2 heures, à coupler 1 molécule dudit tripeptide avec 2 molécules de D-galactonolactone, en faisant réagir 160 mg (0,90 mmoles) de D-galactonolactone avec une solution contenant 140 mg (0,22 mmoles) de tripeptide et 0,79 mmoles de DIEA dans 5 ml
10 de méthanol porté à reflux pendant 24 heures, puis en ajoutant à ce mélange réactionnel 80 mg (0,45 mmoles) de D-galactonolactone supplémentaires et maintenant le reflux pendant encore 24 heures ; et
- enfin, en couplant, dans des conditions identiques à celles décrites dans l'exemple 2 ci-avant, la *N*^α,*N*^ε-di-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2,3,4,5-tétrahydroxy-1-hexane-
15 carbox-1-yl]-L-lysyl-[*S*-(*tert*-butylthio)]-L-cystéyl-glycine ainsi obtenue avec un composé 14 ayant préalablement réagi avec du FITC.

Le composé 31F a été, quant à lui, préparé en traitant, un composé
15 par du 2-thioéthyl- α ,D-mannopyranoside, puis en faisant réagir le composé résultant avec du FITC.

20 b) Obtention des cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques ont été obtenues par différenciation de monocytes, eux-mêmes isolés à partir de cellules mononuclées de sang périphérique humain, selon un protocole dérivé de celui décrit par AVRAMEAS *et al.* (*Eur. J. Immunol.*, 1996, 26, 394-400).

25 Pour ce faire, les cellules mononuclées présentes dans des prélèvements de sang périphérique humain (fournis par l'Etablissement de Transfusion Sanguine du Nord-Pas de Calais, FRANCE) ont été séparées des autres éléments du sang par centrifugation en gradient de densité Ficoll/Pâque (Société PHARMACIA), puis lavées 3 fois, par centrifugation, avec du milieu RPMI 1640 (Société GIBCO)
30 contenant 3 mM d'EDTA.

Les cellules mononuclées ainsi isolées ont été mises en suspension, à 37°C et sous une atmosphère à 5% de CO₂, dans un milieu de culture comprenant du

milieu RPMI 1640 supplémenté par $5 \cdot 10^{-5}$ M de β -mercaptoéthanol (Société MERCK), 2 mM de L-glutamine (Société MERCK), 1 mM de pyruvate de sodium (Société GIBCO), 10% de sérum foetal de veau inactivé par la chaleur (Société GIBCO), 100 UI/ml de pénicilline et par 100 μ g/ml de streptomycine (toutes deux
5 provenant de la Société SPECIA).

Puis, la suspension résultante a été répartie sur des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre, à raison de $8 \text{ à } 12 \cdot 10^7$ cellules par disque. L'enrichissement en monocytes a été obtenu en laissant adhérer ces cellules aux boîtes, à 37°C et dans un incubateur à CO₂ (5%) humidifié, pendant 3 à 4 heures.

10 Après élimination des cellules non-adhérentes, les cellules adhérentes ont été remises en culture dans le milieu décrit ci-avant, mais comprenant de plus, 800 U/ml de facteur de croissance des lignées granulocytaires et macrophagiques humain recombinant (Société PEPRO TECH) et 1000 U/ml d'interleukine-4 humaine recombinante (Société PEPRO TECH), à raison de 10^6
15 cellules par ml de milieu. Elles ont été alors mises en culture, dans des plaques de culture cellulaire de 24 puits et dans les mêmes conditions de température et d'atmosphère que précédemment, pendant 6 à 8 jours au cours desquels il y a différenciation des monocytes vers les cellules dendritiques (ces dernières étant faiblement adhérentes).

20 c) Analyse par cytométrie de flux des cellules non-adhérentes recueillies.

Afin de vérifier que les cellules non-adhérentes recueillies à l'étape b) ci-avant présentent bien les antigènes de surface caractéristiques des cellules dendritiques, une partie de ces cellules ont été lavées 2 fois avec du tampon PBS
25 contenant 0,03 mg/ml de sérum albumine bovine, puis mises à incuber, sur de la glace et pendant 30 minutes, avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre le récepteur du mannose humain et conjugué à de la phycoérythrine (Société BECTON DICKINSON) et :

- soit un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'antigène CD1a humain,
30 qui représente l'un des principaux antigènes de surface des cellules dendritiques,
- soit un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'antigène CD14 humain, qui représente, lui, l'un des antigènes de surface propres aux monocytes et

macrophages,

ces deux derniers anticorps étant marqués par du FITC (Société BECTON DICKINSON).

5 A l'issue de ces incubations, les cellules ont été lavées avec du tampon PBS et remises en suspension dans ce même tampon. La fluorescence leur étant associée a alors été analysée par cytofluorométrie, au moyen d'un cytomètre EPICS XL-MCL (Société COULTER CORPORATION).

d) Test d'inhibition de l'internalisation du composé 31F par le méthyl-quinat.

10 Afin de montrer que le méthyl-quinat est un mime du mannose dans l'internalisation avec le récepteur du mannose des cellules dendritiques, la compétition entre le méthyl-quinat, ou le méthyl- α -D-mannopyranoside (servant de témoin d'inhibition), et le composé 31F est étudiée selon le protocole suivant: les cellules dendritiques sont récupérées, lavées avec du tampon PBS, préincubées à
15 37°C, puis incubées pendant 20 minutes, à 37°C, avec des solutions de concentrations croissantes en méthyl-quinat et le composé 31F (en concentration finale de 5 μ M). Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS, fixées dans du paraformaldéhyde à 1%, puis analysées par cytofluorométrie de flux, comme décrit en c) ci-dessus.

e) Internalisation des ligands conformes à l'Invention par les cellules
20 dendritiques.

Les tests visant à apprécier l'internalisation des ligands 23F et 24F ont été réalisés selon le protocole suivant : des cellules non-adhérentes recueillies à l'étape b) ci-avant ont été lavées 2 fois avec du tampon PBS contenant 1 mM de chlorure de calcium. A la suite de quoi, ces cellules ont été préincubées, à 37°C et
25 pendant 10 minutes, puis mises à incuber, à 37°C et pendant 20 minutes, avec différentes solutions contenant chacune l'un des composés à tester, à une concentration comprise entre 1 et 10 μ M. Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois avec du tampon PBS froid et fixées pendant 20 minutes dans du paraformaldéhyde à 2%.

30 La fluorescence associée à ces cellules a été alors appréciée par une analyse FACScan au moyen du cytomètre précité.

Par ailleurs, afin de vérifier que l'internalisation des ligands 23F et

24F par les cellules dendritiques est bien liée à une reconnaissance de ces ligands par le récepteur du mannose et non à un autre mécanisme, ces tests ont été reconduits en préincubant les cellules en présence de solutions de mannane extrait de *Saccharomyces cerevisiae* (Société SIGMA), le mannane étant, en effet, connu pour être internalisé de manière sélective *via* le récepteur du mannose. Dans ce but, les cellules dendritiques sont récupérées, lavées avec du tampon PBS, incubées à 37°C, puis préincubées pendant 20 minutes, à 37°C, en présence de solutions de mannane extrait de *Saccharomyces cerevisiae* de concentrations comprises entre 10^{-4} et 10 mg/ml. Ensuite, les ligands 23F et 24F (en concentration finale de 5µM) sont ajoutés (incubation : 20 minutes à 37°C). Les cellules sont lavées au PBS, fixées dans du paraformaldéhyde à 1% et analysées par cytofluorométrie de flux, comme décrit en c) ci-dessus.

f) Influence du nombre de mimes du mannose portés par les ligands conformes à l'Invention sur l'internalisation de ces ligands.

Afin d'étudier quelle est la construction optimale, c'est-à-dire quel est le ligand comportant le nombre de mimes du mannose le plus réduit (pour faciliter la synthèse chimique du ligand) qui est internalisé de façon spécifique par les récepteurs du mannose, les cellules dendritiques sont incubées pendant 20 minutes à 37°C avec 10 µM de ligands comprenant 2, 4 ou 8 résidus du mannose, de l'acide quinique ou de l'acide shikimique (ligands di-, tétra- ou octavalents). Après fixation dans du paraformaldéhyde, les cellules sont analysées par cytofluorométrie de flux, comme décrit en c) ci-dessus.

Pour ces expériences, les ligands suivants ont été utilisés :

- . ligands porteurs de résidus d'acide shikimique : 34F (ligand divalent), 21F (ligand tétravalent) et 23F (ligand octavalent),
- . ligands porteurs de résidus d'acide quinique : 33F (ligand divalent), 22F (ligand tétravalent) et 24F (ligand octavalent).

2) - Résultats

a) Test d'inhibition de l'internalisation du composé 31F par le méthyl-quinat.

La Figure 12 illustre la capacité du méthyl-quinat à inhiber l'internalisation du composé 31F. En ordonnées figurent les pourcentages

d'inhibition, calculés par la formule :

$$\% \text{ inhibition} = (\text{MnX } 31\text{F} - \text{MnX mqui}) / \text{MnX } 31\text{F}$$

où :

. « MnX » représente la valeur moyenne de l'intensité de fluorescence,

5 . « MnX 31F » représente le signal dû à l'internalisation du composé 31F seul,

. « MnX mqui » représente le signal dû à l'internalisation du composé 31F en présence de différentes concentrations (exprimées en mM) de méthyl-quinat, indiquées en abscisses.

La courbe signalée par les symboles -♦- représente l'inhibition de
10 l'internalisation du composé 31F par le méthyl-quinat, et la courbe signalée par les symboles -o- représente l'inhibition de l'internalisation du composé 31F par le méthyl- α -D-mannopyranoside, composé servant de témoin d'inhibition.

En présence de méthyl-quinat, on remarque une inhibition efficace à 75% de l'internalisation spécifique par le récepteur du mannose, comparable à celle
15 du ligand de référence, le méthyl- α -D-mannopyranoside.

b) Internalisation des ligands conformes à l'Invention par les cellules dendritiques.

La Figure 13 illustre, sous la forme de courbes, les valeurs moyennes des intensités de fluorescence présentées par les cellules dendritiques après
20 une incubation en présence de solutions comprenant respectivement de 1 à 10 μM de ligand 23F (-●-), de ligand 24F (-♦-), de composé 30F (-Δ-) et de composé 31F (-□-). Sont exprimées, en ordonnées, les valeurs moyennes des intensités de fluorescence (UA) et, en abscisses, les concentrations des solutions.

La Figure 13 montre qu'une incubation des cellules dendritiques,
25 d'une durée de 20 minutes et réalisée en présence d'une solution dosée à 1 μM de ligand 23F ou de ligand 24F est suffisante pour obtenir une internalisation de ces ligands par ces cellules. Elle montre également que cette internalisation est spécifique puisque le composé 30F (porteur de chaînes polyhydroxylées) ne pénètre pratiquement pas dans les cellules dendritiques, et ce quelle que soit la dose de ce
30 composé utilisée pour l'incubation de ces cellules, alors que le composé 31F (porteur de restes D-mannose) se retrouve très largement dans lesdites cellules dendritiques.

Par ailleurs, la Figure 14 illustre, sous la forme de courbes, les valeurs moyennes des intensités de fluorescence présentées par les cellules dendritiques lorsque celles-ci ont été soumises successivement à une préincubation en présence de solutions de mannane de concentrations comprises entre 10^{-4} et 10 mg/ml, puis à une incubation avec des solutions comprenant 5 μ M de ligand 23F (-●-), de ligand 24F (-◆-), de composé 30F (-△-) ou de composé 31F (-□-). Sont exprimées, en ordonnées, les valeurs moyennes de fluorescence (UA) et, en abscisses, les concentrations des solutions de mannane.

La Figure 14 montre que l'internalisation, par les cellules dendritiques, des ligands 23F et 24F, ainsi que celle du composé 31F diminue drastiquement au fur et à mesure que la concentration en mannane augmente. Ceci signe l'existence d'une forte compétition entre ces ligands et le mannane vis-à-vis du récepteur du mannose et vient confirmer que l'internalisation des ligands conformes à l'Invention par les cellules dendritiques s'effectue bien par l'intermédiaire du récepteur du mannose.

c) Influence du nombre de mimes du mannose portés par les ligands conformes à l'Invention sur l'internalisation de ces ligands.

La Figure 15 représente, en ordonnées, le pourcentage d'internalisation spécifique des ligands di-, tétra- ou octavalents (abscisses) par le récepteur du mannose. Les ligands tétra- ou octavalents sont internalisés de façon préférentielle par le récepteur du mannose, par rapport aux ligands divalents. On peut donc considérer que les structures optimales recherchées sont celles comprenant 4 mimes du mannose, qui sont plus facilement synthétiser que celles comprenant 8 mimes du mannose. Par opposition au ligand naturel (ligand portant des résidus du mannose), dont l'internalisation est optimale pour une structure octavalente, on constate que les ligands portant des résidus d'acide quinique ou shikimique sont internalisés de façon optimale lorsqu'ils sont trévalents.

EXEMPLE 9 : SPECIFICITE DE L'INTERNALISATION DES LIGANDS CONFORMES A L'INVENTION DANS LES CELLULES DENDRITIQUES VIA LES RECEPTEURS DU MANNOSE

1) Analyse par microscopie confocale.

5 L'internalisation et la distribution des ligands conformes à l'Invention dans les cellules dendritiques est analysée par microscopie confocale avec double et triple marquage du récepteur du mannose et du noyau des cellules.

Les cellules dendritiques, différenciées à partir de cellules mononuclées en présence d'IL-4 et du facteur de croissance GM-CSF, sont utilisées à
10 J+5. Elles sont incubées pendant 45 minutes à 4°C avec 10 µg d'anti-mannose récepteur humain (PHARMIGEN) et 5 µM de l'une des constructions suivantes :

. **61F** (Figure 16) : dendrimère constitué de 4 résidus L-lysine portant 4 restes de D-mannose, ainsi qu'une molécule de fluorescéine (FITC). La construction **61F** a été préparée comme le composé **31F** (cf. exemple 8, paragraphe
15 1.a), mais en faisant réagir du 2-thioéthyl- α ,D-mannopyrannoside avec un composé **14** (cf. exemple 1, paragraphe 1.1) ;

. **21F**, **22F** et **64F** : constructions portant respectivement des restes d'acide shikimique, d'acide quinique et des chaînes polyhydroxylées de configuration *galacto* (provenant de molécules de galactonolactones). La construction **64F** a été
20 préparée comme le composé **30F** (cf. exemple 8, paragraphe 1.a), mais en utilisant un composé **13** pour le couplage (cf. exemple 1, paragraphe 1.1). La préparation des ligands **21F** et **22F** est décrite dans l'exemple 2 ci-avant.

La structure **61 F** sert de témoin positif, tandis que la structure **64F** sert de témoin négatif. Les structures **21F** et **22F** représentent des ligands conformes à
25 la présente invention.

Les cellules sont placées à 37°C pendant 5 minutes. Après incubation, elles sont fixées pendant 45 minutes à 4°C par une solution de composition suivante : PBS (0.1 mM MgCl₂, 0.1mM Ca₂), paraformaldéhyde à 4%, sucrose. La réaction de fixation est arrêtée au moyen d'une solution de chlorure
30 d'ammonium (50mM), pendant 10 minutes et à température ambiante. Les cellules sont lavées 3 fois par du PBS, puis déposées sur des lames de poly-L-lysine. Le signal de la fluorescéine est amplifié par incubation à 37°C, pendant 30 minutes, avec un

- IgG anti-FITC de lapin couplé à l'Alexa Fluor 488 (dilution : 1/200^{ème}) (MOLECULAR PROBES) en même temps que l'incubation avec le second anticorps de chèvre, IgG anti-souris couplé à l'Alexa Fluor 568 (dilution : 1/500^{ème}) (MOLECULAR PROBES), permettant la détection de l'anti-mannose récepteur.
- 5 L'incubation avec les seconds anticorps est réalisée en milieu PBS, BSA (1mg/ml), saponine (0.05%).

- Les cellules sont lavées par du PBS contenant 1mg/ml de BSA et 0,05% de saponine, puis par du PBS/BSA et enfin par du PBS, puis montées entre lame et lamelle en milieu de montage VECTASHIELD. L'observation des lames est
- 10 réalisée par microscopie confocale sur un appareil LEICA TCS NT possédant un laser Krypton/Argon (excitation 488, 468 et 647). L'acquisition des deux longueurs d'onde (à savoir l'acquisition de la fluorescence émise par l'Alexa 568, correspondant au récepteur du mannose, et l'acquisition de la fluorescence émise par l'Alexa 488, correspondant aux structures testées) est effectuée simultanément et la superposition
- 15 des deux images permet de visualiser les deux marqueurs en même temps, sur la même coupe de cellule, effectuée selon l'axe z de la cellule.

- On remarque une co-localisation des deux marqueurs, et donc une co-localisation des ligands 61F, 21F et 22F marqués à la fluorescéine avec le récepteur du mannose, permettant d'affirmer que les ligands conformes à l'invention
- 20 sont bien internalisés dans les cellules dendritiques *via* le récepteur du mannose.

2) Analyse au moyen de cellules Cos transfectées par le récepteur du mannose.

- Des cellules Cos-1, n'exprimant pas, à l'état natif, le récepteur du mannose, sont transfectées par le plasmide CD8 contenant une séquence codante pour
- 25 le récepteur du mannose (MR). 48 heures après la transfection, les cellules sont collectées : 10 à 15% d'entre elles expriment le transgène. Dans ce qui suit, ces cellules sont dénommées « Cos MR ».

- Des tests d'internalisation sont réalisées à partir de ces cellules, en utilisant les composés suivantes :
- 30 **22F** : dendrimère constitué de 4 résidus L-lysine portant 4 restes d'acide quinique, ainsi qu'une molécule de fluorescéine (FITC). Il s'agit d'un ligand conforme à la présente Invention.

. **64F** : construction portant des chaînes polyhydroxylées de configuration *galacto* (témoin négatif).

Les tests d'internalisation consistent à incuber les cellules, pendant 20 minutes et à 37°C, en présence de 10 µmoles des composés **22F** ou **64F**, puis à
5 laver les cellules avec du PBS froid et à les fixer par du paraformaldéhyde à 1%, avant d'effectuer l'analyse FACScan au moyen du cytomètre décrit dans l'exemple 8. La Figure 17 représente le pourcentages de cellules positives détectées (en abscisses) pour les quatre tests suivants, indiqués sur l'axe des ordonnées :

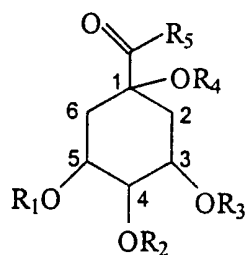
- . test a) : incubation des cellules Cos MR avec le composé **64F**,
- 10 . test b) : incubation des cellules Cos MR avec le composé **22F**, en présence d'une solution de mannane (5 mg/ml) telle que décrite dans l'exemple 8, le mannane, entrant en compétition avec le composé **22F** vis-à-vis du récepteur du mannose,
- . test c) : incubation des cellules Cos MR avec le composé **22F**,
- 15 . test d) : incubation des cellules Cos-1 (non transfectées) avec le composé **22F**.

D'après la Figure 17, les cellules Cos-1 non transfectées (test d) ne donnent, bien entendu, pas lieu à une internalisation du composé **22F** : le signal détecté est assimilable au bruit de fond de l'appareil. Il en va de même pour les
20 cellules Cos MR incubées avec le composé **64F**, non spécifique du récepteur du mannose (test a). Le test b) traduit l'inhibition de l'internalisation du composé **22F** par le mannane. Quant à la construction **22F**, elle est bien internalisée de manière spécifique par les cellules transfectées par le récepteur MR (test c).

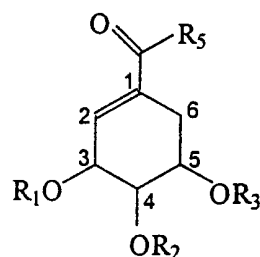
REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un composé répondant à la formule générale (Ia) et/ou d'au moins un composé répondant à la formule générale (Ib) :

5



(Ia)



(Ib)

dans lesquelles :

- R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent, indépendamment les uns des autres, un atome d'hydrogène ou un groupe protecteur,
 - 10 - R_5 représente un groupe -OH, un groupe -SH, un groupe -NH-NH₂, un atome d'halogène, ou une chaîne carbonée linéaire, ramifiée ou cyclique, saturée ou insaturée, comprenant de 1 à 18 atomes de carbone et éventuellement de 1 à 12 atomes choisis parmi l'oxygène, le soufre et l'azote, ladite chaîne carbonée étant éventuellement substituée par 1 à 16 atomes d'halogène et portant éventuellement
 - 15 au moins un groupe nucléophile ou au moins un groupe électrophile,
- en tant que ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose, ou pour la préparation d'un tel ligand.

20 2. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle les composés de formules générales (Ia) et/ou (Ib) sont tels que les groupes -OR₂ et -OR₃ sont en relation *trans*.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans laquelle les composés de formules générales (Ia) et/ou (Ib) sont tels que R_5 représente un groupe hydroxyle.

25 4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle le composé de formule (Ib) est tel que R_1 , R_2 et R_3 représentent des atomes d'hydrogène et R_5 représente un groupe hydroxyle.

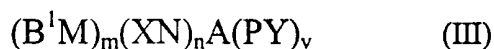
5. Utilisation selon la revendication 4, dans laquelle le composé de formule (Ib) représente de l'acide (-)-shikimique.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle le composé de formule (Ia) est tel que R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent des atomes d'hydrogène et R_5 représente un groupe hydroxyle.

7. Utilisation selon la revendication 6, dans laquelle le composé de formule (Ia) représente l'acide (-)-quinique.

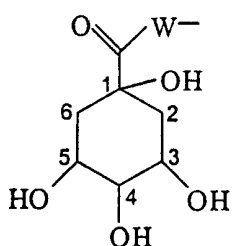
8. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans laquelle le composé de formule (Ia) est tel que R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent des atomes d'hydrogène et R_5 représente un groupe $-NH-(CH_2)_2-SH$.

9. Composé utile en tant que ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose, ou en tant que composé intermédiaire pour la préparation d'un tel ligand, caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale (III) ci-après :

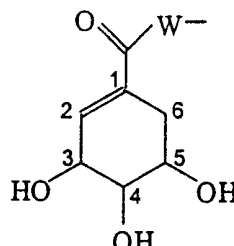


dans laquelle :

- B^I répond à une ou plusieurs formules générales (IIa) ou (IIb) ci-après :



(IIa)



(IIb)

où W représente une liaison ou une chaîne carbonée linéaire, ramifiée ou cyclique, saturée ou insaturée, comprenant de 1 à 18 atomes de carbone et éventuellement de 1 à 12 atomes choisis parmi l'oxygène, le soufre et l'azote, ladite

chaîne carbonée étant éventuellement substituée par 1 à 16 atomes d'halogène,

- X représente le reste d'un oligopeptide X' comprenant de 1 à 6 acides aminés,
- A représente le reste d'un composé A' au moins difonctionnel,
- Y représente le reste d'un composé d'intérêt Y',

- 5 - m est un nombre entier compris entre 1 et 32,
- n est un nombre entier compris entre 0 et 32,
- y est un nombre entier compris entre 1 et 4, et
- M, N et P représentent chacun un groupe de liaison, respectivement entre B¹ et A quand n = 0 ou B¹ et X quand n est différent de 0, entre X et A quand n est
- 10 différent de 0, et entre A et Y, et comprennent, indépendamment les uns des autres, une fonction choisie parmi les fonctions oxime, hydrazone, amide, ester, thioester, hydrazide, hydroxamate, éther, thioéther, amine, carbonate, carbamate, thiocarbonate, thiocarbamate, urée, thiourée et thiazolidine.

10. Composé selon la revendication 9, dans lequel le composé A' est
- 15 formé d'un enchaînement comprenant plusieurs restes d'un composé au moins trifonctionnel, liés les uns aux autres par des liaisons covalentes, et propre à offrir, au niveau des groupes fonctionnels libres de ces restes, plusieurs sites d'ancrage pour le ou les composés de formule générale (Ia) et/ou (Ib) ou, lorsque X est présent, le composé X', et pour le composé Y'.

- 20 11. Composé selon la revendication 10, dans lequel le composé A' comprend de 2 à 32 et, de préférence, de 4 à 16 restes d'un composé trifonctionnel.

12. Composé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, dans lequel le composé A' se présente soit sous une forme linéaire, soit sous une forme ramifiée et, notamment, de type arborescente.

- 25 13. Composé selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, dans lequel le composé A' comprend un enchaînement d'acides aminés, identiques ou différents, sélectionnés dans le groupe constitué par la lysine, l'hydroxylysine, la sérine, la thréonine, la cystéine, l'ornithine, l'acide aspartique et l'acide glutamique.

14. Composé selon l'une quelconque des revendications 9 à 13, dans
- 30 lequel le composé de formule générale (III) est tel que m est un nombre entier compris entre 4 et 16, n est un nombre entier compris entre 2 et 8, X représente le reste d'un oligopeptide comprenant de 2 à 4 résidus d'acides aminés, et A représente le reste d'un

enchaînement comprenant de 2 à 8 résidus de lysine et se présentant sous la forme d'un dendrimère.

15 15. Composé selon l'une quelconque des revendications 9 à 14, dans lequel le composé de formule générale (III) est tel que B¹ représente le reste d'un ou plusieurs composés choisis parmi l'acide (-)-shikimique et l'acide (-)-quinique.

10 16. Composé selon l'une quelconque des revendications 9 à 14, dans lequel Y' choisi parmi les antigènes, les anticorps, les acides nucléiques et les fragments d'acides nucléiques codant pour une protéine d'intérêt ou pour un ou plusieurs déterminants antigéniques de cette protéine, les fractions bactériennes et virales purifiées, les principes actifs médicamenteux et les marqueurs détectables.

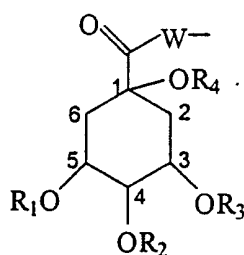
17. Composé utile en tant que composé intermédiaire pour la préparation d'un ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose, caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale (V) ci-après :

15

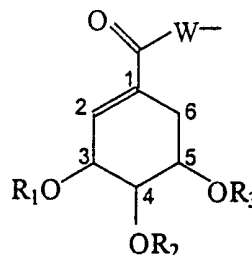


dans laquelle :

- B² répond à une ou plusieurs formules générales (IVa) ou (IVb) ci-après :



(IVa)



(IVb)

20

où R₁, R₂, R₃, R₄ et R₅ sont tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, et où W est tel que dans la revendication 9,

25 - X représente le reste d'un oligopeptide X' comprenant de 1 à 6 acides aminés,
- A représente le reste d'un composé A' au moins difonctionnel,

- **m** est un nombre entier compris entre 1 et 32,
- **n** est un nombre entier compris entre 0 et 32, et
- **M** et **N** représentent chacun un groupe de liaison, respectivement entre B^2 et **A** quand $n = 0$ ou B^2 et **X** quand n est différent de 0, et entre **X** et **A** quand n est différent de 0, et comprennent, indépendamment l'un de l'autre, une fonction choisie parmi les fonctions oxime, hydrazone, amide, ester, thioester, hydrazide, hydroxamate, éther, thioéther, amine, carbonate, carbamate, thiocarbonate, thiocarbamate, urée, thiourée et thiazolidine.

18. Composé de formule générale (V) selon la revendication 17, dans lequel **M**, **N**, **m**, **n**, ainsi que les composés **A'** et **X'**, sont tels que définis dans l'une quelconque des revendications 9 à 14.

19. Composé selon la revendication 17 ou la revendication 18, dans lequel B^2 représente un reste d'un ou plusieurs composés choisis parmi l'acide (-)-shikimique et l'acide (-)-quinique, éventuellement sous forme protégée.

20. Composé utile en tant que composé intermédiaire pour la préparation d'un ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose, caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale (VI) ci-après :



dans laquelle :

- B^1 et **M** sont tels que définis dans la revendication 9 ou la revendication 15,
- **m** est un nombre entier compris entre 50 et 500, et
- **A** représente le reste d'un polymère **A'** capable de former un complexe non-covalent avec un composé d'intérêt, tel qu'un acide nucléique.

21. Composé selon la revendication 20, dans lequel le polymère **A'** est un polymère cationique, tel qu'un polymère de lysine ou un polyéthylèneimine.

22. Composé utile en tant que ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose, caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme d'un complexe non-covalent entre un composé répondant à la formule générale (VI) telle que définie dans la revendication

20 ou la revendication 21, et un composé d'intérêt, tel qu'un acide nucléique.

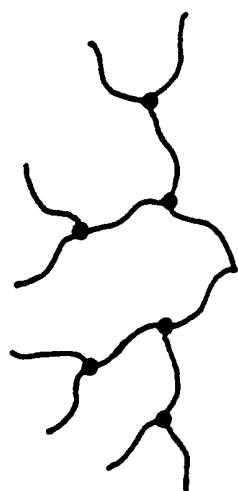
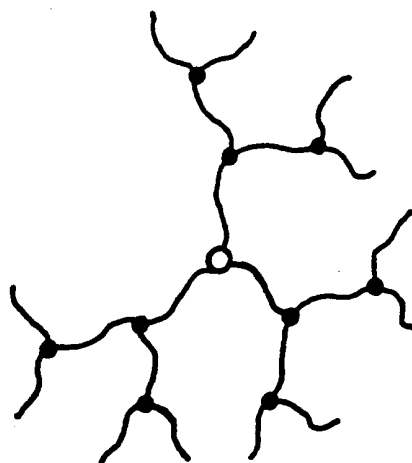
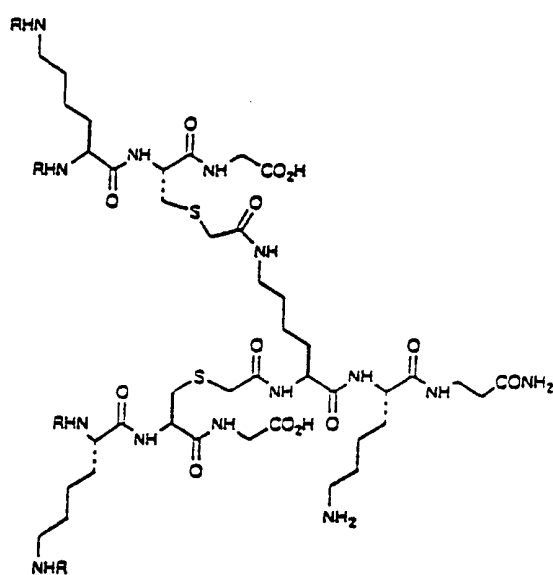
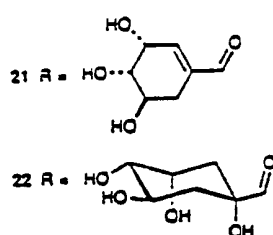
23. Utilisation d'au moins un composé répondant à la formule générale (Ia) et/ou d'au moins un composé répondant à la formule générale (Ib) pour la préparation d'un médicament capable de se lier au récepteur du mannose ou à tout
5 récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose.

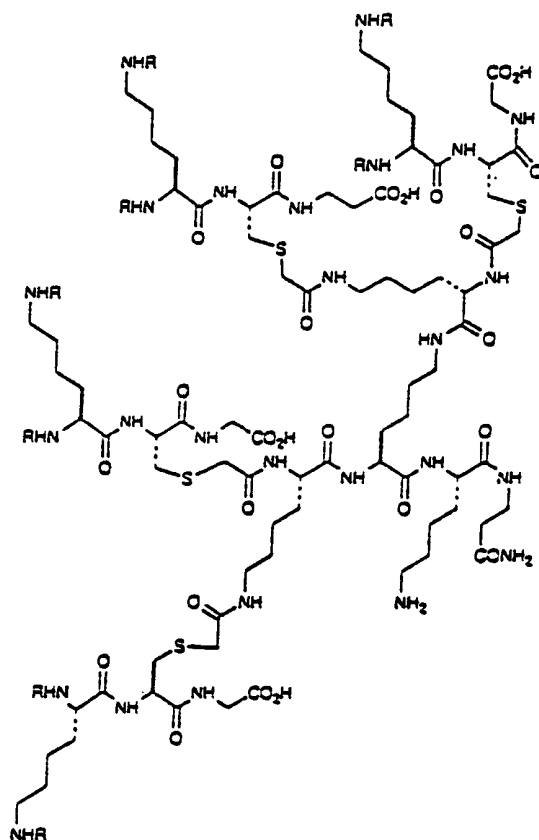
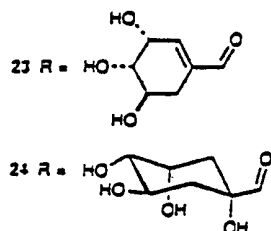
24. Composé utile en tant que ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose selon l'une quelconque des revendications 9 à 16 et 22, pour l'utilisation en tant que médicament.

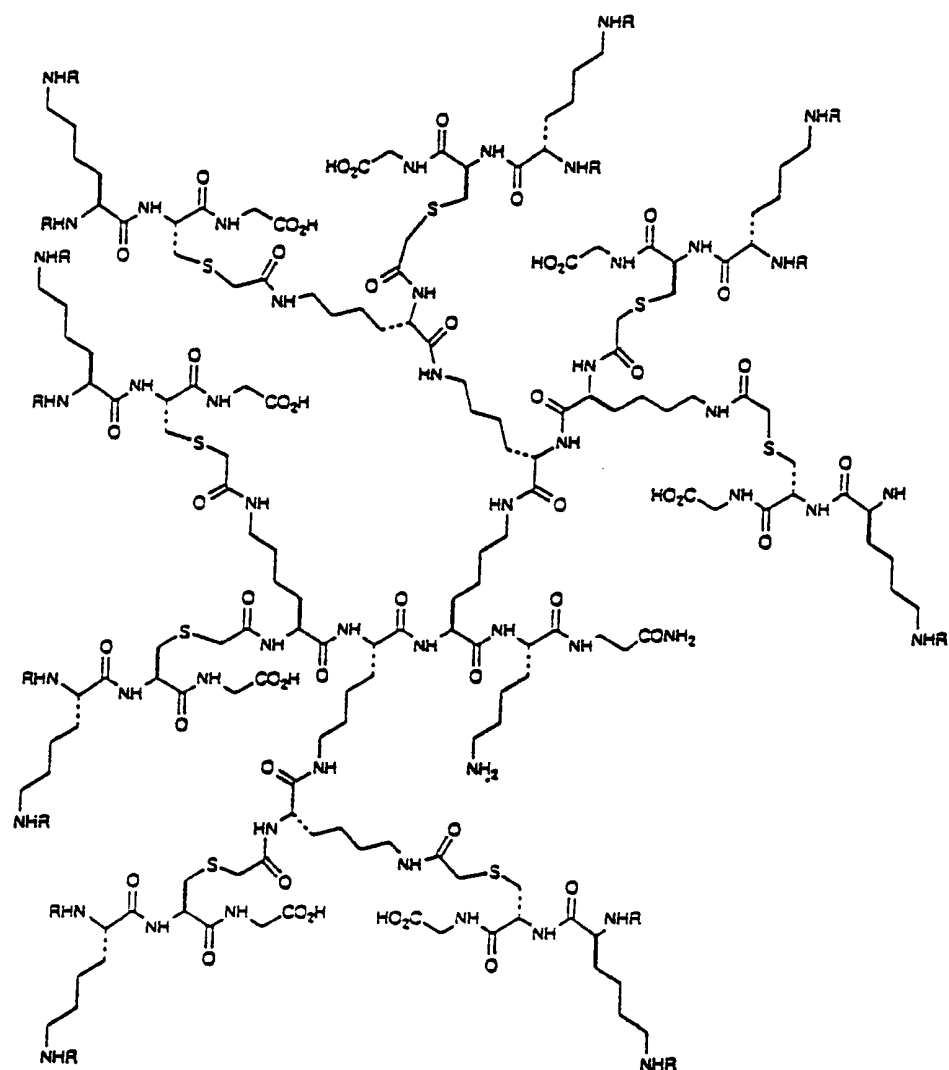
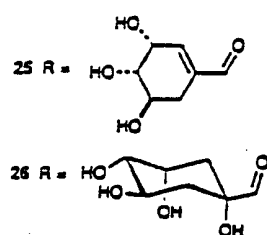
10 25. Composé utile en tant que ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose selon l'une quelconque des revendications 9 à 16 et 22, pour l'utilisation *in vitro*.

26. Réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend un composé utile en tant que ligand du récepteur du mannose ou de tout récepteur de la
15 famille des C-lectines apparenté au récepteur du mannose selon l'une quelconque des revendications 9 à 16 et 22.

1/14

FIG. 1AFIG. 1BFIG. 2A

FIG. 2B

FIG. 2C

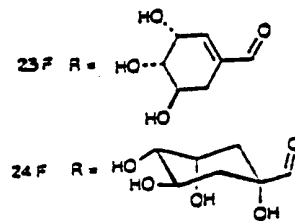
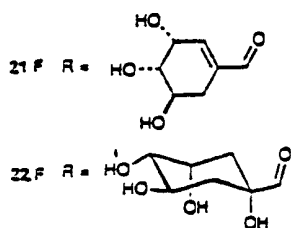
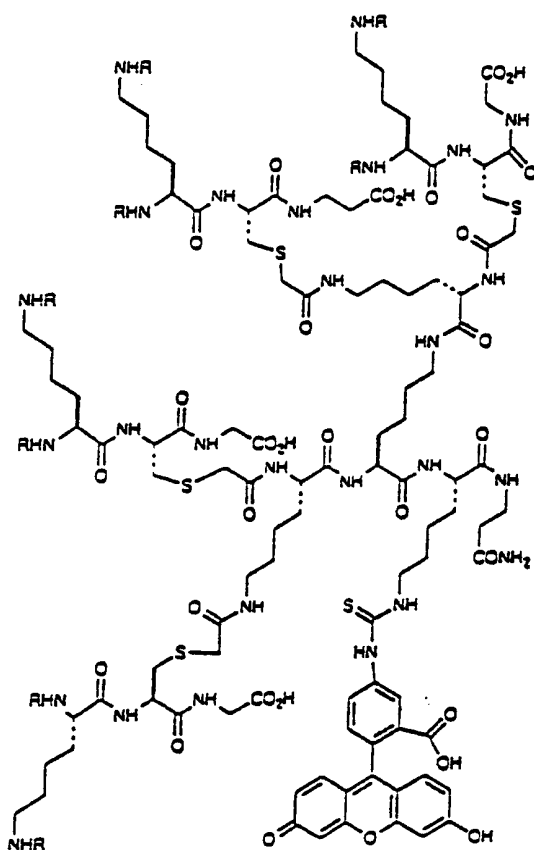
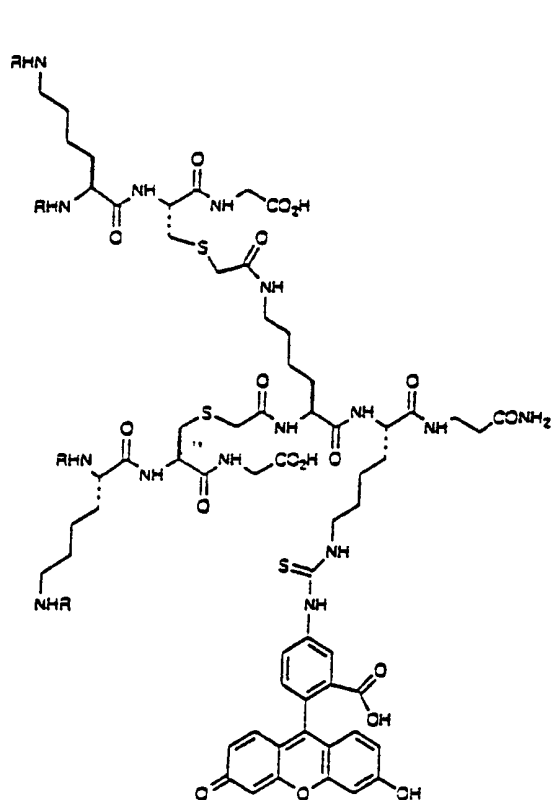
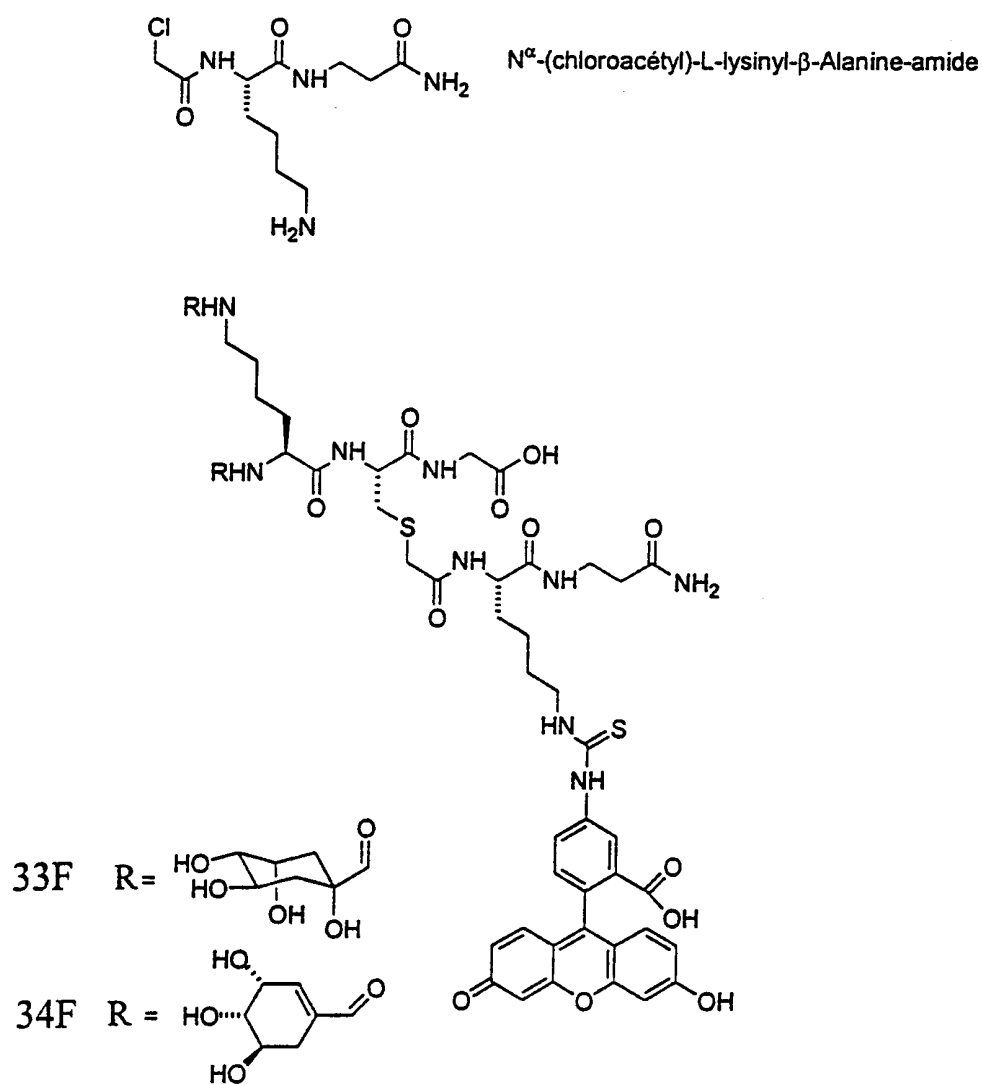
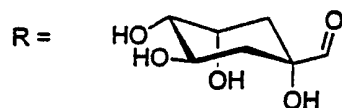
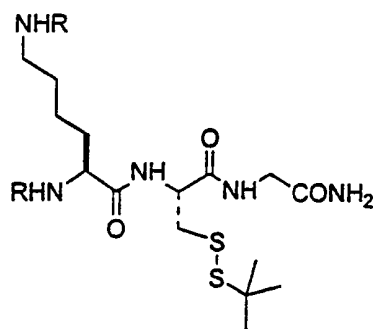
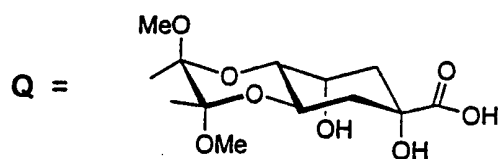


FIG. 3

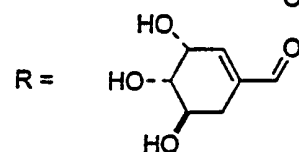
FIG. 4

FIG. 5

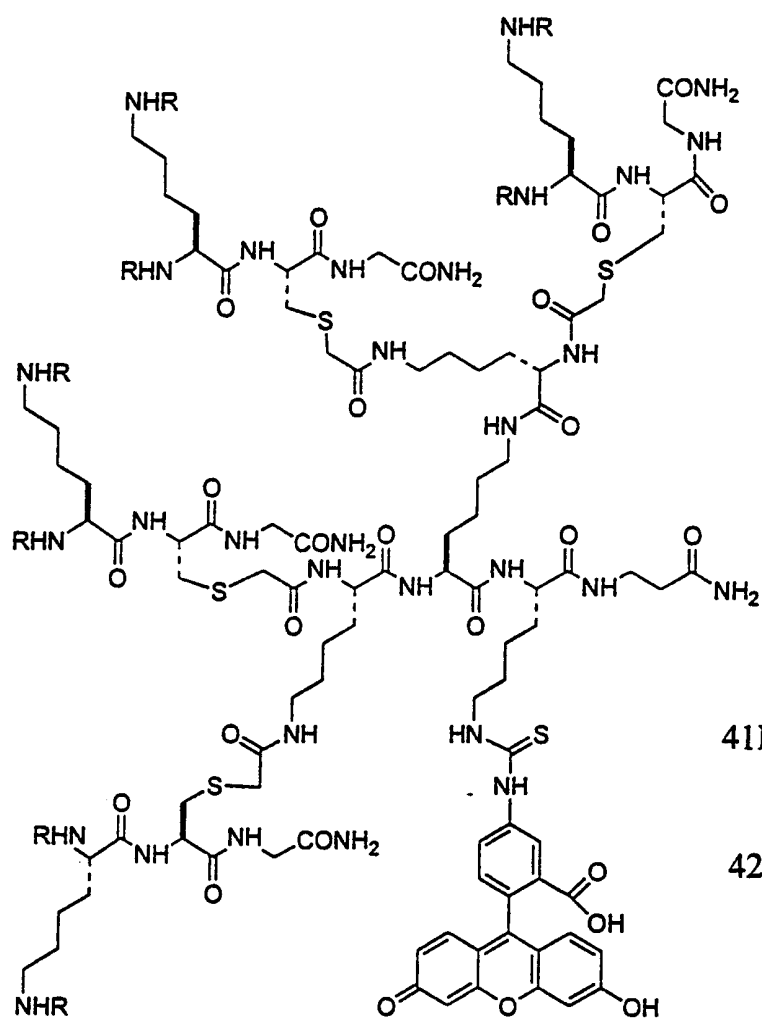
6/14



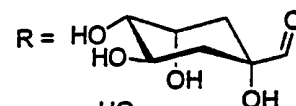
(S2)q



(S2)s



41F



42F

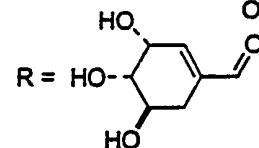
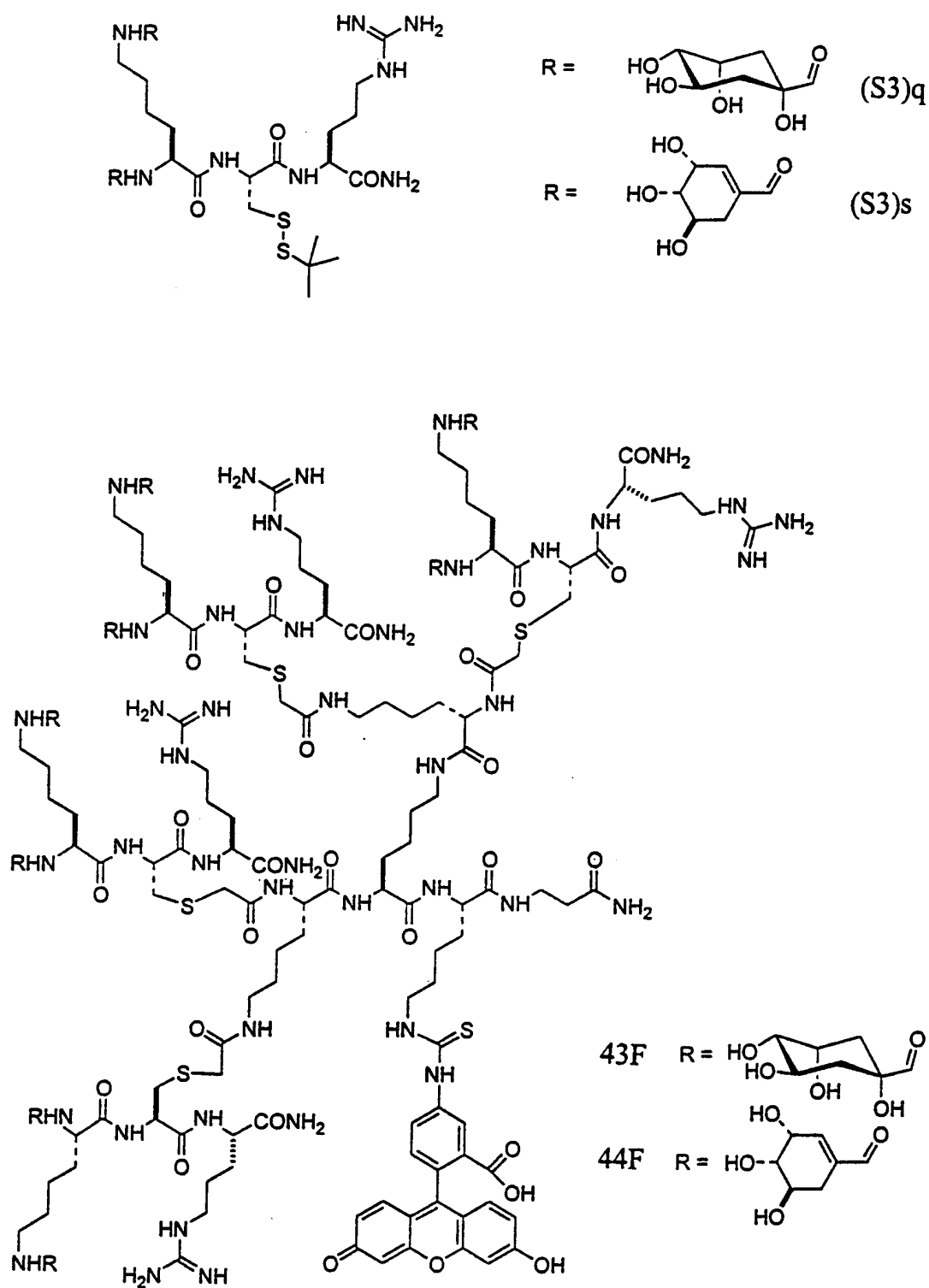
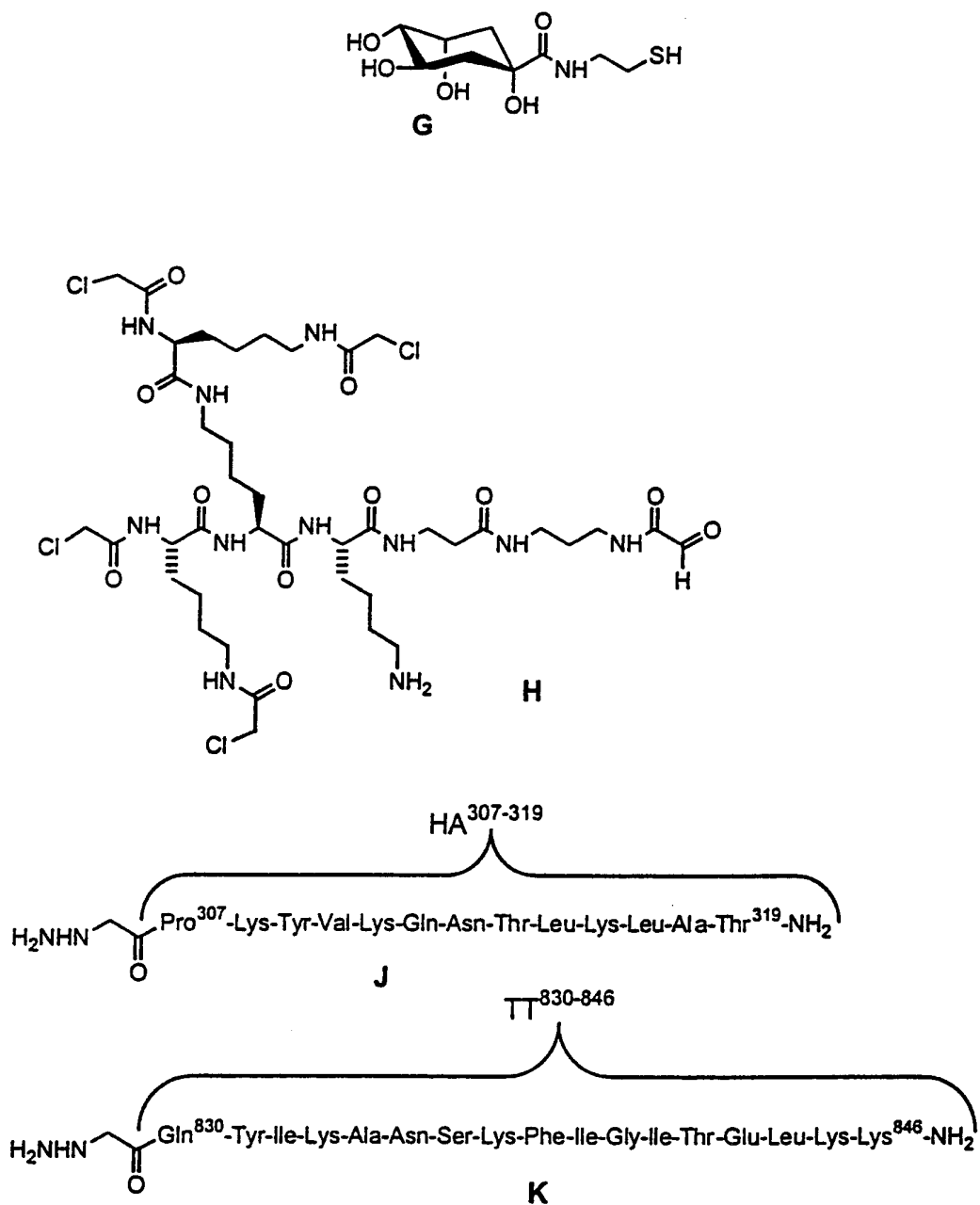


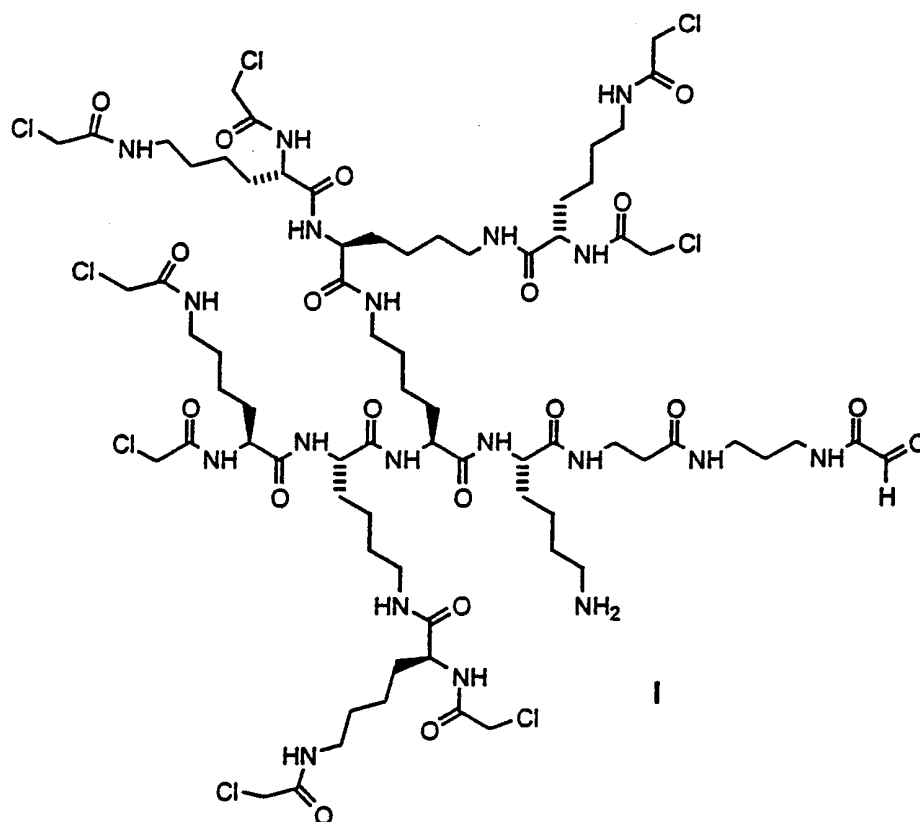
FIG. 6

7/14

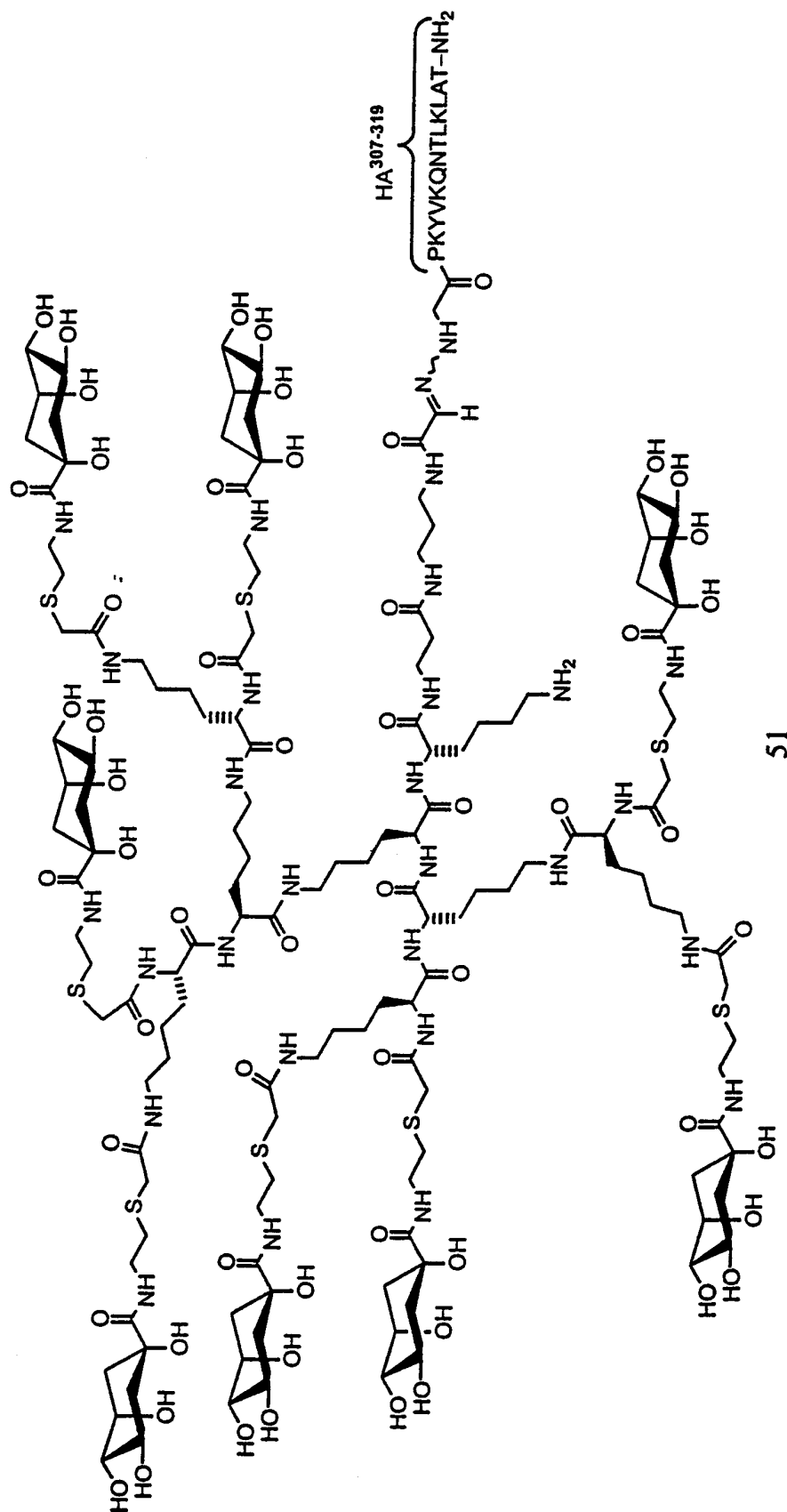
FIG. 7

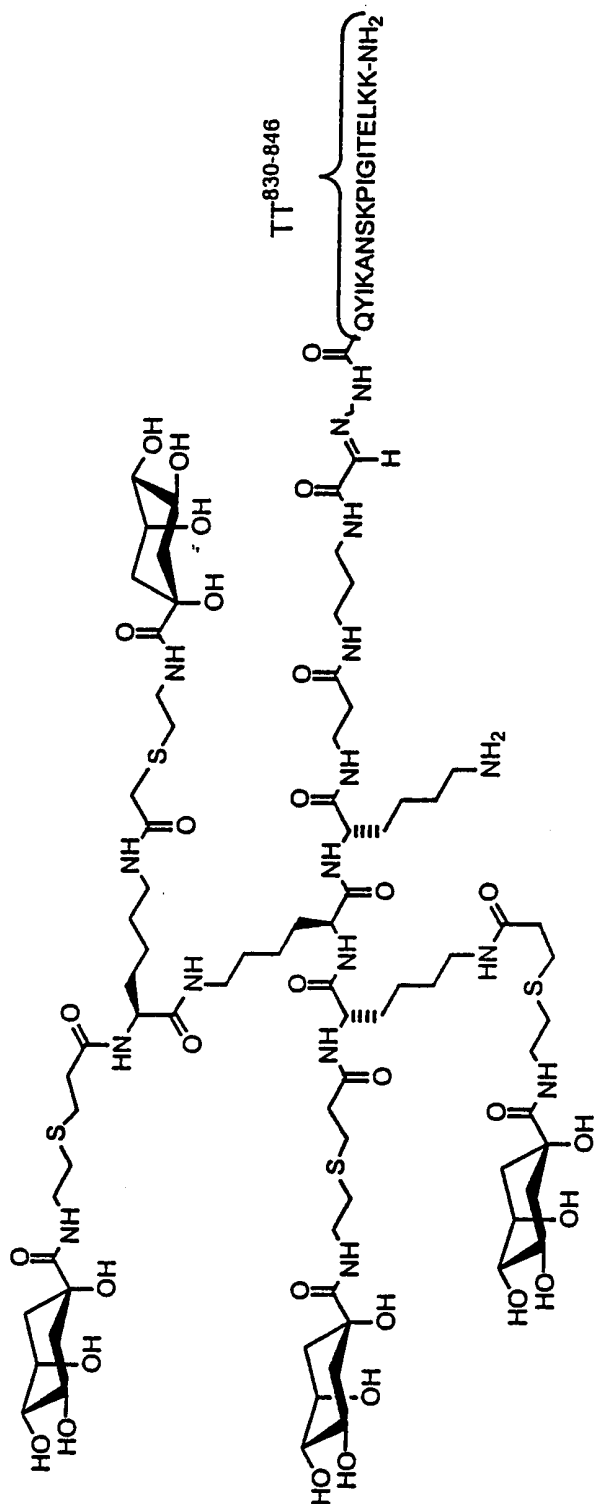
8/14

**FIG. 8**

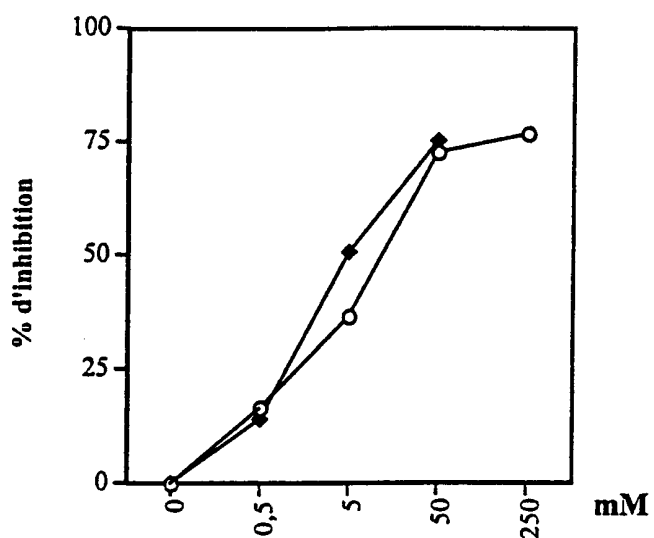
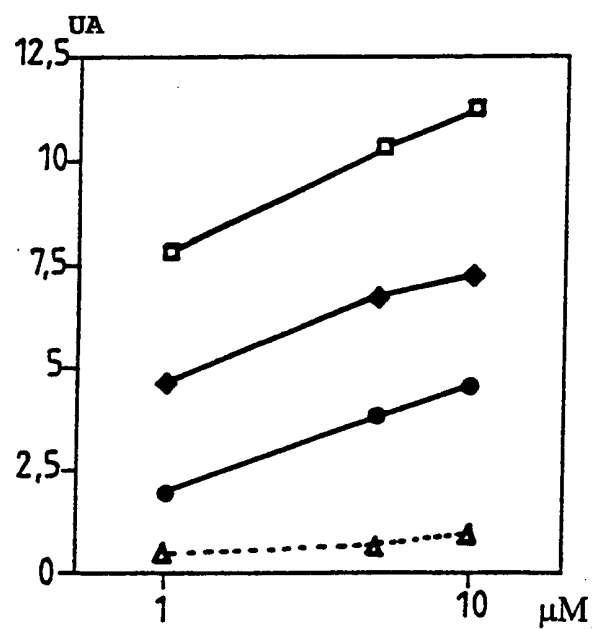
**FIG. 9**

10/14

FIG. 10



12/14

FIG. 12FIG. 13

13/14

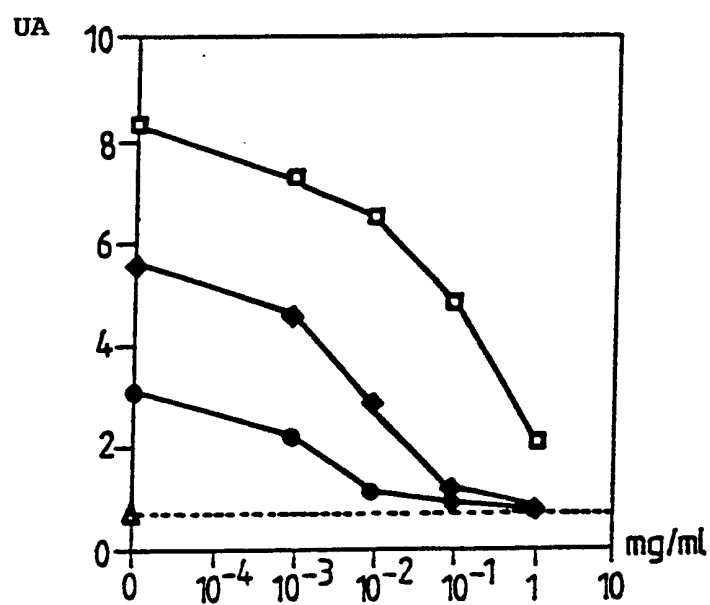


FIG. 14

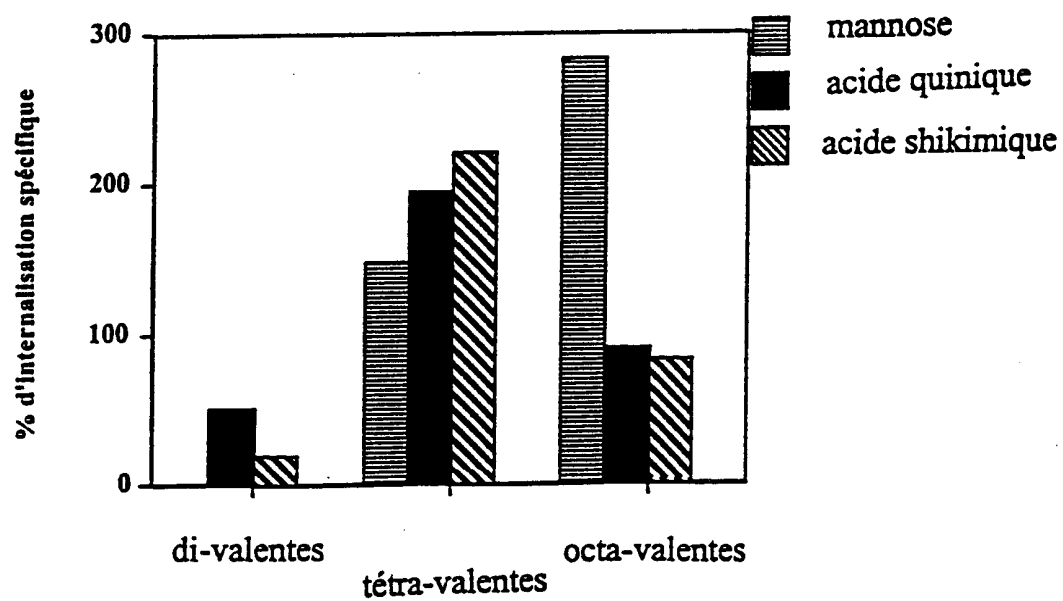
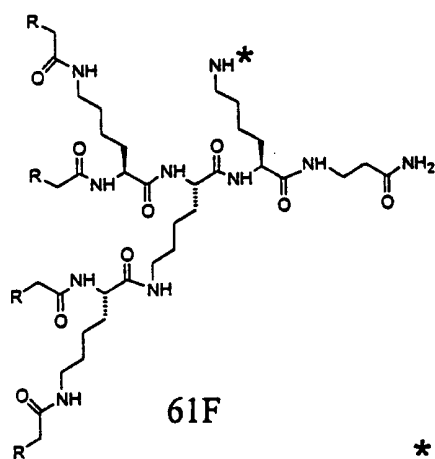
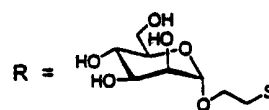
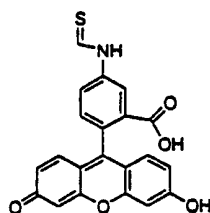
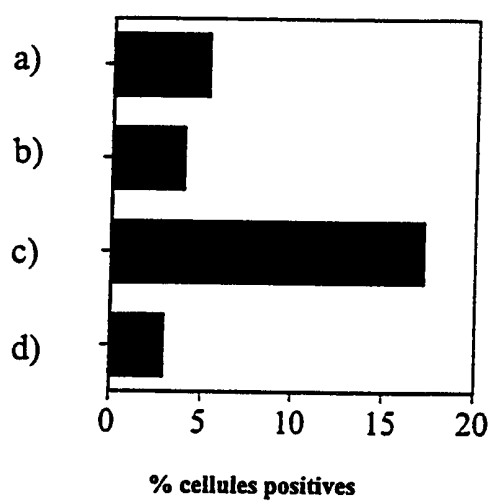


FIG. 15

14/14



* =

FIG. 16FIG. 17