(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
18 juin 2015 (18.06.2015)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2015/087017 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 31/724 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2014/053310

(22) Date de dépôt international :
12 décembre 2014 (12.12.2014)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
13 62633 13 décembre 2013 (13.12.2013) FR

(71) Déposant : **ROQUETTE FRERES** [FR/FR]; 1 rue de la Haute Loge, F-62136 Lestrem (FR).

(72) Inventeurs : **SALOME, Marc**; 28 chemin de Cayre, F-31320 Mervilla (FR). **WILS, Daniel**; 14 Lotissement Le Village, F-59190 Morbecque (FR). **PARISSAUX, Xavier**; 2 boulevard Pierre Guillain, Résidence des Alliés, Appart 13, F-62500 Saint Omer (FR). **MACH, François**; Rue Ferdinand Hodler 5, CH-1207 Genève (CH). **MONTECUCCO, Fabrizio**; 54 route de Florissant, CH-1206 Genève (CH).

(74) Mandataires : **GALLOIS, Valérie** et al.; Becker & Associes, 25 rue Louis Le Grand, F-75002 Paris (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

— *avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))*

(54) **Title** : COMPOSITIONS BASED ON METHYL CYCLODEXTRINS FOR THE TREATMENT AND/OR PREVENTION OF DISEASES BY INCREASING THE HDL CHOLESTEROL LEVEL

(54) **Titre** : COMPOSITIONS A BASE DE METHYL-CYCLODEXTRINES POUR LE TRAITEMENT ET/OU LA PREVENTION DE MALADIES PAR AUGMENTATION DU TAUX DE CHOLESTEROL-HDL

(57) **Abstract** : The invention relates to a novel use of a pharmaceutical composition comprising at least one methyl cyclodextrin having a degree of molar substitution (MS) of between 0.05 and 1.5 in the treatment and/or prevention of diseases that can be treated and/or prevented by an increase in the HDL cholesterol level. The invention also relates to the use thereof in the treatment and/or prevention of atherosclerosis or complications relating to an atheroma. The pharmaceutical compositions of the invention can also be used to stimulate a reduction in the level of circulating fatty acids and triglycerides and to reduce or prevent atheromatous plaques.

(57) **Abrégé** : La présente invention est relative à une nouvelle utilisation d'une composition pharmaceutique comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine présentant un degré de substitution molaire (MS) compris entre 0,05 et 1,5 dans le traitement et/ou la prévention de maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation du taux de cholestérol-HDL. Elle concerne également son utilisation dans le traitement et/ou la prévention de l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome. Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent également être utilisées pour favoriser en outre la diminution du taux de triglycérides et d'acides gras circulants et réduire ou prévenir les plaques d'athérome.

WO 2015/087017 A1

COMPOSITIONS A BASE DE METHYL-CYCLODEXTRINES POUR LE TRAITEMENT ET/OU LA PREVENTION DE MALADIES PAR AUGMENTATION DU TAUX DE CHOLESTEROL-HDL.

La présente invention est relative à des compositions pharmaceutiques permettant d'augmenter le taux de cholestérol-HDL chez un individu. La présente invention concerne plus spécifiquement l'utilisation d'une composition pharmaceutique dans le traitement et/ou la prévention de maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation du taux de cholestérol-HDL, ou dans le traitement et/ou la prévention de l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome.

ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE DE L'INVENTION

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols jouant un rôle central dans de nombreux processus biochimiques.

C'est un composant majeur des membranes cellulaires animales qui contribue à leur stabilité et au maintien de leur structure en s'intercalant entre les phospholipides. En effet, le cholestérol rigidifie la membrane en empêchant sa gélification car il évite la cristallisation des acides gras et diminue également la perméabilité membranaire aux molécules hydrosolubles. En s'intercalant dans les membranes, le cholestérol permet également la formation de radeaux lipidiques qui sont des zones essentielles à l'ancrage de protéines fonctionnelles.

Le métabolisme du cholestérol est également précurseur de nombreuses molécules comme par exemple les hormones stéroïdes (cortisol, cortisone et aldostérone), les hormones stéroïdes sexuelles (progestérone, œstrogènes et testostérone), la vitamine D3, l'hème A, les protéines prénylées ou farnésylées, l'ubiquinone ou coenzyme Q10, le dolichol, le facteur nucléaire NF kappa B, la protéine Tau et les sels biliaires.

Le cholestérol est véhiculé dans le sang par des systèmes de transport aux rôles très différents, à savoir les lipoprotéines LDL (lipoprotéines de petite densité) et les lipoprotéines HDL (lipoprotéines de haute densité).

Le HDL-cholestérol est considéré comme protecteur vis-à-vis des maladies cardiovasculaires et est fréquemment désigné comme « bon cholestérol ».

Les LDL transportant le cholestérol pénètrent dans la paroi artérielle puis sont captées par les monocytes et macrophages résidant dans cette paroi artérielle ainsi que par les cellules musculaires lisses. Il s'ensuit une charge excessive en lipides des macrophages et cellules musculaires lisses qui se transforment alors en cellules spumeuses à l'origine des processus d'athérosclérose et correspondant au premier stade de la formation de la plaque d'athérome. Il est alors question de « mauvais cholestérol ».

L'athérome est défini par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une "association de remaniement de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation focale de lipides, glucides complexes, de sang et de dépôts calcaire, avec remaniements de la média. L'athérome est à l'origine de la majorité des maladies cardiovasculaires et est la principale cause de morbidité et de mortalité des pays industrialisés. L'athérome débute par la formation d'une « strie lipidique », simple dépôt de graisse, linéaire et sans conséquence pour le flux, située entre endothélium et média de l'artère. Avec le temps, cette strie peut grossir, se charger en lipides, en fibrogène, en plaquettes et autres cellules sanguines et en calcium pour constituer la « plaque d'athérome ». Celle-ci devient plus ou moins importante et peut diminuer suffisamment le calibre de l'artère pour diminuer son débit.

Il existe deux types de complications : la première, d'évolution longue, est due à sa croissance lente, gênant de plus en plus le passage du sang jusqu'à l'empêcher totalement par obstruction. La seconde, rapide et responsable des complications aigües, consiste en la lésion ou la rupture de l'endothélium : la brèche formée est alors obstruée par une agrégation des plaquettes sanguines et la formation d'un caillot sanguin qui peut rapidement totalement obstruer le vaisseau. Ce caillot peut également se détacher et obstruer plus en aval. La plaque peut également se détacher partiellement et obstruer également l'artère, ou plus rarement, libérer son contenu et faire une embolie de cholestérol. Enfin, la dilatation de la paroi artérielle induite par l'augmentation de volume de la plaque peut aboutir à la formation d'un anévrisme, avec risque de rupture.

La classe pharmaceutique la plus employée pour prévenir l'athérome sont les statines, qui visent à réduire le taux de cholestérol-LDL et de lipides circulants, en complément d'un régime adapté. Cependant l'intérêt et l'utilité des statines sont depuis quelques temps vivement critiqués par certains chercheurs et cliniciens qui affirment que les statines, après analyse d'essais statistiques controversés car contradictoires, n'apportent pas aux patients le bénéfice thérapeutique escompté. A cette mise en cause s'ajoutent les effets secondaires néfastes, et même parfois dramatiques, qui ont été identifiés et ont conduit dans certains cas à un retrait du marché.

Les autres traitements médicamenteux proposés aujourd'hui sont :

- les antiagrégants plaquettaires comme l'aspirine ou le clopidogrel, censés diminuer la constitution de caillots à partir de la plaque d'athérome ;
- les médicaments antihypertenseurs tels que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

Les traitements pharmaceutiques qui existent à l'heure actuelle visent donc uniquement à diminuer les risques liés à l'athérome. Aucun des médicaments existant sur le marché ne s'attaque directement à la plaque d'athérome.

Lorsque le pronostic vital est en jeu, le traitement est chirurgical ou endovasculaire. Il vise à restaurer la lumière artérielle, à irriguer le territoire privé d'oxygène ou à supprimer l'anévrisme artériel. Parmi ces techniques, on peut citer l'angioplastie, la désobstruction par endartériectomie, le pontage.

Finalement, le principal moyen de lutte contre l'athérome et ses complications reste encore aujourd'hui d'ordre comportemental : arrêt du tabac, développement de l'activité physique, contrôle de la tension artérielle, correction d'une dyslipidémie, équilibre du diabète, régime.

Ainsi, force est de constater qu'il existe clairement et depuis longtemps, un besoin non satisfait de traitement et/ou de prévention de l'athérome.

Diverses approches ont pourtant été tentées, sans qu'aucune solution nouvelle n'ait pu être retenue. Le cholestérol-HDL en particulier a commencé à être étudié en 1975 lorsque des

chercheurs ont mis en évidence la relation entre des taux de cholestérol-HDL élevés et la diminution de l'incidence des maladies cardio-vasculaires (Rye K.A. 2013. High density lipoprotein structure, function, and metabolism: a new Thematic Series. *J. Lipid Res.* 54:(8) 2031-2033). Les résultats positifs de ces études ont encouragé le développement de traitements visant à augmenter les taux de cholestérol-HDL, parmi lesquelles on retiendra les inhibiteurs de l'enzyme CETP, (protéine de transfert des esters de cholestérol) qui ont été les tous premiers agents développés et évalués à grande échelle, spécifiquement dans ce but. Cependant aucun de ces traitements n'a permis de réduire la survenue des accidents cardiovasculaires.

Finalement, il n'existe toujours pas sur le marché de médicament capable d'induire efficacement une augmentation du taux de cholestérol-HDL chez le patient, notamment parce que les mécanismes impliqués sont aujourd'hui encore loin d'être élucidés. En particulier, il n'existe pas sur le marché de médicament capable de lutter efficacement et activement contre des maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation du taux de cholestérol-HDL. En outre, il existe un besoin constant de médicament capable de lutter contre l'athérosclérose, en particulier contre la formation de la plaque d'athérome.

RESUME DE L'INVENTION

Il est du mérite de la Demanderesse d'avoir découvert que des compositions pharmaceutiques à base de méthyl-cyclodextrine présentant un degré de substitution molaire particulier compris entre 0,05 et 1,5 permettent d'induire une augmentation du taux de cholestérol-HDL, en particulier du taux de cholestérol-HDL plasmatique, et sont donc extrêmement intéressantes pour le traitement ou la prévention de maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation du taux de cholestérol-HDL, notamment de l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome.

L'objet de la présente invention est donc de proposer une composition pharmaceutique comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,5 pour son utilisation dans le traitement et/ou la prévention de maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation du taux de cholestérol-HDL.

Un autre objet de la présente invention est de proposer une composition pharmaceutique comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,5 pour son utilisation dans le traitement et/ou la prévention de l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome.

Préférentiellement, les compositions de l'invention sont utilisées dans le traitement et/ou la prévention de l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome. Les complications liées à un athérome comprennent typiquement l'ischémie, par exemple l'ischémie du myocarde, les maladies coronariennes, l'angine de poitrine, le syndrome coronarien aigu, l'infarctus du myocarde, l'infarctus mésentérique, l'accident vasculaire-cérébral, l'anévrisme, ou l'artériopathie des membres inférieurs et leurs conséquences (conséquences liées à hypopoxie/ischémie, par exemple un diabète consécutif à athérosclérose).

La méthyl-cyclodextrine utilisée dans les compositions pharmaceutiques de l'invention présente préférentiellement un degré de substitution molaire compris entre 0,2 et 1,2, et encore plus préférentiellement compris entre 0,4 et 0,9. Avantageusement, le degré de substitution molaire est compris entre 0,6 et 0,8. Dans un mode de réalisation particulier, la méthyl-cyclodextrine est une méthyl-β-cyclodextrine. Dans un autre mode de réalisation particulier, la méthyl-cyclodextrine est substituée sur l'hydroxyle porté par le carbone C2 des unités glucopyranoses, ou par les carbones C3 et/ou C6 des unités glucopyranoses ou par une combinaison des carbones C2, C3 et/ou C6, de préférence C2 et C6 des unités glucopyranoses.

De préférence, les compositions de méthyl-cyclodextrines comprennent une ou plusieurs méthyl-β-cyclodextrines choisies parmi le groupe consistant en des méthyl-β-cyclodextrines substituées sur l'hydroxyle porté par le carbone C2 des unités glucopyranoses, des méthyl-β-cyclodextrines substituées sur l'hydroxyle porté par les carbones C3 et/ou C6 des unités glucopyranoses, des méthyl-β-cyclodextrines substituées sur l'hydroxyle porté par les carbones C2, C3 et/ou C6, de préférence C2 et C6 des unités glucopyranoses et lesdites méthyl-β-cyclodextrines présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,6 et 0,8.

Avantageusement, les compositions de méthyl-cyclodextrines comprennent au moins 50, 60, ou 75 % de méthyles substituées sur l'hydroxyle porté par le carbone C2 des unités glucopyranoses.

Facultativement, les compositions comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine comprennent également une cyclodextrine, en particulier β –cyclodextrine, non substituée et/ou une cyclodextrine, en particulier β –cyclodextrine, substituée par des groupes sulfobutyléther (SBE-) et hydroxypropyles (HP-), de préférence avec un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,5.

Les compositions pharmaceutiques utilisées dans le cadre de la présente invention peuvent comprendre en outre au moins un agent actif supplémentaire.
L'agent actif supplémentaire est préférentiellement un agent actif utilisé dans le traitement de l'athérosclérose ou des complications liés à un athérome, préférentiellement,

- une statine,
- un agent antiagrégant plaquettaire ou anticoagulant, de préférence sélectionné parmi l'aspirine, le clopidogrel, les nouveaux anticoagulants oraux comme le dabigatran, l'apixaban, le rivaroxaban, et les anti-vitamines K
- un agent antihypertenseur, de préférence sélectionné parmi les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine comme le perindopril, le captopril, l'enalapril, le lisinopril ou le ramipril, les antagonistes du récepteur à l'angiotensine II comme le losartan, le valsartan, ou le candesartan, et/ou parmi les bêta-bloquants comme l'acébutolol, le labétalol, le nadolol, l'oxprénolol, le penbutolol, le pindolol, ou le propranolol,
- ou une combinaison de ceux-ci.

De manière préférée, l'agent actif supplémentaire est un antagoniste du récepteur à l'angiotensine II, comme le losartan, le valsartan, ou le candesartan.
Les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont susceptibles d'être administrées par voie orale, par voie parentérale, ou par voie cutanée ou mucosale.

Dans un mode de réalisation particulier, les compositions de l'invention sont en outre utilisées pour favoriser une diminution du taux de triglycérides et d'acides gras circulants.

Dans un autre mode de réalisation particulier, les compositions de l'invention sont utilisées pour réduire ou prévenir les plaques d'athérome.

Encore dans un autre mode de réalisation particulier, les compositions utilisées dans l'invention sont exemptes ou substantiellement exemptes de vésicules de phospholipides.

Un objet supplémentaire de l'invention concerne l'utilisation non-thérapeutique d'une composition comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,50, de préférence compris entre 0,60 et 0,80, pour diminuer le taux de triglycérides et/ou pour diminuer la concentration d'acides gras libres et/ou pour augmenter le taux de cholestérol-HDL.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Les inventeurs ont identifié une nouvelle utilisation d'une composition pharmaceutique comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,5 dans le traitement et/ou la prévention de maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation du taux de cholestérol-HDL et/ou par une réduction ou prévention des plaques d'athérome.

En particulier, les inventeurs ont découvert de façon surprenante que la composition de l'invention avait pour effet d'augmenter le taux de cholestérol-HDL chez un individu, et en outre, de diminuer le taux de triglycérides et d'acides gras circulants et de réduire les plaques d'athérome. Les inventeurs ont ainsi démontré que la composition de l'invention grâce à ses différentes propriétés peut notamment être utilisée dans le traitement et/ou la prévention de maladies liées à une surcharge, et/ou à un stockage, et/ou à l'accumulation de cholestérol dans les tissus, ainsi que leurs conséquences. En particulier, ces maladies comprennent l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome.

L'invention concerne donc une composition pharmaceutique comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,5 pour son utilisation dans le traitement et/ou la prévention de maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation du taux de cholestérol-HDL, en particulier l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome. Elle concerne également une

composition pharmaceutique comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,5 pour son utilisation dans le traitement et/ou la prévention de maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par la réduction des plaques d'athérome ou par la prévention de la formation des plaques d'athéromes.

L'invention concerne aussi une composition pharmaceutique comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,5 pour son utilisation dans le traitement et/ou la prévention de l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome.

L'invention concerne aussi des méthodes ou des procédés mettant en œuvre une composition pharmaceutique comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine telle que définie dans la présente invention pour son administration dans une quantité thérapeutique efficace chez un individu souffrant d'une maladie susceptible d'être traitée et/ou prévenue par une augmentation du taux de cholestérol-HDL et/ou par une réduction ou prévention des plaques d'athérome, en particulier l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome.

L'invention concerne également l'utilisation d'une composition pharmaceutique comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine telle que définie dans la présente demande pour la préparation d'un médicament pour traiter et/ou prévenir des maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation de taux de cholestérol-HDL et/ou par une réduction ou prévention des plaques d'athérome, de préférence l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome.

Les méthyl-cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon. Les trois cyclodextrines naturelles les plus courantes se composent de 6, 7 ou 8 unités α-D-glucopyranose en configuration chaise reliées entre elles par des liaisons α-1,4. On les appelle plus couramment α, β, ou γ cyclodextrine, respectivement. Leur structure en trois dimensions apparaît sous la forme d'un cône tronqué à l'extérieur duquel se trouvent les groupements hydroxyles représentant la partie

hautement hydrophile des cyclodextrines. L'intérieur du cône ou la cavité des cyclodextrines est constitué par les atomes d'hydrogène portés par les carbones C_3 et C_5 ainsi que par les atomes d'oxygène participant à la liaison glycosidique, leur conférant ainsi un caractère apolaire. Les cyclodextrines présentant une partie extérieure hydrophile et une cavité hydrophobe sont généralement utilisées pour leur capacité à encapsuler les composés hydrophobes et, donc, pour leur rôle de protecteur et de solubilisant de substances actives hydrophobes. On les retrouve ainsi classiquement dans les domaines de l'agroalimentaire, mais aussi en galénique où elles sont utilisées comme excipient dans des formulations pharmaceutiques administrées par voie orale ou dans des formulations cosmétiques administrées par voie topique.

En vue d'améliorer la solubilité aqueuse des cyclodextrines naturelles, de nombreux dérivés ont été synthétisés par greffage de différents groupements sur les fonctions hydroxyles. Les unités glucopyranoses des cyclodextrines comprennent en effet chacune 3 groupements hydroxyles réactifs, qui sont portés par les carbones C2, C3 et C6.
On peut citer comme exemples de dérivés les hydroxypropyl-cyclodextrines, les méthyl-cyclodextrines et les dérivés « sulfatés » de cyclodextrine. Frömming et Szetli ont notamment montré dans le cas de méthyl-cyclodextrines que l'augmentation du degré de méthylation favorisait la solubilisation jusqu'à un degré de substitution molaire égal à 2, et qu'au-delà la solubilisation diminuait.

Certains auteurs se sont également intéressés aux cyclodextrines et à leurs dérivés autrement que par leur rôle d'excipient pharmaceutique.

Par exemple, la demande de brevet WO 02/43742 décrit le rôle de cyclodextrines ou d'hydroxypropyl-cyclodextrines dans le métabolisme du cholestérol, et notamment pour favoriser l'efflux du cholestérol des macrophages. Dans cette demande, les auteurs rappellent qu'il existe deux mécanismes d'actions des cyclodextrines. Les cyclodextrines de forte affinité pour le cholestérol agissent directement en complexant le cholestérol membranaire des macrophages. En revanche, les cyclodextrines de faible affinité pour le cholestérol agissent comme catalyseur de l'efflux du cholestérol, de la membrane cellulaire vers un accepteur extracellulaire qui est une vésicule de phospholipides. Dans ce dernier cas, l'efflux du cholestérol ne peut donc se faire qu'en présence d'un autre élément qui est une vésicule de phospholipides acceptrice exogène. Ainsi, si des effets pharmacologiques

sur le cholestérol sont évoqués dans l'art antérieur, l'intérêt thérapeutique des cyclodextrines demeure fort contestable.

En effet, les cyclodextrines de forte affinité, de par leur activité dans la complexation du cholestérol, auraient nécessité d'être administrées dans des quantités considérables, qui n'auraient pas été pharmaceutiquement acceptables et qui auraient engendré des problèmes de toxicité du fait de l'importante quantité de cholestérol solubilisée.

Quant aux cyclodextrines de faible affinité, la nécessité de les co-administrer avec des vésicules de phospholipides en fait une technologie bien trop complexe au vu des connaissances actuelles, notamment parce que les vésicules de phospholipides sont très instables.

L'utilisation des méthyl-cyclodextrines parmi d'autres agents actifs a été suggérée dans le traitement de l'athérosclérose (WO 2006/032905). Notamment, cette demande de brevet suggère que les méthyl-cyclodextrines sont capable d'inhiber les liaisons entre les LDL oxydées et les monocytes. L'utilisation des méthyl-β-cyclodextrines a été suggérée dans des méthodes pour moduler la réponse inflammatoire en altérant les niveaux plasmatiques de cholestérol (US 2008/0032925). La méthyl-β-cyclodextrine utilisée dans cette demande est une méthyl-β-cyclodextrine commercialisée par Sigma Aldrich et qui présente un degré de substitution molaire bien supérieur à 1,5.

Dans la présente invention, les inventeurs utilisent des compositions de cyclodextrines particulières agissant comme principe actif dans le but d'augmenter significativement le taux de cholestérol-HDL plasmatique tout en réduisant au maximum les inconvénients liés à la toxicité chez un patient. Les compositions de l'invention permettent d'écarter les problèmes de toxicité grâce à leur caractéristique particulière, à savoir, un degré de substitution, en particulier de méthylation, relativement faible ainsi qu'une faible affinité pour le cholestérol.

De façon surprenante, et en dépit de leur faible affinité pour le cholestérol, les méthyl-cyclodextrines, et en particulier les méthyl-β-cyclodextrines, utilisées conformément à la présente invention, ne nécessitent pas l'addition de vésicules de phospholipides pour exercer leur effet.

Les résultats obtenus par les inventeurs suggèrent un mode d'action différent pour ces méthyl-cyclodextrines particulières, qui ne passerait ni par la complexation du cholestérol, ni par la catalyse d'un transport vers des vésicules de phospholipides.

De façon tout à fait originale, ces méthyl-cyclodextrines semblent promouvoir l'efflux du cholestérol sous la forme de cholestérol-HDL, et non pas sous une forme complexée à des cyclodextrines, ou à des vésicules de phospholipides.

C'est pourquoi les compositions selon la présente invention sont exemptes ou substantiellement exemptes de vésicules de phospholipides. « Subtantiellement exemptes » signifie ici que les compositions comprennent moins de 10 % de phospholipides en poids par rapport à la composition, de préférence moins de 5 % en poids et de manière particulièrement préférée, moins de 2, 1 ou 0,5 % en poids. « Subtantiellement exemptes » peut également être défini par un rapport en concentration molaire entre la quantité de cyclodextrine et celle de phospholipides qui est supérieur à 100, 1 000, ou 10 000.

La présente invention concerne donc une nouvelle utilisation d'une composition pharmaceutique comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,5 dans le traitement et/ou la prévention de maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation du taux de cholestérol-HDL et/ou par une réduction ou prévention des plaques d'athérome.

L'invention concerne aussi une nouvelle utilisation d'une composition pharmaceutique comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,5 dans le traitement et/ou la prévention de l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome. On entend par « degré de substitution molaire (MS)» le nombre d'hydroxyles substitués, notamment par un groupement méthyle, par unité glucopyranose. A noter que le degré de substitution molaire (MS) est différent du degré de substitution moléculaire (DS) qui correspond au nombre d'hydroxyles substitués, notamment par un groupement méthyle, par molécule de cyclodextrine et qui tient donc compte du nombre d'unités glucopyranoses constituant la méthyl-cyclodextrine.

Le MS peut être déterminé dans la présente invention par Résonnance Magnétique Nucléaire du proton (RMN), ou par spectrométrie de masse (spectrométrie de masse par ionisation par électronébulisation (ESI-MS) ou spectrométrie de masse par désorption/ionisation par laser assisté par matrice (MALDI-MS)). Bien que ces techniques soient bien connues de l'homme du métier, des conditions optimales de détermination du MS des méthyl-cyclodextrines selon l'invention sont en particulier bien décrites dans la thèse de référence de JACQUET Romain. « Cyclodextrines hydrophiles : caractérisation et étude de leurs propriétés énantiosélective et complexante. Utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse ». Thèse de Chimie et physicochimie des composés d'intérêt biologique. Université d'Orléans, 2006. notamment disponible sur : http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/18/55/42/PDF/jacquet.pdf (consulté le 27.11.2013). », en particulier Chapitre 2, Partie B (pages 59 à 83).

De préférence, le MS est déterminé par RMN, selon la méthode suivante : les mesures sont conduites à 25°C sur un appareil de type DPX 250 MHz Advance (Bruker, Rheinstetten, Allemagne). La calibration est effectuée avec le signal D_2O. Les échantillons de méthyl-cyclodextrine conforme à l'invention, et de cyclodextrine native, c'est-à-dire non méthylée, sont préparés à une concentration de 5 mg dans 0,75 mL de D_2O. Les solutions sont évaporées à sec sous courant d'azote puis reconstituées dans 0,75 mL de D_2O. Cette opération est répétée deux fois afin d'assurer un échange total des protons des fonctions hydroxyle. Le MS est calculé à partir de la différence d'intégration entre le spectre de la cyclodextrine native et celui de la méthyl-cyclodextrine conforme à l'invention. Un spectre typique est montré dans la Figure 1.

Il est à noter que la méthyl-cyclodextrine utilisée conformément à l'invention, bien que pouvant correspondre à un produit pur, correspond généralement à un mélange de méthyl-cyclodextrines de structures différentes. C'est le cas par exemple du produit commercialisé par la Demanderesse sous la dénomination KLEPTOSE ® CRYSMEB, qui présente notamment les propriétés physico-chimiques telles que déterminées dans la thèse de JACQUET Romain précitée, en particulier au chapitre 2, partie B (pages 59 à 83).

Il en résulte que le MS mesuré est dans ce cas une moyenne des substitutions qui s'opèrent sur l'ensemble des unités glucopyranoses de l'ensemble du mélange de méthyl-cyclodextrines.

Ce mélange peut notamment contenir de la cyclodextrine native résiduelle, c'est-à-dire non méthylée, mais qui se trouvent généralement en quantités négligeables, en particulier inférieures à 1% en poids sec par rapport au poids sec total de la méthyl-cyclodextrine, préférentiellement inférieur à 0,5%, préférentiellement encore inférieur à 0,1%.

Dans le contexte de l'invention, les compositions comprennent au moins une méthyl-cyclodextrine présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,5. Avantageusement, la méthyl-cyclodextrine a un MS compris entre 0,1 et 1,4, préférentiellement entre 0,1 et 1,3, préférentiellement entre 0,2 et 1,2, préférentiellement entre 0,3 et 1,1, préférentiellement entre 0,3 et 1, préférentiellement entre 0,5 et 0,9, préférentiellement entre 0,6 et 0,8, par exemple 0,7, notamment 0,67. Par exemple, la méthyl-cyclodextrine peut avoir un MS compris entre 0,10 et 1,40, entre 0,10 et 1,30, entre 0,10 et 1,20, entre 0,15 et 1,40, entre 0,15 et 1,30, entre 0,15 et 1,20, entre 0,20 et 1,40, entre 0,20 et 1,30, entre 0,20 et 1,20, entre 0,20 et 1,10, entre 0,25 et 1,40, entre 0,25 et 1,30, entre 0,25 et 1,20, entre 0,25 et 1,10, entre 0,15 et 0,90, entre 0,15 et 0,80, entre 0,25 et 1,00, entre 0,25 et 0,90, entre 0,25 et 0,80, entre 0,30 et 1,40, entre 0,30 et 1,30, entre 0,30 et 1,20, entre 0,30 et 1,00, entre 0,50 et 0,90, entre 0,60 et 0,80.

Préférentiellement, au moins 50% des groupements méthyles de la méthyl-cyclodextrine utilisée dans le cadre de la présente invention sont situés au niveau de l'hydroxyle porté par le carbone C2 de l'unité glucopyranose, préférentiellement entre 60 et 80%, typiquement de l'ordre de 75%.

Parallèlement, les autres groupements méthyles sont généralement majoritairement situés au niveau de l'hydroxyle porté par le carbone C3 et/ou C6 de l'unité glucopyranose.

L'homme du métier sait comment déterminer la répartition des groupements méthyles sur les hydroxyles de l'unité glucopyranose de la méthyl-cyclodextrine par exemple par RMN.

Avantageusement, la méthyl-cyclodextrine utilisée dans le cadre de la présente invention comporte 7 unités α-D-glucopyranose. Il s'agit donc d'une méthyl-β-cyclodextrine.

Dans un mode de réalisation particulier, la méthyl-cyclodextrine est une méthyl-β-cyclodextrine et a un MS compris entre 0,05 et 1,5, préférentiellement compris entre 0,1 et

1,4, préférentiellement entre 0,1 et 1,3, préférentiellement entre 0,2 et 1,2, préférentiellement entre 0,3 et 1,1, préférentiellement entre 0,4 et 1, préférentiellement entre 0,5 et 0,9, préférentiellement entre 0,6 et 0,8, par exemple 0,7, notamment 0,67. Par exemple, la méthyl-cyclodextrine peut avoir un MS compris entre 0,10 et 1,40, entre 0,10 et 1,30, entre 0,10 et 1,20, entre 0,15 et 1,40, entre 0,15 et 1,30, entre 0,15 et 1,20, entre 0,20 et 1,40, entre 0,20 et 1,30, entre 0,20 et 1,20, entre 0,20 et 1,10, entre 0,25 et 1,40, entre 0,25 et 1,30, entre 0,25 et 1,20, entre 0,25 et 1,10, entre 0,25 et 1,00, entre 0,25 et 0,90, entre 0,25 et 0,80, entre 0,30 et 1,40, entre 0,30 et 1,30, entre 0,30 et 1,20, entre 0,30 et 1,00, entre 0,50 et 0,90, entre 0,60 et 0,80.

La méthyl-cyclodextrine peut être substituée sur l'hydroxyle porté par le carbone C2 des unités glucopyranoses, ou par les carbones C3 et/ou C6 des unités glucopyranoses, ou par une combinaison des carbones C2, C3 et/ou C6, de préférence C2 et C6 des unités glucopyranoses.

Dans un autre mode de réalisation particulier, la méthyl-cyclodextrine est une méthyl-cyclodextrine, de préférence une méthyl-β-cyclodextrine, dont au moins 50% des groupements méthyle sont situés au niveau de l'hydroxyle porté par le carbone C2 de l'unité glucopyranose, préférentiellement entre 60 et 80%, typiquement de l'ordre de 75%, et a un MS compris entre 0,05 et 1,5, préférentiellement compris entre 0,1 et 1,4, préférentiellement entre 0,1 et 1,3, préférentiellement entre 0,2 et 1,2, préférentiellement entre 0,3 et 1,1, préférentiellement entre 0,4 et 1, préférentiellement entre 0,5 et 0,9, préférentiellement entre 0,6 et 0,8, par exemple 0,7, notamment 0,67. Par exemple, la méthyl-cyclodextrine peut avoir un MS compris entre 0,10 et 1,40, entre 0,10 et 1,30, entre 0,10 et 1,20, entre 0,15 et 1,40, entre 0,15 et 1,30, entre 0,15 et 1,20, entre 0,20 et 1,40, entre 0,20 et 1,30, entre 0,20 et 1,20, entre 0,20 et 1,10, entre 0,25 et 1,40, entre 0,25 et 1,30, entre 0,25 et 1,20, entre 0,25 et 1,10, entre 0,25 et 1,00, entre 0,25 et 0,90, entre 0,25 et 0,80, entre 0,30 et 1,40, entre 0,30 et 1,30, entre 0,30 et 1,20, entre 0,30 et 1,00, entre 0,50 et 0,90, entre 0,60 et 0,80.

Dans un mode de réalisation préféré, la composition de méthyl-cyclodextrines comprend une ou plusieurs méthyl- β-cyclodextrines choisies parmi le groupe consistant en des méthyl-β-cyclodextrines substituées sur l'hydroxyle porté par le carbone C2 des unités glucopyranoses, des méthyl-β-cyclodextrines substituées sur l'hydroxyle porté par le

carbone C3 et/ou C6 des unités glucopyranoses, des méthyl-β-cyclodextrines substituées sur l'hydroxyle porté par les carbones C2, C3 et/ou C6, de préférence C2 et C6 des unités glucopyranoses et ayant un MS compris entre 0,05 et 1,5, préférentiellement compris entre 0,1 et 1,4, préférentiellement entre 0,1 et 1,3, préférentiellement entre 0,2 et 1,2, préférentiellement entre 0,3 et 1,1, préférentiellement entre 0,4 et 1, préférentiellement entre 0,5 et 0,9, préférentiellement entre 0,6 et 0,8, par exemple 0,7, notamment 0,67. Par exemple, la méthyl-cyclodextrine peut avoir un MS compris entre 0,10 et 1,40, entre 0,10 et 1,30, entre 0,10 et 1,20, entre 0,15 et 1,40, entre 0,15 et 1,30, entre 0,15 et 1,20, entre 0,20 et 1,40, entre 0,20 et 1,30, entre 0,20 et 1,20, entre 0,20 et 1,10, entre 0,25 et 1,40, entre 0,25 et 1,30, entre 0,25 et 1,20, entre 0,25 et 1,10, entre 0,25 et 1,00, entre 0,25 et 0,90, entre 0,25 et 0,80, entre 0,30 et 1,40, entre 0,30 et 1,30, entre 0,30 et 1,20, entre 0,30 et 1,00, entre 0,50 et 0,90, entre 0,60 et 0,80.De préférence, la composition de méthyl-cyclodextrines comprend au moins 50, 60, ou 75 % de méthyles substituées sur l'hydroxyle porté par le carbone C2 des unités glucopyranoses.

Comme évoqué précédemment, la méthyl-cyclodextrine selon l'invention peut être un mélange. L'analyse par spectrométrie de masse du produit KLEPTOSE® CRYSMEB, qui est une méthyl-β-cyclodextrine, révèle en particulier qu'il s'agit d'un produit polydisperse, comprenant sept groupes de méthyl-cyclodextrines majoritaires, qui se distinguent par leur DS. Ce DS, qui en théorie peut varier de 0 à 21 pour une méthyl-β-cyclodextrine, varie de 2 à 8 dans le produit KLEPTOSE® CRYSMEB.

Avantageusement, les compositions de l'invention comprennent un mélange de méthyl-cyclodextrines comprenant au moins 50, 60, 70, 80 ou 90% de méthyl-cyclodextrines présentant un MS compris entre 0,2 et 1,2. De préférence au moins 40, 50, 60, 70, 80 ou 90% de méthyl-cyclodextrines présentent un MS compris entre 0,3 et 1,1. De préférence au moins 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90% de méthyl-cyclodextrines présentent un MS compris entre 0,5 et 0,9. Encore plus préférentiellement, au moins 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90% de méthyl-cyclodextrines présentent un MS compris entre 0,6 et 0,8.

Les compositions de méthyl-cyclodextrines peuvent être éventuellement préparées en ajoutant différentes méthyl-cyclodextrines présentant des MS définis pour obtenir des compositions telles que définies dans la présente invention ou elles peuvent être obtenues comme résultat de la synthèse de celles-ci.

Ainsi dans un autre mode de réalisation particulier, la composition de méthyl-cyclodextrines, de préférence de méthyl-β-cyclodextrines, présente le profil de substitution, exprimée en pourcentages molaires, suivant :

- 0 à 5 % de méthyl-β-cyclodextrines comprennent 2 groupements méthyles (DS de 2) ;
- 5 à 15 % de méthyl-β-cyclodextrines comprennent 3 groupements méthyles (DS de 3) ;
- 20 à 25 % de méthyl-β-cyclodextrines comprennent 4 groupements méthyles (DS de 4) ;
- 25 à 40 % de méthyl-β-cyclodextrines comprennent 5 groupements méthyles (DS de 5) ;
- 15 à 25 % de méthyl-β-cyclodextrines comprennent 6 groupements méthyles (DS de 6) ;
- 5 à 15 % de méthyl-β-cyclodextrines comprennent 7 groupements méthyles (DS de 7) ;
- 0 à 5 % de méthyl-β-cyclodextrines comprennent 8 groupements méthyles (DS de 8) ;

la somme totale étant généralement de l'ordre de 100%, bien que la composition puisse contenir éventuellement des traces de méthyl-cyclodextrines de DS différent, ainsi que des traces de cyclodextrine native, c'est-à-dire non méthylée.

Le profil de substitution peut être déterminé par toute technique bien connue de l'homme du métier, par exemple par ESI-SM ou MALDI-TOF-SM. Les conditions optimales de détermination du profil de substitution par ces deux méthodes sont notamment largement discutées dans la thèse de Romain JACQUET précitée, au chapitre 2, partie B, points II.3 et II.2 (page 67 à 82) et à l'Annexe II.

Dans un mode de réalisation préféré, la composition de méthyl-cyclodextrines, de préférence de méthyl-β-cyclodextrines, est telle qu'au moins 50% des groupements méthyles sont situés au niveau de l'hydroxyle porté par le carbone C2 des unités glucopyranoses, préférentiellement entre 60 et 80%, typiquement de l'ordre de 75%, et qui présente le profil de substitution, exprimé en pourcentages molaires, suivant :

- 0 à 5 % de méthyl-β-cyclodextrines comprennent 2 groupements méthyles (DS de 2) ;
- 5 à 15 % de méthyl-β-cyclodextrines comprennent 3 groupements méthyles (DS de 3) ;
- 20 à 25 % de méthyl-β-cyclodextrines comprennent 4 groupements méthyles (DS de 4) ;
- 25 à 40 % de méthyl-β-cyclodextrines comprennent 5 groupements méthyles (DS de 5) ;
- 15 à 25 % de méthyl-β-cyclodextrines comprennent 6 groupements méthyles (DS de 6) ;
- 5 à 15 % de méthyl-β-cyclodextrines comprennent 7 groupements méthyles (DS de 7) ;
- 0 à 5 % de méthyl-β-cyclodextrines comprennent 8 groupements méthyles (DS de 8) ;

la somme totale étant généralement de l'ordre de 100%, bien que la composition puisse contenir éventuellement des traces de méthyl-cyclodextrines de DS différent, ainsi que des traces de cyclodextrine native, c'est-à-dire non méthylée.

Il est par ailleurs tout à fait possible d'envisager de faire varier en proportions ou d'isoler des molécules ou groupes de molécules de méthyl-cyclodextrines, notamment en fonction de leur DS.

Ainsi, dans un autre mode de réalisation particulier, la méthyl-cyclodextrine est une méthyl-β-cyclodextrine qui présente un DS choisi parmi un nombre entier allant de 2 à 8, en particulier 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8.

Dans un autre mode de réalisation préféré, la méthyl-cyclodextrine est une méthyl-β-cyclodextrine dont au moins 50% des groupements méthyles sont situés au niveau de l'hydroxyle porté par le carbone C2 des unités glucopyranoses, préférentiellement entre 60 et 80%, typiquement de l'ordre de 75%, et qui présente un DS choisi parmi un nombre entier allant de 2 à 8, en particulier 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8.

Dans un autre mode de réalisation particulier, la méthyl-cyclodextrine, en particulier la méthyl-β-cyclodextrine, a un MS compris entre 0,1 et 0,3, en particulier entre 0,2 et 0,3,

notamment entre 0,20 et 0,30. Dans un autre mode de réalisation particulier, la méthyl-cyclodextrine, en particulier la méthyl-β-cyclodextrine, a un MS compris entre 0,3 et 0,5 notamment entre 0,30 et 0,50. Dans un autre mode de réalisation particulier, la méthyl-cyclodextrine, en particulier la méthyl-β-cyclodextrine, a un MS compris entre 0,5 et 0,6 notamment entre 0,50 et 0,60. Dans un autre mode de réalisation particulier, la méthyl-cyclodextrine, en particulier la méthyl-β-cyclodextrine, a un MS compris entre 0,6 et 0,7 notamment entre 0,60 et 0,70. Dans un autre mode de réalisation particulier, la méthyl-cyclodextrine, en particulier la méthyl-β-cyclodextrine, a un MS compris entre 0,7 et 0,8 notamment entre 0,70 et 0,80. Dans un autre mode de réalisation particulier, la méthyl-cyclodextrine, en particulier la méthyl-β-cyclodextrine, a un MS compris entre 0,8 et 0,9 notamment entre 0,80 et 0,90. Dans un autre mode de réalisation particulier, la méthyl-cyclodextrine, en particulier la méthyl-β-cyclodextrine, a un MS compris entre 0,9 et 1,1 notamment entre 0,90 et 1,10. Dans un autre mode de réalisation particulier, la méthyl-cyclodextrine, en particulier la méthyl-β-cyclodextrine, a un MS compris entre 1,1 et 1,2 notamment entre 1,10 et 1,20.

Généralement, la méthyl-cyclodextrine utilisée conformément à l'invention présente un taux de sucres réducteurs inférieur à 1% en poids sec, préférentiellement inférieur à 0,5%.

La composition de méthyl-β-cyclodextrines selon l'invention peut être obtenue par le procédé décrit dans le brevet US 6,602,860 B1. Un exemple d'une telle composition est commercialisé par le groupe ROQUETTE FRERES sous la dénomination commerciale KLEPTOSE® CRYSMEB et présente un degré de substitution molaire de 0,7 ou plus précisément de 0,67 méthyles par unité de glucose.

Facultativement, la composition selon la présente invention peut comprendre en outre une cyclodextrine, en particulier β–cyclodextrine, non substituée et/ou une cyclodextrine, en particulier β–cyclodextrine, substituée par des groupes sulfobutyléther (SBE-), hydroxyéthyles, hydroxypropyles (HP-), carboxyméthyles, carboxyéthyles, acétyles, triacétyles, succinyles, éthyles, propyles, butyles, sulfates, de préférence sulfobutyles et hydroxypropyles, de préférence avec un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,5.

Facultativement, la méthyl-cyclodextrine selon l'invention, en particulier la méthyl-β–cyclodextrine, peut être substituée par des groupes additionnels, notamment choisis parmi ceux énumérés avant. Il pourra donc par exemple s'agir d'une méthyl- β–cyclodextrine sulfatée.

Dans un mode de réalisation distinct, la présente invention considère également l'utilisation pour le traitement des maladies selon la présente invention d'autres dérivés de cyclodextrines, de préférence de β–cyclodextrine, présentant un degré de substitution molaire conforme à la présente invention, c'est-à-dire compris entre 0,05 et 1,5, préférentiellement compris entre 0,1 et 1,4, préférentiellement entre 0,1 et 1,3, préférentiellement entre 0,2 et 1,2, préférentiellement entre 0,3 et 1,1, préférentiellement entre 0,4 et 1, préférentiellement entre 0,5 et 0,9, préférentiellement entre 0,6 et 0,8, par exemple 0,7. Ces dérivés de cyclodextrine, de préférence de β–cyclodextrine, sont substitués par un groupe choisi parmi les sulfobutyléthers (SBE-) et les hydroxypropyles (HP-). De préférence, ces substitutions sont majoritairement portées par le carbone C2 des unités glucopyranoses, typiquement à 50 %, 60 %, 70% ou 80 %.

Dans un mode alternatif de l'invention, les méthyl-cyclodextrines telles que définies dans la présente demande et composées d'unités α-D-glucopyranoses reliées entre elles par des liaisons α-1,4 peuvent être substituées en partie ou totalité par des unités α-D-glucopyranoses reliées entre elles par des liaisons α-1,6, dans les compositions pharmaceutiques de la présente invention.

Application

Dans le contexte de la présente invention, les compositions pharmaceutiques comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine telle que définie dans la présente demande sont utilisées dans le traitement et/ou la prévention de maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation du taux de cholestérol-HDL et/ou par une réduction ou prévention des plaques d'athérome, en particulier de l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome.

Dans le contexte de la présente invention, l'augmentation du taux de cholestérol-HDL est mesurée dans tout type de fluide biologique. Il s'agit préférentiellement du taux de

cholestérol-HDL plasmatique. Ce taux de cholestérol-HDL peut être mesuré par toute méthode connue de l'homme du métier, par exemple par précipitation, ou par des méthodes directes en phase homogène utilisant des techniques immunologiques. Un dosage de la partie protéique (protéine Apo A1) composant les HDL est également possible.

Le taux de cholestérol-HDL est généralement exprimé en nombre de moles de cholestérol transporté par les lipoprotéines de haute densité (HDL) par litre de sang. Le cholestérol-HDL est apparenté au « bon cholestérol » au contraire du cholestérol transporté par les LDL.

Selon l'invention, les maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation du taux de cholestérol-HDL sont toutes les maladies dont les symptômes et/ou les causes disparaissent ou sont atténués chez un patient lorsque le taux de cholestérol-HDL est supérieur au taux de cholestérol-HDL avant traitement. De préférence, les maladies sont celles susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation du taux de cholestérol-HDL. Par « augmentation », peut être entendue une augmentation du taux de cholestérol-HDL d'au moins 5, 7,5, 10, 15 ou 20 %.

Les maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation du taux de cholestérol-HDL sont préférentiellement les maladies liées à une surcharge, et/ou à un stockage, et/ou à l'accumulation de cholestérol dans les tissus, ainsi que leurs conséquences.

Comme exemples de maladies susceptibles d'être liées à une surcharge, et/ou à un stockage, et/ou à l'accumulation de cholestérol dans les tissus, on peut citer les maladies cardiovasculaires, les maladies vasculaires, les maladies artérielles périphériques occlusives telles que l'athérosclérose ou les complications liées à un athérome.

Par ailleurs, la présente invention concerne également les maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une réduction ou prévention des plaques d'athérome. Par réduction des plaques d'athérome est entendu de préférence que les plaques présentent une surface plus faible en présence du traitement qu'en absence de celui-ci. Notamment, la réduction de la surface des plaques de 10, 20, 30, 40 ou 50 %. De préférence, cette

réduction est d'au moins 30 ou 40 %. La surface des plaques d'athérome peut être déterminée par toute méthode connue de l'homme du métier et notamment les méthodes d'imagerie médicales telles que l'IRM (Imagerie par Résonnance Magnétique). Par prévention des plaques d'athérome, on entend un ralentissement du développement ou de la formation de ces plaques.

Les maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une réduction ou prévention des plaques d'athérome, sont en particulier les maladies cardiovasculaires, les maladies vasculaires, et préférentiellement les maladies artérielles périphériques occlusives telles que l'athérosclérose ou les complications liées à un athérome.

Selon l'invention, les maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues sont préférentiellement l'athérosclérose ou les complications liées à un athérome.

Les complications liées à un athérome qui sont traitées et/ou prévenues par l'utilisation d'une composition pharmaceutique comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine de l'invention sont de manière non limitative l'ischémie, par exemple l'ischémie du myocarde, les maladies coronariennes, l'angine de poitrine, le syndrome coronarien aigu, l'infarctus du myocarde, l'infarctus mésentérique, l'accident vasculaire-cérébral, l'anévrisme ou l'artériopathie des membres inférieurs.

Dans un autre mode de réalisation particulier, les compositions de l'invention utilisées comprennent en outre au moins un agent actif supplémentaire. L'agent actif supplémentaire est préférentiellement choisi dans le groupe des agents actifs connus par l'homme du métier pour traiter et/ou prévenir l'athérosclérose ou les complications liées à un athérome.

Les sujets à traiter sont de préférence des humains ou des animaux, de préférence des humains. Ils peuvent avoir une maladie avérée (diagnostiquée ou établie) ou être à risque de développer cette maladie. Notamment, la présente invention entend par « traitement » une diminution des causes ou symptômes d'une maladie, le retard dans l'apparition de la maladie, un ralentissement du développement de celle-ci mais également une guérison.

Comme exemples d'actifs utilisés dans le traitement de l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome, on peut citer :

- les statines ;
- les agents anti-hypertenseurs, en particulier :
  - o les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, par exemple le perindopril, le captopril, l'enalapril, le lisinopril, ou le ramipril ;
  - o les antagonistes du récepteur à l'angiotensine II, aussi connus sous le nom de « sartans », tels que le losartan, le valsartan, le candesartan ;
  - o les beta-bloquants, tels que l'acébutolol, le labétalol, le nadolol, l'oxprénolol, le penbutolol, le pindolol, le propranolol ;
- les antiagrégants plaquettaires ou anticoagulants, en particulier :
  - o l'asipirine ;
  - o le clopidogrel (PLAVIX®) ;
  - o nouveaux anticoagulants oraux tels que le dabigatran/Pradaxa®, l' apixaban/Eliquis®, le rivaroxaban/Xarelto®, indiqués dans la prévention des phlébites, des embolies ou des accidents vasculaires cérébraux dans l'indication fibrillation auriculaire ;
  - o anti-vitamines K, très efficaces mais peu utilisés aujourd'hui car nécessitent une surveillance très étroite de la coagulation.

De préférence, l'agent actif supplémentaire sera préférentiellement choisi parmi les antagonistes du récepteur à l'angiotensine II.

Les compositions selon la présente invention sont susceptibles d'être administrées par voie orale, parentérale, mucosale ou cutanée. La voie parentérale comprend préférentiellement l'administration sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire ou intrapéritonéale, bien que cette dernière soit plutôt réservée à l'animal. La voie mucosale comprend préférentiellement l'administration par voie nasale, par voie pulmonaire, par la muqueuse rectale. La voie cutanée comprend avantageusement la voie dermique, notamment via un dispositif transdermique, typiquement un patch.

Les compositions selon la présente invention comprennent également un excipient pharmaceutiquement acceptable. On peut utiliser tout excipient adapté pour les formes galéniques connues de l'homme du métier en particulier en vue d'une administration systémique, préférentiellement en vue d'une administration orale d'une administration

parentérale, d'une administration cutanée ou mucosale, notamment par voie sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intrapéritonéale, nasale, pulmonaire, rectale, dermique, intrathécale ou rachidienne.

On peut citer par exemple des solutions salines, physiologiques, isotoniques, tamponnées, etc., compatibles avec un usage pharmaceutique et connues de l'homme du métier. Les compositions peuvent contenir un ou plusieurs agents ou véhicules choisis parmi les dispersants, solubilisants, stabilisants, conservateurs, etc. Des agents ou véhicules utilisables dans des formulations (liquides et/ou injectables) sont notamment la méthylcellulose, l'hydroxyméthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, le polysorbate 80, le mannitol, la gélatine, le lactose, des huiles végétales, l'acacia, les liposomes, etc. Les compositions peuvent être formulées sous forme de suspensions injectables, gels, huiles, comprimés, suppositoires, poudres, gélules, capsules, aérosols, etc., éventuellement au moyen de formes galéniques ou de dispositifs assurant une libération prolongée et/ou retardée. Pour ce type de formulation, on utilise avantageusement un agent tel que la cellulose, des carbonates ou des amidons.

On peut avantageusement imaginer une forme galénique dans laquelle la cyclodextrine selon l'invention est administrée sous une forme complexée à une substance lipidique, de façon à permettre son passage dans la circulation sanguine après administration par des voies non invasives, et/ou dans le cas où le passage de la barrière-hémato-encéphalique est souhaité, pour permettre le passage de cette barrière. Parmi ces substances lipidiques, on peut notamment citer le tocophérol.

Les compositions susceptibles d'être administrées chez un individu dans le cadre de l'invention comprennent entre 1 et 100 mg/kg, préférentiellement entre 20 et 70 mg/kg, encore plus préférentiellement entre 30 et 50 mg/kg, et d'une manière encore plus préférée 40 mg/kg de méthyl-cyclodextrine telle que définie dans la présente invention, par rapport au poids total de l'individu. Bien entendu, l'homme du métier est en mesure d'adapter la dose de méthyl-cyclodextrine définie dans la présente demande en fonction du poids de l'individu à traiter.

Avantageusement, les compositions sont donc susceptibles d'être administrées dans une quantité thérapeutique efficace chez un individu souffrant d'une maladie susceptible d'être

traitée et/ou prévenue par une augmentation du taux de cholestérol-HDL, ou chez un individu prédisposé à développer une telle maladie. On entend par quantité thérapeutique efficace, une quantité de composition suffisante susceptible d'être administrée chez un individu pour prévenir et/ou traiter une maladie telle que définie dans la présente invention.

Les compositions utilisées dans l'invention peuvent être administrées selon des modalités variables. En particulier, elles peuvent être injectées une à cinq fois par semaines pendant 1, 2, 3, 4 semaines, voire 1, 2, 3 ou plusieurs mois. Les modalités d'administration incluent également les traitements à intervalles espacés de plusieurs semaines ou de plusieurs mois. Pour le traitement et/ou la prévention de l'athérosclérose en particulier, on envisagera avantageusement une administration à intervalle de 3 à 6 mois, pouvant aller jusqu'à 12 mois, d'une durée d'une semaine.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation des compositions pharmaceutiques telles que définies dans la présente demande pour favoriser en outre une diminution du taux de triglycérides et d'acides gras circulants.

Un objet supplémentaire de l'invention concerne l'utilisation des compositions pharmaceutiques telles que définies dans la présente demande pour réduire les plaques d'athérome.

L'utilisation des compositions de l'invention permettent à la fois d'augmenter le taux de cholestérol-HDL, de diminuer les taux de triglycérides et d'acides gras circulant dans le sang et de réduire les plaques d'athérome. La composition de l'invention permet également d'induire une diminution des MMP-9 responsables de la fragilisation des plaques d'athérome, et donc des complications liées à l'athérome. Tous ces effets sont obtenus sans modification du taux de cholestérol-LDL, et sans qu'aucune toxicité n'ait été relevée. La diminution des MMP-9 suggère par ailleurs l'intérêt de la composition selon l'invention pour une utilisation dans le traitement et/ou la prévention du cancer.

Les compositions telles que définies dans la présente demande présentent également un intérêt chez les sujets sains. Les compositions de l'invention permettent notamment de réduire le taux de triglycérides et la concentration d'acides gras libres et d'augmenter le taux de bon cholestérol (Cholestérol-HDL) favorisant ainsi la bonne santé du sujet. C'est

pourquoi la présente invention est également relative à une utilisation non-thérapeutique des compositions de méthyl-cyclodextrines telles que définies précédemment dans la présente demande pour réduire le taux de triglycérides et/ou pour réduire la concentration d'acides gras libres et/ou pour augmenter le taux de bon cholestérol (Cholestérol-HDL). Ainsi, la composition de méthyl-cyclodextrines selon la présente invention peut être utilisée en tant que composition nutraceutique, alicament, aliment fonctionnel ou complément alimentaire. Par composition nutraceutique, alicament, aliment fonctionnel, on entend ici un aliment qui contient des ingrédients ayant des effets bénéfiques pour la santé ou capables d'améliorer les fonctions physiologiques. Par complément alimentaire, on entend une denrée ayant pour but de compléter le régime alimentaire normal.

Les sujets normaux ou sains les plus propices à tirer bénéfice de ces compositions sont des individus ayant 40 ans ou plus, de préférence 50 ans ou plus, et par exemple ayant entre 50 et 70 ans. Ces sujets ne souffrent d'aucune pathologie.

La composition est destinée à l'alimentation humaine peut prendre toute forme, et notamment être un liquide, une pâte ou un solide. Notamment, la composition peut être un produit laitier tel que du fromage, du beurre, un yaourt ou une crème, un produit à base de fruit comme un jus de fruit, une compote ou une pâte de fruit, une boisson, ou un aliment solide, comme un snack, un biscuit, ou autre. Elle peut également être formulée sous forme de comprimés, d'une poudre, d'une capsule, d'un comprimé, d'une solution, d'un concentré, d'un sirop, d'une suspension, ou d'une dispersion.

Les exemples qui suivent servent à illustrer et montrer d'autres aspects et avantages de l'invention et doivent être considérés non limitatifs.

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Spectre RMN^{1}H d'une méthyl-β-cyclodextrine selon l'invention.

Figure 2 : Mesure des efflux de cholestérol en fonction du MS des méthyl-β-cyclodextrines.

Figure 3 : Expression du transporteur ABCA1 en fonction du MS des méthyl-β-cyclodextrines.

Figure 4 : Expression du transporteur ABCG1 en fonction du MS des méthyl-β-cyclodextrines.

Figure 5 : Expression du récepteur SR-B1 en fonction MS des méthyl-β-cyclodextrines.

EXEMPLES

Exemple 1 : Etude *in vivo* des méthyl-cyclodextrines de l'invention.

Des souris mâles Apo E -/- âgées de 11 semaines ont été utilisées.

La composition de méthyl-cyclodextrine utilisée est le produit commercial KLEPTOSE® CRYSMEB (ROQUETTE).

Les souris ont été distribuées en 6 groupes :

- 2 groupes de souris soumises à un régime normal, durant 16 semaines. Ce modèle d'athérome est caractérisé par une maladie précoce. le premier groupe a été traité avec une solution placébo (souris témoins, n=9), le second groupe a été traité avec 40 mg/kg KLEPTOSE® CRYSMEB (souris traitées, n = 12).
- 2 groupes de souris soumises à un régime riche en cholestérol, durant 11 semaines. Ce modèle d'athérome est caractérisé par une maladie avancée. le premier groupe a été traité avec une solution placébo (souris témoins, n=9), le second groupe a été traité avec 40 mg/kg KLEPTOSE® CRYSMEB (souris traitées, n = 11).

Les traitements ont été effectués par injection intrapéritonéale d'un volume de 200 µL de placébo (solution de PBS) ou de solution de KLEPTOSE® CRYSMEB, trois fois par semaine.

Les prélèvements sanguins ont été effectués au sacrifice des animaux, après les 16 ou 11 semaines de traitement, par ponction cardiaque, afin de déterminer l'impact du traitement sur la lipidémie.

D'autres valeurs telles la glycémie, les valeurs d'hématocrite (taux d'hémoglobine, numération des érythrocytes, leucocytes, lymphocytes et plaquettes) ont été mesurées sans qu'aucune différence n'ait été observée entre les différents groupes de souris. Par conséquent, ces résultats ne sont pas présentés ici.

Après sacrifice, une quantification de la surface athéromateuse a par ailleurs été réalisée sur chaque groupe de souris par « computed-assisted morphometry », sur 4 sections aortiques de 10 µm marquées à l'hématoxiline et Oil-ref-O, prélevées à 200, 400, 600 et 800 µm après le départ de la valve cuspide, selon la méthode décrite dans l'article « Caligiuri G, Groyer E, Khallou-Laschet J, Al Haj Zen A, Sainz J, Urbain D et al. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in the blood of atherosclerotic mice with plaque thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:1659-1664. ». Des marquages immuno-

histochimiques des MMP-9 des plaques d'athérome ont également été effectués et quantifiés afin de déterminer leur fragilité (kit R&D Systems).

Les résultats obtenus sont présentés dans les Tableaux 1 et 2.

Tableau 1 : Souris soumises à un régime normal et traitées avec une composition de méthyl-cyclodextrines selon l'invention

	Souris témoins (n=9)	**Souris traitées (n=12)**	***p***
Poids du corps (g)	31,84 ± 2,70	30,71 ± 3,09	0,4137
Lipidémie			
Cholestérol total (mmol/L)	14,49 ± 1,65	14,19 ± 3,02	0,8070
Cholestérol-LDL (mmol/L)	9,29 ± 1,22	9,76 ± 2,34	0,8621
Cholestérol-HDL (mmol/L)	**2,77 ± 0,15**	**3,03 ± 0,38**	**0,1451**
Triglycérides (mmol/L)	**2,20 ± 0,66**	**1,65 ± 0,55**	**0,0491**
Acides gras libres (mmol/L)	**1,33 ± 0,36**	**1,03 ± 0,40**	**0,0955**
	Sinus de la valve aortique		
Oil-red-O, x 10^3 µm^2	**295,06 ± 36,25**	**246,14 ± 46,38**	**0,0278**
MMP-9, %	**6,35 ± 4,78**	**3,26 ± 4,84**	**0,0481**
	Aorte		
Surface de la plaque (%)	**5,56 ± 2,65**	**3,39 ± 1,26**	**0,0278**

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type.

Les valeurs de *p* sont calculées selon le test U Mann-Whitney.

Tableau 2 : Souris soumises à un régime riche en cholestérol et traitées avec une composition de méthyl-cyclodextrines selon l'invention

	Souris témoins (n=9)	**Souris traitées (n=11)**	***p***
Poids du corps (g)	30,44 ± 2,34	28,34 ± 2,80	0,1194
Lipidémie			
Cholestérol total (mmol/L)	21,48 ± 1,37	20,17 ± 1,37	0,4119
Cholestérol-LDL (mmol/L)	17,05 ± 3,81	17,51 ± 4,00	0,9999
Cholestérol-HDL (mmol/L)	**3,44 ± 0,49**	**4,16 ± 0,82**	**0,0334**
Triglycérides (mmol/L)	**1,47 ± 0,65**	**0,90 ± 0,36**	**0,0136**
Acides gras libres (mmol/L)	**0,99 ± 0,25**	**0,75 ± 0,20**	**0,0310**
	Sinus de la valve aortique		
Oil-red-O, x 10^3 µm^2	465,56 ± 66,99	439,45 ± 86,58	0,4119
MMP-9, %	**22,80 ± 15,88**	**12,45 ± 9,80**	**0,1119**
	Aorte		
Surface de la plaque (%)	**24,73 ± 6,75**	**15,00 ± 7,56**	**0,0200**

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type.

Les valeurs de *p* sont calculées selon le test U Mann-Whitney.

Il faut relever dans ces résultats que le déplacement des valeurs résultant du traitement s'obtient non seulement après un régime riche, mais également et de façon surprenante et favorable à la suite d'un régime normal, non enrichi en cholestérol.

Dans les deux cas en effet, une augmentation du taux de cholestérol-HDL a été observée, montrant l'intérêt des méthyl-cyclodextrines selon l'invention pour une utilisation dans le traitement et/ou la prévention de maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation du taux de cholestérol-HDL.

Dans les deux cas, la surface des plaques d'athérome est significativement diminuée. Une diminution sensible, de près de 40%, de la surface athéromateuse a été observée. Ces résultats démontrent l'intérêt des méthyl-cyclodextrines selon l'invention, pour une utilisation dans le traitement et/ou la prévention de l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome,

Une diminution du taux de triglycérides, des acides gras libres et du taux de MMP-9 ont été observées, et renforcent l'intérêt des méthyl-cyclodextrines selon l'invention, pour une utilisation dans le traitement et/ou la prévention de l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome.

Exemple 2 : Etude *in vitro* des méthyl-cyclodextrines de l'invention.

Cet exemple illustre l'effet de différentes cyclodextrines sur les efflux de cholestérol testés avec des cellules endothéliales aortiques. L'endothélium aortique est le tissu de la plaque d'athérome qui se trouve en contact direct avec le compartiment sanguin, et donc en contact direct avec les HDL.

Matériel

Cellules : les cellules endothéliales étaient des cellules endothéliales aortiques de bovin adulte (ABAE).

Cyclodextrines : les cyclodextrines utilisées étaient les suivantes : une β-cyclodextrine non méthylée, ci-après désignée « β-CD », une méthyle-β-cyclodextrine présentant un MS de 0,2, ci-après désignée « MβCD-0,2 », une méthyle-β-cyclodextrine présentant un MS de 0,67 (KLEPTOSE® CRYSMEB, ROQUETTE FRERES), ci-après désignée « MβCD-0,67 », une méthyle-β-cyclodextrine présentant un MS de 1,8 (RAMEB®, CYCLOLAB), ci-après désignée « MβCD-1,8 ».

Incubation des cellules avec les cyclodextrines :

0.5 µCi/mL de H3-cholestérol a été incorporé dans du sérum (10% sérum de cheval/veau (HS/CS)) pendant 6 heures à 37 °C dans le but d'obtenir un milieu de culture enrichi en cholestérol radioactif. Après cette incorporation, le milieu de culture a été finalisé par

incorporation de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) supplémenté avec 10%HS, 10%CS, bFGF (basic fibroblast growth factor) 1ng/mL, glutamine 2mM et Gentamicine 50µg/mL.

Les cellules ont été ensuite cultivées dans ce milieu radioactif pendant 36 heures pour leur permettre d'incorporer le cholestérol radioactif. Le milieu a ensuite été éliminé et les cellules rincées deux fois avec du DMEM chaud contenant 0.1% de sérum albumine bovine (SAB).

Les cellules ont ensuite été cultivées en DMEM/bFGF 1ng/mL contenant 1 mM de chaque cyclodextrine pendant 24 heures (1,4 mL/puits).

A. Mesure du cholestérol capté par les cyclodextrines

Dans cet exemple, la Demanderesse a étudié l'effet des cyclodextrines sur les efflux de cholestérol, en fonction de leur degré de méthylation.

Deux heures après le début de l'incubation en présence de chaque cyclodextrine, 500 µL de milieu ont été prélevés et le dosage de cholestérol radioactif capté par la cyclodextrine a été effectué au moyen d'un compteur à scintillation (Tri-carb 2100TR). La radioactivité a été mesurée en désintégration par minute (DPM). La capacité de chaque cyclodextrine à capter le cholestérol cellulaire a alors été estimée en réalisant le calcul suivant : ((1,4 mL/0,5 mL)* DPM mesurées).

Les valeurs ont ensuite été converties sous forme de pourcentages qui sont comparés à la condition incubée sans cyclodextrine (contrôle) représentant le 100 %.

Chaque expérience a été réalisée en triplicat et répétée deux fois.

Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 2.

<u>Résultats :</u>

Les MβCD-0,2 et MβCD-0,67 conformes à l'invention provoquent un efflux de cholestérol nettement moins important que les βCD et MβCD-1,8 non conformes à l'invention.

Les inventeurs ont donc démontré une plus faible affinité vis-à-vis du cholestérol pour les cyclodextrines méthylées selon l'invention illustrant un efflux de cholestérol sous la forme de cholestérol-HDL et non sous une forme de cholestérol complexée à des cyclodextrines, ou à des vésicules de phospholipides.

B. <u>Expression des transporteurs responsables de l'efflux du cholestérol intracellulaire : ABCA1 et ABCG1</u>

Dans cet exemple, la Demanderesse a étudié l'expression de deux transporteurs responsables des efflux de cholestérol, le récepteur ABCA1 et le récepteur ABCG1, suite à un traitement par des cyclodextrines de différents degrés de méthylation.

Après 24 heures de traitement avec chaque cyclodextrine, les cellules ont été rincées deux fois en PBS froid (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,2 g/L KH_2PO_4, 2,87 g/L NA_2HPO_4 ($12H_2O$), pH 7.4) et lysées grâce à 500 µL de tampon de lyse RLT (Biorad). Trois puits ont été utilisés et poolés pour chaque condition. La purification des ARN messagers (ARNm) a été effectuée en utilisant le kit RNeasy total RNA extraction kit (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant. A la fin de cette étape de purification, la concentration des ARNm a été estimée grâce aux valeurs d'absorbance obtenues à 260, 280 et 320 nm. La pureté des échantillons a été vérifiée en réalisant le rapport 260/280 et seuls les échantillons présentant une valeur supérieure à 2 ont été considérés pour nos études.

Pour chaque échantillon, les cDNA ont été synthétisés à partir de 250 ng d'ARNm en utilisant le kit iScript Reverse Transcription Supermix (Biorad) en suivant les instructions du fabricant. Les expériences de PCR en temps réel ont été effectuées en utilisant le kit Sso Fast EvaGreen Master Mix (BioRad) et les amorces dessinées et optimisées par la Demanderesse (Tableau 3).

<u>Tableau 3 :</u>

ARNm	Espèce	Séquences	NO d'Accession
ABCA1	Bos taurus	F 5'-gtgtctcgcctgttctcag-3' (SEQ ID No 1) R 5'-gaaacatcacctcctgccg-3' (SEQ ID No 2)	NM_001024693
ABCG1	Homo sapiens	F 5'-gaggaagaaaggatacaagacc-3' (SEQ ID No 3) R 5'-gtcagtatctccttgaccattt-3' (SEQ ID No 4)	BC029158

L'amplification a été réalisée sur 40 cycles avec une température d'hybridation de 60 °C en utilisant le thermocycler CFX96 de Biorad. Pour chaque couple d'amorces, la spécificité d'amplification a été vérifiée en effectuant des courbes de fusion et l'efficacité a été déterminée en réalisant des courbes de dilution. Les niveaux d'expression mesurés ont

ensuite été normalisés sur les niveaux d'expression de la ß-actine et la cyclophiline B en utilisant la méthode des ΔΔCt.

Chaque expérience a été réalisée en triplicat et répétée deux fois.

Les résultats obtenus sont présentés aux Figures 3 et 4.

Résultats :

Les résultats montrent qu'en réponse à un traitement par une cyclodextrine, de manière générale, l'expression des récepteurs ABCA1 et ABCG1 par les cellules endothéliales diminue comparativement au contrôle.

En particulier, les MβCD-0,2 et MβCD-0,67 selon l'invention provoquent une diminution de l'expression des récepteurs ABCA1 et ABCG1 inférieure, comparativement aux βCD et MβCD-1,8.

En combinant ces résultats avec ceux obtenus ci-dessus (point A), les inventeurs ont montré que les βCD et MβCD-1,8 non conformes à l'invention induisaient un efflux rapide et important de cholestérol et une réaction plus vive de la cellule en diminuant fortement l'expression de récepteurs ABCA1 et ABCG1.

En revanche, les MβCD-0,2 et MβCD-0,67 conformes à l'invention, même si elles induisent des efflux inférieurs de cholestérol, diminuent bien moins nettement l'expression des récepteurs ABCA1 et ABCG1.

La cinétique d'efflux du cholestérol des cyclodextrines méthylées conformes à l'invention est ainsi totalement différente de celle des cyclodextrines non conformes à l'invention. Il est postulé par les inventeurs que cette cinétique particulière des cyclodextrines méthylées conformes à l'invention présente l'avantage de moins perturber l'homéostasie du cholestérol cellulaire.

C. Etude de l'expression du récepteur SR-B1 (« Scavenger Receptor class B member 1 »), récepteur aux HDL, de cellules endothéliales traitées avec des cyclodextrines

Dans cet exemple, la Demanderesse a étudié l'effet des cyclodextrines sur l'expression d'un récepteur aux HDL, le récepteur SR-B1, en fonction de leur degré de méthylation.

Un des rôles des récepteurs SR-B1 au niveau de l'endothélium, est de promouvoir l'efflux de cholestérol libre vers les HDL de la circulation.

L'expression du récepteur SR-B1 a été étudiée selon le protocole tel que décrit précédemment, en utilisant des amorces dessinées et optimisées par la Demanderesse (Tableau 4).

Tableau 4 :

ARNm	**Espèce**	**Séquences**	**NO d'Accession**
SCARB1	Bos taurus	F 5'-cccttaatccacctcatcaatc-3' (SEQ ID No 5)	NM_174597
		R 5'-gaagtttttgacccctgtgaac-3' (SEQ ID No 6)	

Chaque expérience a été réalisée en triplicat et répétée deux fois.
Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 5.

Résultats :

La MβCD-0,67 selon l'invention provoque une forte augmentation de l'expression du récepteur SR-B1, d'environ 50% de l'expression basale.

En conclusion, les inventeurs ont montré que les méthyl-cyclodextrines selon la présente invention présentaient une faible affinité pour le cholestérol, limitaient la diminution des transporteurs responsables de l'efflux de cholestérol et augmentaient l'expression du récepteur SR-B1 aux HDL, ceci ayant pour effet de favoriser le transport du cholestérol cytoplasmique vers le sang et donc d'augmenter le taux de cholestérol plasmatique, en particulier le cholestérol-HDL.

Les inventeurs ont donc démontré que méthyl-cyclodextrines selon l'invention en dépit de leur faible affinité pour le cholestérol ne nécessitaient pas l'addition de vésicules de phospholipides pour exercer leurs effets illustrés par les résultats in vivo de l'exemple 1 (Tableaux 1 et 2).

Ces résultats renforcent l'intérêt des méthyl-cyclodextrines selon l'invention, pour une utilisation dans le traitement et/ou la prévention de maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation du taux de cholestérol-HDL.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,5, pour son utilisation dans le traitement et/ou la prévention de maladies susceptibles d'être traitées et/ou prévenues par une augmentation du taux de cholestérol-HDL.

2. Composition pharmaceutique comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,5, pour son utilisation dans le traitement et/ou la prévention de l'athérosclérose ou des complications liées à un athérome.

3. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon la revendication 1 ou 2, dans le traitement et/ou la prévention des complications liées à un athérome qui comprennent l'ischémie, de préférence l'ischémie du myocarde, les maladies coronariennes, l'angine de poitrine, le syndrome coronarien aigu, l'infarctus du myocarde, l'infarctus mésentérique, l'accident vasculaire-cérébral, l'anévrisme ou l'artériopathie des membres inférieurs et leurs conséquences.

4. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la méthyl-cyclodextrine présente un degré de substitution molaire compris entre 0,2 et 1,2, préférentiellement entre 0,4 et 0,9.

5. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la méthyl-cyclodextrine présente un degré de substitution molaire compris entre 0,6 et 0,8.

6. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la méthyl-cyclodextrine est une méthyl-β-cyclodextrine.

7. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la méthyl-cyclodextrine est substituée sur l'hydroxyle porté par le carbone C2 des unités glucopyranoses, ou par les carbones C3

et/ou C6 des unités glucopyranoses, ou par une combinaison des carbones C2, C3 et/ou C6, de préférence C2 et C6 des unités glucopyranoses.

8. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que la composition de méthyl-cyclodextrines comprend une ou plusieurs méthyl- β-cyclodextrines choisies parmi le groupe consistant en des méthyl-β-cyclodextrines substituées sur l'hydroxyle porté par le carbone C2 des unités glucopyranoses, des méthyl-β-cyclodextrines substituées sur l'hydroxyle porté par les carbones C3 et/ou C6 des unités glucopyranoses, des méthyl-β-cyclodextrines substituées sur l'hydroxyle porté par les carbones C2, C3 et/ou C6, de préférence C2 et C6 des unités glucopyranoses et lesdites méthyl- β-cyclodextrines présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,6 et 0,8.

9. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la composition de méthyl-cyclodextrines comprend au moins 50, 60, ou 75 % de méthyles substituées sur l'hydroxyle porté par le carbone C2 des unités glucopyranoses.

10. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que la composition comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine comprend également une cyclodextrine, en particulier β – cyclodextrine, non substituée et/ou une cyclodextrine, en particulier β –cyclodextrine, substituée par des groupes sulfobutyléther (SBE-) ou hydroxypropyles (HP-), de préférence avec un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,5.

11. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 comprenant en outre au moins un agent actif supplémentaire.

12. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'agent actif supplémentaire est un agent actif utilisé dans le traitement de l'athérosclérose ou des complications liés à un athérome, préférentiellement,

- une statine,

- un agent antiagrégant plaquettaire ou anticoagulant, de préférence sélectionné parmi l'aspirine, le clopidogrel, les nouveaux anticoagulants oraux comme le dabigatran, l'apixaban, le rivaroxaban, et les anti-vitamines K,

- un agent antihypertenseur, de préférence sélectionné parmi les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine comme le perindopril, le captopril, l'enalapril, le lisinopril ou le ramipril, les antagonistes du récepteur à l'angiotensine II comme le losartan, le valsartan, ou le candesartan, et et/ou parmi les bêta-bloquants comme l'acébutolol, le labétalol, le nadolol, l'oxprénolol, le penbutolol, le pindolol, ou le propranolol,

- ou une combinaison de ceux-ci.

13. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que l'agent actif supplémentaire est un antagoniste du récepteur à l'angiotensine II, comme le losartan, le valsartan, ou le candesartan.

14. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée ce que la composition est susceptible d'être administrée par administration par voie orale, par voie parentérale, ou par voie cutanée ou mucosale.

15. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 favorisant en outre une diminution du taux de triglycérides et d'acides gras circulants.

16. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour réduire et/ou prévenir les plaques d'athérome.

17. Composition pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisée en ce que ladite composition est exempte ou substantiellement exempte de vésicules de phospholipides.

18. Utilisation non-thérapeutique d'une composition comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,50, de préférence compris entre 0,60 et 0,80, pour diminuer le taux de triglycérides et/ou pour

diminuer la concentration d'acides gras libres et/ou pour augmenter le taux de cholestérol-HDL.

19. Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce que la méthyl-cyclodextrine présente un degré de substitution molaire compris entre 0,2 et 1,2, préférentiellement entre 0,4 et 0,9.

20. Utilisation selon la revendication 18 ou 19, caractérisée en ce que la méthyl-cyclodextrine présente un degré de substitution molaire compris entre 0,6 et 0,8.

21. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 18 à 20, caractérisée en ce que la méthyl-cyclodextrine est une méthyl-β-cyclodextrine.

22. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 18 à 21, caractérisée en ce que la méthyl-cyclodextrine est substituée sur l'hydroxyle porté par le carbone C2 des unités glucopyranoses, ou par les carbones C3 et/ou C6 des unités glucopyranoses, ou par une combinaison des carbones C2, C3 et/ou C6, de préférence C2 et C6 des unités glucopyranoses.

23. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 18 à 22, caractérisée en ce que la composition de méthyl-cyclodextrines comprend une ou plusieurs méthyl- β-cyclodextrines choisies parmi le groupe consistant en des méthyl-β-cyclodextrines substituées sur l'hydroxyle porté par le carbone C2 des unités glucopyranoses, des méthyl-β-cyclodextrines substituées sur l'hydroxyle porté par les carbones C3 et/ou C6 des unités glucopyranoses, des méthyl-β-cyclodextrines substituées sur l'hydroxyle porté par les carbones C2, C3 et/ou C6, de préférence C2 et C6 des unités glucopyranoses et lesdites méthyl- β-cyclodextrines présentant un degré de substitution molaire compris entre 0,6 et 0,8.

24. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 18 à 23, caractérisée en ce que la composition de méthyl-cyclodextrines comprend au moins 50, 60, ou 75 % de méthyles substituées sur l'hydroxyle porté par le carbone C2 des unités glucopyranoses.

25. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 18 à 24, caractérisée en ce que la composition comprenant au moins une méthyl-cyclodextrine comprend également une cyclodextrine, en particulier β –cyclodextrine, non substituée et/ou une cyclodextrine, en particulier β –cyclodextrine, substituée par des groupes sulfobutyléther (SBE-) ou hydroxypropyles (HP-), de préférence avec un degré de substitution molaire compris entre 0,05 et 1,5.

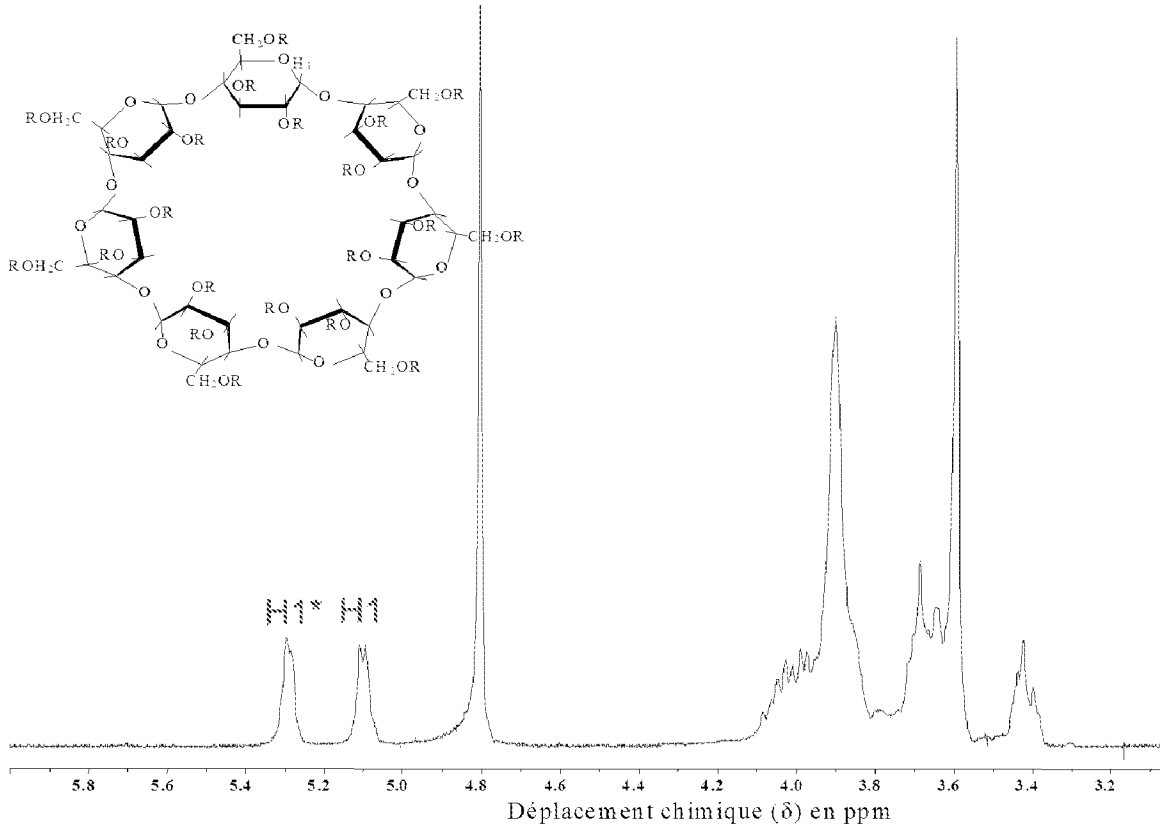


FIGURE 1

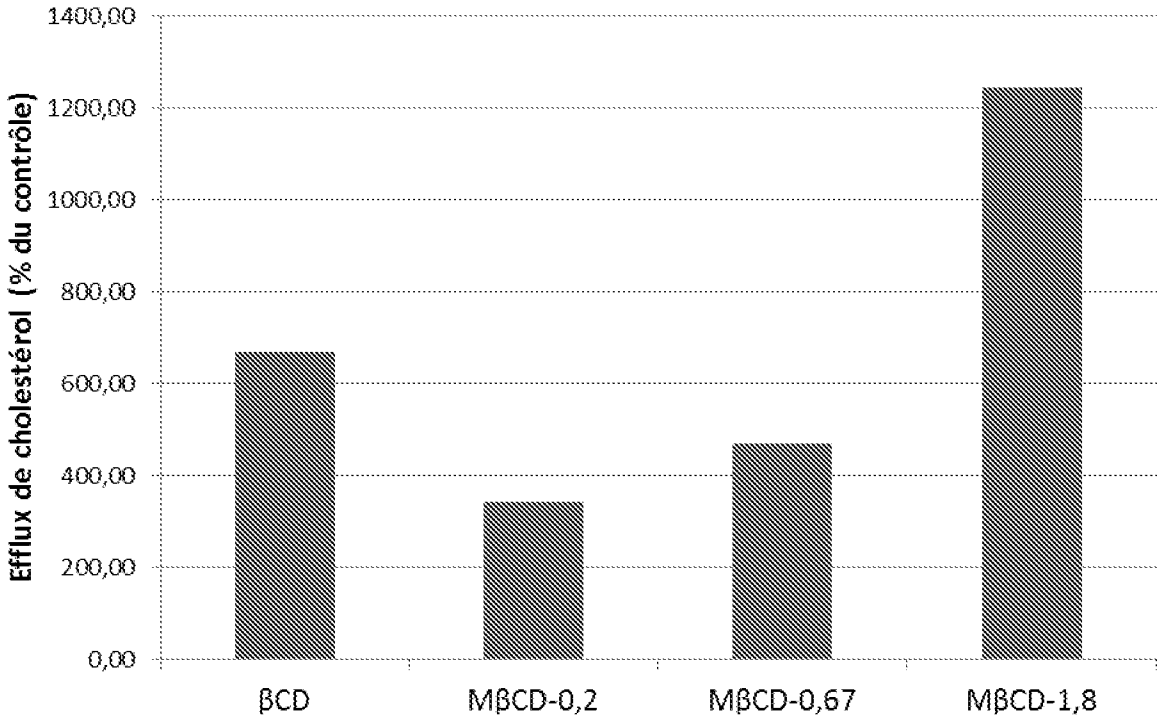


FIGURE 2

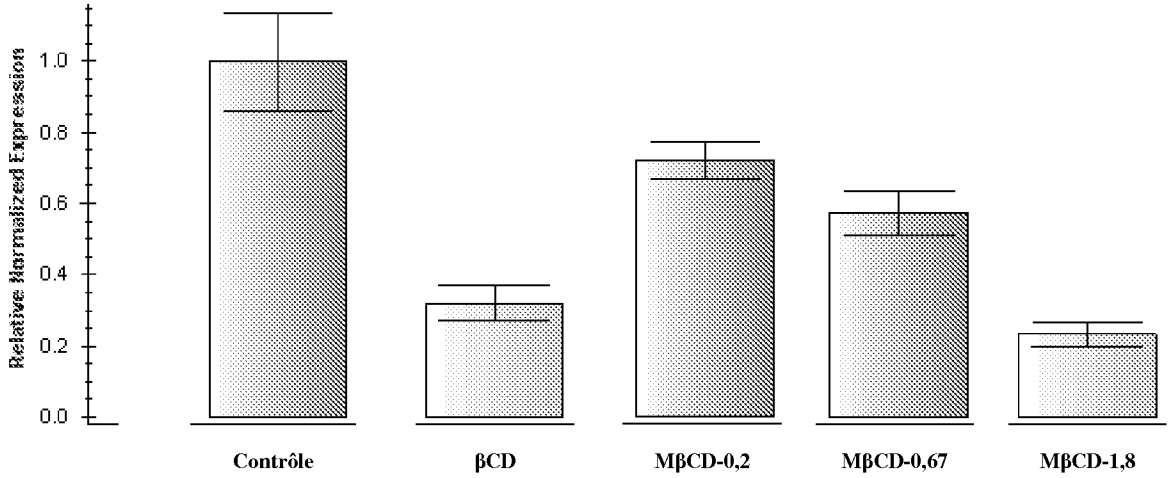


FIGURE 3

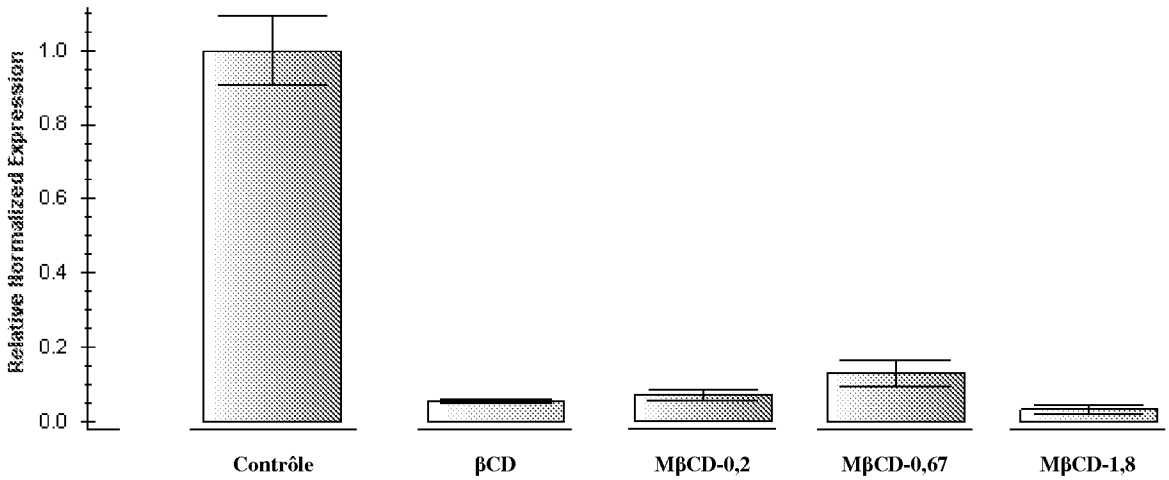


FIGURE 4

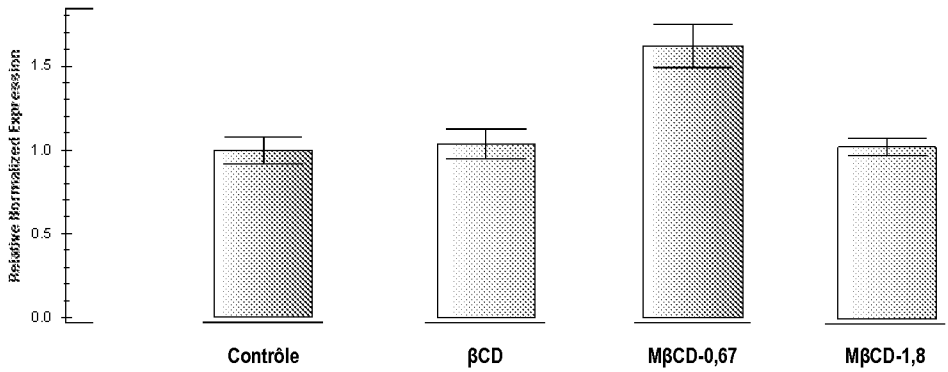


FIGURE 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2014/053310

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K31/724 A61P9/00 A61P25/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SWAROOP ET AL.: "EVALUTATION OF CHOLESTEROL REDUCTION ACTIVITY OF METHYL-BETA-CYCLODEXTRIN USING DIFFERENTIATED HUMAN NEURONS AND ASTROCYTES", JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING, vol. 17, no. 9, 2012, pages 1243-1251, XP002726510, the whole document -----	1-25
Y	BUSSEUIL ET AL.: "A STUDY OF THE EFFECT OF METHYL-BETA-CYCLODEXTRIN ON CHOLESTEROL CONTENT AND VASCULAR RESPONSES OF THE PORCINE ISOLATED CORONARY ARTERY", BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 131, no. PROC. SUP., 2000, page 10P, XP002726511, abstract -----	1-25

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 March 2015	20/03/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Trifilieff-Riolo, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2014/053310

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008/032925 A1 (HAUSER CARL J [US]) 7 February 2008 (2008-02-07) cited in the application page 5; claims 4,8; figure 3; examples 3,4 -----	1-25
A	WO 02/43742 A1 (HEART RES INST LTD [AU]; KRITHARIDES LEN [AU]; DEAN ROGER [AU]; JESSUP) 6 June 2002 (2002-06-06) cited in the application the whole document -----	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2014/053310

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008032925 A1	07-02-2008	NONE	
WO 0243742 A1	06-06-2002	AU 2330302 A	11-06-2002
		WO 0243742 A1	06-06-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2014/053310

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A61K31/724 A61P9/00 A61P25/00
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	SWAROOP ET AL.: "EVALUTATION OF CHOLESTEROL REDUCTION ACTIVITY OF METHYL-BETA-CYCLODEXTRIN USING DIFFERENTIATED HUMAN NEURONS AND ASTROCYTES", JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING, vol. 17, no. 9, 2012, pages 1243-1251, XP002726510, le document en entier -----	1-25
Y	BUSSEUIL ET AL.: "A STUDY OF THE EFFECT OF METHYL-BETA-CYCLODEXTRIN ON CHOLESTEROL CONTENT AND VASCULAR RESPONSES OF THE PORCINE ISOLATED CORONARY ARTERY", BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 131, no. PROC. SUP., 2000, page 10P, XP002726511, abrégé -----	1-25

-/--

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
12 mars 2015	20/03/2015

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Trifilieff-Riolo, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2014/053310

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 2008/032925 A1 (HAUSER CARL J [US]) 7 février 2008 (2008-02-07) cité dans la demande page 5; revendications 4,8; figure 3; exemples 3,4	1-25
A	WO 02/43742 A1 (HEART RES INST LTD [AU]; KRITHARIDES LEN [AU]; DEAN ROGER [AU]; JESSUP) 6 juin 2002 (2002-06-06) cité dans la demande le document en entier	1-25

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/FR2014/053310

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2008032925 A1	07-02-2008	AUCUN	
WO 0243742 A1	06-06-2002	AU 2330302 A	11-06-2002
		WO 0243742 A1	06-06-2002