

②② Date de dépôt : 29.08.01.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 07.03.03 Bulletin 03/10.

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

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : AVENTIS PHARMA SA Société ano-
nyme — FR, CENTRE NATIONAL DE LA RECHER-
CHE SCIENTIFIQUE CNRS — FR et INSTITUT
NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE
MEDICALE INSERM — FR.

⑦② Inventeur(s) : LEHN JEAN MARIE, LEHN PIERRE et
VIGNERON JEAN PIERRE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) :

⑤④ DERIVES LIPIDIQUES D'AMINOGLYCOSIDES.

⑤⑦ L'invention concerne des nouveaux composés trans-
fectants qui sont constitués d'un aminoglycoside relié à un
lipide par l'intermédiaire d'un espaceur, et leurs dérivés po-
lyguanidylés. Ces composés sont utiles pour la transfection
in vitro, ex vivo ou in vivo d'acides nucléiques dans diffé-
rents types cellulaires.



DÉRIVÉS LIPIDIQUES D'AMINOGLYCOSIDES

La présente invention est relative à de nouveaux composés qui permettent le transfert d'acides nucléiques dans des cellules. Plus précisément, ces nouveaux composés sont des dérivés lipidiques d'aminoglycosides et leurs dérivés polyguanidylés. Ils sont utiles pour la transfection *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* d'acides nucléiques dans différents types cellulaires.

Avec le développement des biotechnologies, il est devenu nécessaire de transférer efficacement des acides nucléiques dans les cellules. Il peut s'agir du transfert d'acides nucléiques dans des cellules *in vitro*, par exemple pour la production de protéines recombinantes, ou au laboratoire, pour l'étude de la régulation de l'expression de gènes, le clonage de gènes, ou toute autre manipulation impliquant l'ADN. Il peut également s'agir du transfert d'acides nucléiques dans des cellules *in vivo*, par exemple pour la création d'animaux transgéniques, la réalisation de vaccins, des études de marquage ou également des approches thérapeutiques. Il peut encore s'agir du transfert d'acides nucléiques dans des cellules *ex vivo*, dans des approches de greffes de moelle osseuse, d'immunothérapie ou d'autres méthodes impliquant le transfert de gènes dans des cellules prélevées d'un organisme, en vue de leur réadministration ultérieure.

Aujourd'hui, plusieurs méthodes sont proposées pour la délivrance intracellulaire de matériel génétique exogène. L'une d'entre elles, en particulier, repose sur l'emploi de vecteurs non-viraux qui constitue une alternative très avantageuse par rapport aux méthodes virales qui ne sont pas complètement dénuées de risques. Ces vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales : complexer et compacter l'acide nucléique à transférer, et promouvoir son passage à travers la membrane plasmique et éventuellement à travers l'enveloppe nucléaire.

Plusieurs familles de vecteurs synthétiques ont ainsi été développées, comme par exemple les polymères ou encore les vecteurs biochimiques (constitués d'une protéine cationique associée à un récepteur cellulaire), mais un progrès important a

surtout été accompli avec le développement des lipofectants, et plus particulièrement des lipides cationiques. Il a ainsi été mis en évidence que les lipides cationiques, du fait de leur charge globale positive, interféraient spontanément avec l'ADN globalement négatif, formant des complexes nucléolipidiques capables à la fois de protéger l'ADN vis-à-vis des nucléases et de se fixer sur les membranes cellulaires pour une libération intracellulaire de l'ADN. Ainsi, la plupart des vecteurs non-viraux mis au point à ce jour sont basés sur la protonation d'amines pour permettre la liaison à l'ADN.

Différentes sortes de lipides cationiques ont été synthétisées à ce jour : des lipides comportant un groupement ammonium quaternaire (par exemple le DOTMA, DOTAP, DMRIE, DLRIE...), des lipopolyamines comme par exemple le DOGS, le DC-Chol ou les lipopolyamines divulguées dans la demande de brevet WO 97/18185, des lipides associant à la fois un groupement ammonium quaternaire et une polyamine comme le DOSPA, ou encore des lipides comportant diverses autres entités cationiques dérivées des amines, notamment des groupes amidinium (par exemple l'ADPDE, ADODE ou les lipides du brevet EP 0 888 379 B1 ou US 6,143,729, en particulier le BGTC).

Bien que les relations structure/activité des lipides cationiques ne soient pas encore vraiment comprises, on considère généralement que la nature de la partie cationique a un impact majeur sur l'activité de transfection, bien que ce soit la nature et les propriétés physico-chimiques de la molécule entière (tel que la balance hydrophobie/hydrophilie, les interactions avec des co-lipides etc...) qui déterminent l'efficacité d'un lipide cationique donné in fine (voir par exemple Felgner et al., *Am. Chem. Soc.*, 1996, pp. 177-190).

C'est pourquoi, ces dernières années, de nombreux efforts ont été déployés pour développer des lipides cationiques ayant de nouvelles entités cationiques. La présente invention a précisément pour objet de proposer de nouveaux composés transfectants, originaux de par leur partie cationique constituée d'aminoglycosides ou de leurs dérivés polyguanidylés, qui sont susceptibles d'être utilisés efficacement pour la

transfection *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* d'acides nucléiques. Ces nouveaux composés sont particulièrement intéressants car les aminoglycosides peuvent interagir avec des substructures tridimensionnelles trouvées dans une grande variété de molécules d'ARN (Walter et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, 3, pp. 694-704) et ils

5 constituent donc des nouveaux groupes cationiques ayant des caractéristiques structurales particulièrement bien adaptées pour la synthèse d'une grande variété de composés transfectants. En effet, les aminoglycosides sont des composés multifonctionnels contenant jusqu'à 6 groupes aminés et plusieurs fonctions hydroxyles. Une acylation sélective d'un ou plusieurs de ces groupes a donc permis

10 d'obtenir des aminoglycosides ayant les propriétés lipophiles requises pour une utilisation en transfection. En outre, les aminoglycosides peuvent être facilement polyguanidylés en une seule étape, ce qui permet par exemple de synthétiser des composés transfectants présentant des groupes guanidinium dans leur partie cationique à la place des amines. Enfin, ces nouveaux composés transfectants sont

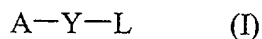
15 également particulièrement intéressants d'un point de vue pharmaceutique car les aminoglycosides qui constituent leur partie cationique sont des composés naturels déjà largement utilisés en pharmacie comme antibiotiques, leur activité antibactérienne étant en fait dérivée de leur interaction avec les ARNr procaryotes (Moazed et al., *Nature*, 1987, 327, pp. 389-394 ; Puhrohit et al., *Nature*, 1994, 370,

20 pp. 659-662).

La présente invention a ainsi pour premier objet des composés transfectants caractérisés en ce qu'ils sont constitués d'un aminoglycoside relié à un lipide par l'intermédiaire d'un espaceur, et leurs dérivés polyguanidylés.

En particulier, la présente invention a pour objet des composés transfectants

25 de formule générale (I) :



dans laquelle :

- A représente un aminoglycoside ou bien son dérivé polyguanidylé,

- Y représente un espaceur, et
- L représente :
 - soit un radical $-(R_1)R_2$ avec R_1 et R_2 qui représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou une chaîne aliphatique grasse ou R_1 ou R_2 est absent, étant entendu que l'un au moins de R_1 et de R_2 représente une chaîne aliphatique grasse,
 - soit un radical $-N-R_3$ ou $-O-R_3$, avec R_3 qui représente un dérivé stéroïdien.

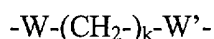
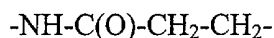
5 Au sens de la présente invention, on entend par « aminoglycoside » (ou
 10 « aminosides ») les hétérosides naturels formés par l'union d'une génine du groupe des aminocyclitols avec généralement plusieurs oses dont au moins un est un aminosucre (osamine). On peut donc les considérer comme des pseudos-
 oligosaccharides ayant des propriétés antibiotiques. A titre d'exemple d'aminoglycosides convenables, on peut citer l'amikacine, l'arbékacine, la
 15 déoxyhydrostreptomycine, la destomycine A, la dibékacine, la dihydrostreptomycine, la genticine, la gentamicine, l'hygromycine, l'isépamycine, la kanamycine, la micromycine, la paromomycine, la ribostamycine, la streptomycine, la streptonicozide, la néomycine, la tobramycine, la sisomycine, ou encore les aminosides d'hémisynthèse.

20 Le dérivé polyguanidylé d'un aminoglycoside selon l'invention est l'aminoglycoside pour lequel les fonctions amino ont été remplacées par des fonctions guanidinium. Par exemple, le dérivé polyguanidylé de la kanamycine ou guanidino-kanamycine a été décrit par Baker et al. (*J. Org. Chem.*, 2000, 65, pp. 9054-9058).

25 Selon la présente invention, on entend par « espaceur » tout groupe chimique permettant à la fois d'assurer la liaison entre l'aminoglycoside ou son dérivé polyguanidylé et la partie lipidique de la molécule, et d'éloigner ces deux parties afin d'atténuer toute interaction non-désirée entre elles. Par conséquent, l'espaceur est un groupe chimique bifonctionnel qui peut par exemple être constitués d'une ou

plusieurs fonctions chimiques choisies parmi les alkyles ayant 1 à 6 atomes de carbone, les fonctions cétone, ester, éther, amino, amide, amidine, carbamate, thiocarbamate, le glycérol, l'urée, la thiourée, ou encore les cycles aromatiques. Par exemple, l'espaceur peut être choisi parmi les radicaux de formule :

5



dans laquelle i, j et k sont des entiers choisis entre 1 et 6 inclus et W et W' sont des groupes identiques ou différents choisis parmi les fonctions cétone, ester, éther, amino, amide, amidine, carbamate, thiocarbamate, le glycérol, l'urée, la thiourée, ou encore les cycles aromatiques,

15

Au sens de la présente invention, on entend par « chaînes aliphatiques grasses » des radicaux alkyle contenant 10 à 22 atomes de carbone, saturés ou insaturés et contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, pourvu que lesdites chaînes aliphatiques grasses présentent des propriétés lipidiques. De préférence, il s'agit de radicaux alkyles linéaires ou ramifiés contenant 10 à 22 atomes de carbone et 1, 2 ou 3 insaturations. De préférence, lesdits radicaux alkyles comprennent 10, 12, 14, 16, 18, 20 ou 22 atomes de carbone. On peut citer plus particulièrement les radicaux aliphatiques $-(CH_2)_{11}CH_3$, $-(CH_2)_{13}CH_3$, $(CH_2)_{15}CH_3$ et $-(CH_2)_{17}CH_3$.

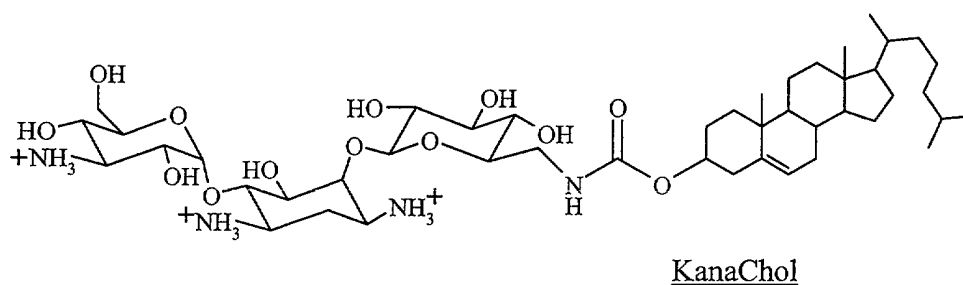
25

Au sens de la présente invention, on entend par « dérivés stéroïdiens » les composés polycycliques de type cholestane. Ces composés peuvent être naturels ou non et sont de préférence choisis parmi le cholestérol, le cholestanol, le 3- α -5-cyclo-5- α -cholestan-6- β -ol, l'acide cholique, le cholestérylformiate, le cholestanylformiate, le 3 α ,5-cyclo-5 α -cholestan-6 β -yl formiate, la cholestérylamine, la 6-(1,5-diméthylhexyl)-3a,5a-diméthylhexadécahydrocyclopenta[a]cyclopropa[2,3]-cyclopenta[1,2-f]naphta-lèn-10-ylamine, ou la cholestanylamine.

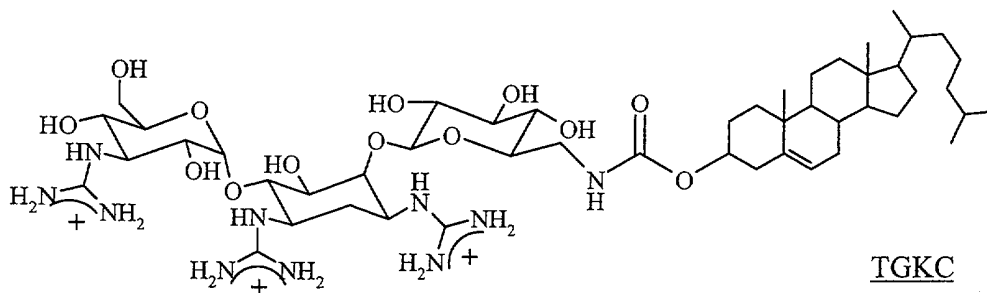
Les composés transfectants pour lesquels A et Y sont tels que définis précédemment dans la formule générale (I) et L est un radical $-OR_3$, avec R_3 qui représente un dérivé stéroïdien constituent une sous-classe de composés transfectants préférés au sens de la présente invention.

- 5 Encore plus préférentiellement, les composés transfectants selon la présente invention sont choisis parmi les composés de formule générale (I) pour lesquels A et Y sont tels que définis précédemment et L est un radical $-OR_3$, avec R_3 qui représente un radical cholestérol.

Des composés transfectants encore plus particulièrement préférés sont
10 notamment le $3\beta[6'-\text{kanamycin-carbamoyl}]$ cholestérol (« KanaChol ») de formule :



et le $3\beta[6'-(1,3,3''\text{-triguanidino})\text{kanamycin-carbamoyl}]$ cholestérol (« TGKC ») de formule :



- 15 Il est entendu que la présente invention concerne également les isomères des produits de formule générale (I) lorsqu'ils existent, ainsi que leurs mélanges, ou leurs sels.

Notamment, les composés de l'invention peuvent se présenter sous forme de sels non toxiques et pharmaceutiquement acceptables. Ces sels non toxiques comprennent les sels avec les acides minéraux (par exemple l'acide chlorhydrique, sulfurique, bromhydrique, phosphorique, nitrique), ou avec les acides organiques (acide acétique, propionique, succinique, maléique, hydroxymaléique, benzoïque, fumarique, méthanesulfonique trifluoroacétique ou oxalique).

La préparation des composés de formule générale (I) selon la présente invention s'effectue en mettant en oeuvre les étapes suivantes, dans l'ordre présenté ou selon toute autre variante connue et également adaptée, en utilisant les techniques de synthèse organique classique, en solution ou sur des supports solides, bien connues de l'homme du métier :

1) Obtention de la partie lipidique L

Lorsque la partie lipidique L des composés de formule générale (I) est représentée par un radical $-(R_1)R_2$ rattaché par exemple à un atome d'azote de l'espaceur, on forme tout d'abord l'amine de formule $HN(R_1)R_2$. Ladite amine peut être obtenue par condensation d'un acide carboxylique et d'une amine contenant l'un le substituant R_1 et l'autre le substituant R_2 pour former l'amide correspondant, suivie de la réduction de dudit amide ainsi obtenu.

La formation de l'amide est avantageusement effectuée par mélange des constituants et fusion par chauffage à une température supérieure à la température de fusion des substances impliquées, en général entre 20°C et 200°C, puis élimination de l'eau produite par déshydratation du milieu; ou plus avantageusement en présence d'un agent dessicant tel que par exemple le pentoxyde de phosphore ou toute autre substance pouvant absorber l'eau. La formation de cet amide intermédiaire peut également se faire en employant une variante de cette méthode ou toute autre méthode de formation d'amide (tel que par exemple le couplage de type peptidique) impliquant les acides carboxyliques ou leurs dérivés, des conditions et des réactifs variés [R.C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Editeurs] et bien connues de l'homme de l'art.

La réduction de l'amide précédemment obtenu en amine de formule $\text{HN}(\text{R}_1)\text{R}_2$ peut être effectuée par exemple en utilisant un réducteur tel que l'hydrure double de lithium et d'aluminium, ou tout autre hydrure ou réducteur efficace dans ce cas. On opère alors de préférence dans un solvant non protique (par exemple le tétrahydrofurane ou encore les éthers), à température inférieure à la température d'ébullition du solvant et sous atmosphère sèche et/ou inerte.

Selon une autre variante, la partie lipidique désignée comme $\text{HN}(\text{R}_1)\text{R}_2$ peut être disponible commercialement.

Lorsque la partie lipidique L des composés de formule générale (I) est représentée par un radical $-\text{NR}_3$ ou $-\text{OR}_3$, celle-ci est de préférence choisie parmi les produits disponibles dans le commerce.

2) Greffage de l'espaceur Y

L'espaceur Y est ensuite fixé à la partie lipidique L obtenue à l'étape précédente selon les techniques classiques connues de l'homme de l'art. Selon une variante préférée, une liaison amide est réalisée par *N*-acylation de la partie lipidique L dans un solvant approprié tel que le dichlorométhane, le chloroforme, le tétrahydrofurane, ou tout autre éther, à température inférieure à la température d'ébullition du solvant, et sous atmosphère sèche et/ou inerte. Cette réaction se déroule de préférence en présence d'une base aminée comme la *N,N*-diméthylaminopyridine, ou en présence de cette base mélangée avec des bases aminées non-nucléophiles comme la triéthylamine ou encore l'éthyldiisopropylamine. La pyridine peut également être employée, seule ou en mélange avec une autre base, diluée par un des solvants cités ou utilisée elle-même comme solvant.

Selon une autre variante, quand la partie lipidique L représente un radical $-\text{OR}_3$, le traitement par le phosgène de l'alcool correspondant R_3OH donne un chloroformiate (parfois disponible dans le commerce).

3) greffage de l'aminoglycoside

Le greffage de l'aminoglycoside sur l'ensemble Y-L se fait en utilisant les fonctions amines et/ou hydroxyles portées par l'aminoglycoside, qu'elles soient présentes dans le composé naturel ou qu'elles proviennent d'une modification réalisée selon les méthodes classiques connues de l'homme de l'art.

- 5 Selon une variante, une liaison amide est réalisée par N-acylation d'une fonction amine de l'aminoglycoside par l'ensemble Y-L convenablement activé selon les méthodes classiques utilisées pour créer une liaison peptidique.

- 10 Lorsque la partie lipidique L des composés de formule générale (I) est représentée par le radical $-OR_3$, une possibilité préférée consiste à réunir les parties A et L par l'intermédiaire d'une liaison carbamate obtenue en traitant l'aminoglycoside par le chloroformiate, parfois disponible commercialement, de l'alcool R_3OH . Cette réaction a lieu dans un solvant approprié tel que le dichlorométhane, le chloroforme, le tétrahydrofurane, le diméthylformamide ou tout autre éther, à une température inférieure à la température d'ébullition du solvant, sous atmosphère sèche et/ou inerte
- 15 et en présence d'une base aminée non-nucléophile telle que la triéthylamine, l'éthyldiisopropylamine ou la pyridine.

D'une manière générale, les aminoglycosides utilisés préférentiellement dans le cadre de l'invention sont tous disponibles commercialement.

4) transformation des amines en guanidines

- 20 La transformation des fonctions amines de l'aminoglycoside en fonctions guanidines peut être aisément réalisée selon les techniques connues de l'homme du métier, notamment les techniques décrites par exemple par Baker et al. (*J. Org. Chem.*, 2000, 65, pp. 9054-8), Luedtke et al. (*J. Am. Chem.*, 2000, 122, pp. 12035-12036) ou encore Iwanowicz et al. (*Synth. Commun.* 1993, 23, pp. 1443-1445).
- 25 Avantagusement, on utilise la technique et les réactifs décrits par Iwanowicz et al. (*Synth. Commun.* 1993, 23, pp. 1443-1445).

Naturellement, lorsque les différents substituants peuvent interférer avec la réaction, il est préférable de les protéger préalablement avec des radicaux compatibles et pouvant être mis en place et éliminés sans toucher au reste de la molécule. On opère pour cela selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier, et
5 notamment selon les méthodes décrites dans T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, dans McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, ou dans P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, Thieme.

Par ailleurs, chaque étape du procédé de préparation peut être suivie, le cas échéant, des étapes de séparation et de purification du composé obtenu selon toute
10 méthode connue de l'homme du métier.

Un autre objet de l'invention concerne les compositions comprenant un composé transfectant selon l'invention et un acide nucléique. Les quantités respectives de chaque composant peuvent être ajustées aisément par l'homme du métier en fonction du composé transfectant utilisé, de l'acide nucléique, et des
15 applications recherchées (notamment du type de cellules à transfecter).

On entend au sens de l'invention par "acide nucléique" aussi bien un acide désoxyribonucléique qu'un acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences naturelles ou artificielles, et notamment d'ADN génomique (ADNg), d'ADN complémentaire (ADNc), d'ARN messenger (ARNm), d'ARN de transfert (ARNt), d'ARN ribosomique (ARNr), de séquences hybrides telles que les chiméropastes ADN/ARN, ou de
20 séquences synthétiques ou semi-synthétiques, d'oligonucléotides modifiés ou non. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc... Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par
25 des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent être modifiés chimiquement. En général, ils contiennent au moins 10, 20, 50 ou 100 nucléotides consécutifs, et de préférence au moins 200 nucléotides consécutifs. Encore plus préférentiellement, ils contiennent au moins 500 nucléotides consécutifs.

Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent être simple ou double brin de même que des oligonucléotides courts ou des séquences plus longues. En particulier, les acides nucléiques sont avantageusement constitués par des plasmides, des vecteurs, des épisomes, des cassettes d'expression, etc... Ces

5 acides désoxyribonucléiques peuvent porter une origine de réplication procaryote ou eucaryote fonctionnelle ou non dans la cellule cible, un ou plusieurs gènes marqueurs, des séquences régulatrices de la transcription ou de la réplication, des gènes d'intérêt thérapeutique, des séquences antisens modifiées ou non, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc...

10 De préférence, l'acide nucléique comprend un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique sous contrôle de séquences de régulation, par exemple un ou plusieurs promoteurs et un terminateur transcriptionnel actifs dans les cellules cibles.

Au sens de l'invention, on entend par gène d'intérêt thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit

15 protéique ainsi codé peut être notamment une protéine ou un peptide. Ce produit protéique peut être exogène homologue ou endogène vis-à-vis de la cellule cible, c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie. Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou

20 l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène d'intérêt thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc... Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou

25 apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines et cytokines et leurs inhibiteurs ou leurs antagonistes (interleukines,

interférons, TNF, les antagonistes de l'interleukine 1, les récepteurs solubles de l'interleukine 1 et TNF α , etc... : FR 92/03120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques (BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc...) les apolipoprotéines (ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc... : FR 93/05125), la dystrophine ou une minidystrophine (FR 91/11947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs (p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc... : FR 93/04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation (Facteurs VII, VIII, IX), les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), les gènes de l'hémoglobine ou d'autres transporteurs protéiques, les enzymes du métabolisme, catabolisme etc...

L'acide nucléique d'intérêt thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens ou un ADN codant pour un ARN à fonction de ribozyme, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les gènes thérapeutiques comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet la réalisation soit de vaccins soit de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment pour traiter ou prévenir des infections, par exemples virales ou bactériennes, ou des états cancéreux. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, du

"syncytia forming virus", d'autres virus ou encore de peptides antigéniques spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences permettant l'expression du gène d'intérêt thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc... En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc... Il peut aussi s'agir de promoteur, inductible ou répressible.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter, en particulier en amont du gène d'intérêt thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle. L'acide nucléique peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé vers un compartiment particulier de la cellule.

Les compositions selon l'invention peuvent en outre comporter un ou plusieurs adjuvants capables de s'associer aux complexes composé transfectant/acide nucléique et d'en améliorer le pouvoir transfectant. Dans un autre mode de mise en oeuvre, la présente invention concerne donc des compositions comprenant un acide nucléique, un composé transfectant tel que défini ci-avant et au moins un adjuvant capable de

s'associer aux complexes composé transfectant/acide nucléique et d'en améliorer le pouvoir transfectant. Ces adjuvants qui permettent d'augmenter le pouvoir transfectant des composé selon la présente invention sont avantageusement choisis parmi les lipides (par exemple les lipides neutres, en particulier les phospholipides),
5 les peptides (par exemple des dérivés d'histone, de nucléoline ou de protamine tels que ceux décrits dans WO 96/25508), les protéines (par exemple les protéines de type HMG telles que celles décrites dans WO 97/12051) et/ou les polymères (par exemple des polymères qui permettent de rendre les formulations composé transfectant/acide nucléique « furtives » tel que le polyéthylène glycol (PEG) introduit seul dans la
10 formulation ou sous forme liée à un lipide afin de stabiliser colloïdalement les formulations composé transfectant/acide nucléique, par exemple le PEG-cholestérol). Dans cette optique, les compositions de l'invention peuvent comprendre à titre d'adjuvant, un ou plusieurs lipides neutres, qui possèdent notamment la propriété de former des agrégats lipidiques. Le terme « agrégat lipidique » est un terme générique
15 qui inclus les liposomes de tous types (à la fois unilamellaires et multilamellaires) ainsi que les micelles ou encore des agrégats plus amorphes.

Plus préférentiellement, les lipides neutres utilisés dans le cadre de la présente invention sont des lipides à deux chaînes grasses. De manière particulièrement avantageuse, on utilise des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou
20 dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologiques. Il peuvent être choisis plus particulièrement parmi la dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoylpalmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les distéaroyl, -palmitoyl, -mirystoylphosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois, les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les
25 cérébrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2). Selon une alternative particulièrement préférée, les adjuvants lipidiques utilisés dans le cadre de la présente invention sont choisis parmi DOPE, DOPC, le cholestérol, ou encore les dérivés lipidiques d'agents de
30 surface non-ioniques tels que le PEG-cholestérol.

Ces différents lipides peuvent être obtenus soit par synthèse, soit par extraction à partir d'organes (par exemple le cerveau) ou d'œufs, par des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. En particulier, l'extraction des lipides naturels peut être réalisée au moyen de solvants organiques (voir également
5 Lehninger, Biochemistry).

Préférentiellement, les compositions de l'invention comprennent de 0,01 à 20 équivalents d'adjuvant pour un équivalent d'acide nucléique en mol/mol et, plus préférentiellement, de 0,5 à 5 équivalents molaires.

Selon une autre alternative, les adjuvants cités ci-avant permettant d'améliorer
10 le pouvoir transfectant des compositions selon la présente invention, notamment les peptides, les protéines ou certains polymères tels que le polyéthylène glycol, peuvent être conjugués aux composés transfectants selon l'invention, et non pas simplement mélangés. Notamment, le PEG peut être lié covalamment aux dérivés lipidiques d'aminoglycoside selon la présente invention soit au niveau d'une amine restante de
15 l'aminoglycoside, soit au niveau des radicaux hydroxyles de l'aminoglycoside.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, les compositions selon la présente invention comprennent en outre un élément de ciblage permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique. Cet élément de ciblage peut être un élément de ciblage extracellulaire permettant d'orienter le transfert de l'acide
20 nucléique vers certains, types cellulaires ou certains tissus souhaités (cellules tumorales, cellules hépatiques, cellules hématopoïétiques...). Il peut également s'agir d'un élément de ciblage intracellulaire permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique vers certains compartiments cellulaires privilégiés (mitochondries, noyau etc...). L'élément de ciblage peut être mélangé aux composés transfectants selon
25 l'invention et aux acides nucléiques, et dans ce cas l'élément de ciblage est de préférence lié covalamment à une chaîne aliphatique grasse (au moins 10 atomes de carbone) ou à un polyéthylène glycol. Selon une autre alternative, l'élément de ciblage est lié covalamment au composé transfectant selon l'invention, soit sur l'une des fonctions chimiques qui composent l'espaceur Y, soit à l'extrémité de la partie

lipidique (par exemple à l'extrémité de R₁ et/ou R₂ lorsque ceux-ci représentent des chaînes aliphatiques grasses), soit directement sur l'aminoglycoside au niveau d'une des amines restantes ou au niveau des radicaux hydroxyles. Enfin, l'élément de ciblage peut également être lié à l'acide nucléique comme cela a été précisé précédemment.

Parmi les éléments de ciblage utilisables dans le cadre de l'invention, on peut citer les sucres, les peptides, les protéines, les oligonucléotides, les lipides, les neuromédiateurs, les hormones, les vitamines ou leurs dérivés. Préférentiellement, il s'agit de sucres, de peptides, de vitamines ou de protéines tels que par exemple des anticorps ou des fragments d'anticorps, des ligands de récepteurs cellulaires ou des fragments de ceux-ci, des récepteurs ou encore des fragments de récepteurs. Par exemple, il peut s'agir de ligands de récepteurs de facteurs de croissance, de récepteurs de cytokines, de récepteurs de type lectines cellulaires, de récepteurs au folate, ou de ligands à séquence RGD avec une affinité pour les récepteurs de protéines d'adhésion comme les intégrines. On peut également citer les récepteurs de la transferrine, des HDL et des LDL, ou le transporteur du folate. L'élément de ciblage peut également être un sucre permettant de cibler des lectines tels que les récepteurs aux asialoglycoprotéines ou aux sialydés tel que le Sialyl Lewis X, ou encore un fragment Fab d'anticorps, ou un anticorps simple chaîne (ScFv).

L'invention a également pour objet l'utilisation des composés transfectants selon la présente invention pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*. Plus précisément, la présente invention a pour objet l'utilisation des composés transfectants tels que définis dans le cadre de l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à traiter les maladies, en particulier les maladies qui résultent d'une déficience en un produit protéique ou nucléique. Le polynucléotide contenu dans ledit médicament code ledit produit protéique ou nucléique, ou constitue ledit produit nucléique, apte à corriger lesdites maladies *in vivo* ou *ex vivo*.

Pour des utilisations *in vivo*, par exemple en thérapie ou pour l'étude de la régulation de gènes ou la création de modèles animaux de pathologies, les compositions selon l'invention peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, cutanée, orale, rectale, vaginale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, intratrachéale, intrapéritonéale, etc... De préférence, les compositions de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses d'acides nucléiques utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. En ce qui concerne plus particulièrement le mode d'administration, il peut s'agir soit d'une injection directe dans les tissus, par exemple au niveau des tumeurs, soit d'une injection dans les voies circulatoires, soit encore d'un traitement de cellules en culture suivi de leur réimplantation *in vivo*, par injection ou greffe. Les tissus concernés dans le cadre de la présente invention sont par exemple les muscles, la peau, le cerveau, les poumons, la trachée, le foie, la rate, la moelle osseuse, le thymus, le cœur, la lymphe, le sang, les os, les cartilages, le pancréas, les reins, la vessie, l'estomac, les intestins, les testicules, les ovaires, le rectum, le système nerveux, les yeux, les glandes, les tissus conjonctifs, etc...

Un autre objet de la présente invention concerne une méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules comprenant les étapes suivantes :

- (1) la mise en contact de l'acide nucléique avec un composé transfectant selon la présente invention, pour former un complexe, et
- (2) la mise en contact des cellules avec le complexe formé en (1).

L'invention concerne en outre une méthode de traitement du corps humain ou animal comprenant les étapes suivantes :

- (1) la mise en contact de l'acide nucléique avec un composé transfectant selon la présente invention, pour former un complexe, et
- 5 (2) la mise en contact des cellules du corps humain ou animal avec le complexe formé en (1).

La mise en contact des cellules avec le complexe peut être réalisée par incubation des cellules avec ledit complexe (pour des utilisations *in vitro* ou *ex vivo*), ou par injection du complexe dans un organisme (pour des utilisations *in vivo*). D'une
10 manière générale, la quantité d'acide nucléique destinée à être administrée dépend de très nombreux facteurs tels que par exemple la maladie à traiter ou à prévenir, la nature même de l'acide nucléique, la force du promoteur, l'activité biologique du produit exprimé par l'acide nucléique, de la condition physique de l'individu ou de l'animal (poids, âge ...), du mode d'administration et du type de formulation. En
15 général, l'incubation est réalisée de préférence en présence de par exemple de 0,01 à 1000 µg d'acide nucléique pour 10⁶ cellules. Pour une administration *in vivo*, des doses d'acide nucléique allant de 0,01 à 50 mg peuvent par exemple être utilisées. L'administration peut être effectuée en dose unique ou répétée par intervalle.

Dans le cas où les compositions de l'invention contiennent en outre un ou
20 plusieurs adjuvants tels que définis précédemment, le ou les adjuvants sont préalablement mélangés au composé transfectant selon l'invention et/ou à l'acide nucléique. Alternativement, le ou les adjuvants peuvent être administrés préalablement à l'administration des complexes nucléolipidiques.

Selon une autre alternative avantageuse, les tissus peuvent être soumis à un
25 traitement chimique ou bien physique destiné à améliorer la transfection. Dans le cas du traitement physique, celui-ci peut utiliser des impulsions électriques comme dans le cas de l'électrotransfert, ou bien des forces mécaniques comme dans le cas de la sodoporation.

La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement avantageuse pour le transfert d'acides nucléiques *in vivo*, notamment pour le traitement de maladies, comprenant l'administration *in vivo* ou *ex vivo* d'un acide nucléique codant pour une protéine ou pouvant être transcrit en un acide nucléique apte à corriger ladite
5 maladie, ledit acide nucléique étant associé à un composé transfectant selon l'invention dans les conditions définies ci-avant.

Les composés transfectants de l'invention sont particulièrement utiles pour le transfert d'acides nucléiques dans des cellules primaires ou dans des lignées établies. Il peut s'agir de cellules fibroblastiques, musculaires, nerveuses (neurones, astrocytes,
10 cellules gliales), hépatiques, hématopoïétiques (lymphocytes, CD34, dendritiques, etc...), épithéliales etc..., sous forme différenciée ou pluripotente (précurseurs).

Un autre objet de la présente invention concerne également les kits de transfection qui comprennent un ou plusieurs composés transfectants selon l'invention et leurs mélanges. De tels kits peuvent se présenter sous forme d'un emballage
15 compartimenté de façon à recevoir différents récipients tels que par exemple des ampoules ou des tubes. Chacun de ces récipients comprend les différents éléments nécessaires pour effectuer la transfection, individuellement ou mélangés : par exemple un ou des composé(s) transfectant(s) selon l'invention, un ou des acide(s) nucléique(s), un ou des adjuvant(s), des cellules, etc...

20 Outre les dispositions qui précèdent, la présente invention comprend également d'autres caractéristiques et/ou avantages qui ressortiront des exemples et figures qui suivent, et qui doivent être considérés comme illustrant l'invention sans en limiter la portée. Notamment, la Demanderesse propose à titre non-limitatif un protocole opératoire ainsi que des intermédiaires réactionnels susceptibles d'être mis en oeuvre
25 pour préparer les composés transfectant selon l'invention. Bien entendu, il est à la portée de l'homme du métier de s'inspirer de ce protocole ou produits intermédiaires pour mettre au point des procédés analogues en vue de conduire à ces mêmes composés.

FIGURES

Figure 1 : courbes dose-réponse de l'activité de transfection *in vitro* du composé transfectant « KanaChol ». L'expression du gène reporter est indiquée en fonction du rapport de charge des lipoplexes formé avec l'ADN plasmidique. Les cellules HeLa, HEK293 et COS ont été transfectées conformément au protocole décrit dans l'exemple 3 en utilisant des lipoplexes préparés en mélangeant 5 µg d'ADN plasmidique exprimant la luciférase avec la quantité requise de lipide. Les données sont exprimées en unité de lumière relative (« RLU ») par mg de protéines cellulaires.

Figure 2 : courbes dose-réponse de l'activité de transfection *in vitro* des liposomes KanaChol/DOPE (rapport molaire 1:1). L'expression du gène reporter est indiquée en fonction du rapport de charge des lipoplexes formé avec l'ADN plasmidique. Les cellules HeLa, HEK293 et COS ont été transfectées conformément au protocole décrit dans l'exemple 4 en utilisant des lipoplexes préparés en mélangeant 5 µg d'ADN plasmidique exprimant la luciférase avec la quantité requise de lipide pour former des lipoplexes caractérisés par le rapport de charge indiqué. Les données sont exprimées en unité de lumière relative (« RLU ») par mg de protéines cellulaires.

Figure 3 : cytotoxicité du composé transfectant KanaChol. Des cellules HeLa ont été transfectées conformément au protocole décrit dans l'exemple 3 en utilisant des lipoplexes préparés en mélangeant 5 µg d'ADN plasmidique exprimant la luciférase avec la quantité requise de lipide pour former des lipoplexes caractérisés par le rapport de charge indiqué. A 48 heures post-transfection, les cellules ont été récupérées et la toxicité a été quantifiée en utilisant la quantité totale de protéines cellulaires dans le lysat cellulaire comme index du nombre de cellules, la mort cellulaire conduisant à une diminution des protéines extractibles. Le total des protéines cellulaires dans le lysat cellulaire est indiqué en fonction du rapport de charge des lipoplexes. Les données sont exprimées en concentration en protéines cellulaires extractibles dans le lysat cellulaire (à volume fixé).

Figure 4 : cytotoxicité des liposomes KanaChol/DOPE (rapport molaire 1:1). Des cellules HeLa ont été transfectées conformément au protocole décrit dans l'exemple 4

en utilisant des lipoplexes préparés en mélangeant 5 µg d'ADN plasmidique exprimant la luciférase avec la quantité requise de lipide pour former des lipoplexes caractérisés par le rapport de charge indiqué. A 48 heures post-transfection, les cellules ont été récupérées et la toxicité a été quantifiée en utilisant la quantité totale de protéines cellulaires dans le lysat cellulaire comme index du nombre de cellules, la mort cellulaire conduisant à une diminution des protéines extractibles. Le total des protéines cellulaires dans le lysat cellulaire est indiqué en fonction du rapport de charge des lipoplexes. Les données sont exprimées en concentration en protéines cellulaires extractibles dans le lysat cellulaire (à volume fixé).

Figure 5 : Expression de la luciférase dans différentes lignées cellulaires transfectées soit avec le composé transfectant KanaChol, soit avec les liposomes KanaChol/DOPE (1:1). Les différentes lignées cellulaires ont été transfectées conformément au protocole décrit dans l'exemple 5 en utilisant soit des lipoplexes KanaChol/ADN soit des lipoplexes KanaChol/DOPE/ADN (avec un rapport de charge positif 3-5) préparés en mélangeant 5 µg d'ADN plasmidique exprimant la luciférase et la quantité requise de lipide pour obtenir un rapport de charge positif 3-5. Les données sont exprimées en unité de lumière relative (« RLU ») par mg de protéines cellulaires.

Figure 6: Expression de la luciférase dans différentes lignées cellulaires transfectées avec les liposomes TGKC/DOPE (rapport molaire 1:1). Les différentes lignées cellulaires ont été transfectées conformément au protocole décrit dans l'exemple 6 en utilisant des lipoplexes TGKC/DOPE/ADN (avec un rapport de charge positif 3-5) préparés en mélangeant 5 µg d'ADN plasmidique exprimant la luciférase et la quantité requise de lipide pour obtenir un rapport de charge positif 3-5. Les données sont exprimées en unité de lumière relative (« RLU ») par mg de protéines cellulaires.

Figure 7 : Expression du gène CAT dans les voies aériennes de la souris suite à l'instillation de lipoplexes KanaChol/DOPE/ADN stabilisé par du Chol-PEG (molécule hybride pour laquelle un polyéthylène glycol est lié covalamment au cholestérol). Ces liposomes, caractérisés par un rapport de charge positif de 3,75 et un rapport poids/poids en Cholestérol-PEG/ADN de 2, ont été utilisés pour délivrer une

dose totale de 100 µg d'ADN plasmidique exprimant le gène CAT. Une instillation intranasale a été réalisée, puis la trachée et les poumons des souris traitées ont été prélevés afin de mesurer l'expression CAT selon la méthode décrite dans l'exemple 7. Les données sont exprimées en ng de protéine CAT / 100 mg de protéines cellulaires totales.

Figure 8 : Représentation schématique du plasmide pCMV-Luc

Figure 9 : Représentation schématique du plasmide pCIK-CAT

EXEMPLES

Les réactifs et catalyseurs tels que la triéthylamine, l'acide trifluoroacétique, l'acide *p*-toluène sulfonique, l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium (PyBOP), dicyclohexylcarbodiimide (DCC), le disulfure de carbone, le palladium sur charbon, la tétradécylamine, le di-*tert*-butyl dicarbonate, la 4-diméthylaminopyridine, la diisopropyléthylamine, le N-benzyloxycarbonyloxy-5-norbornene-2,3-dicarboximide, le carbonate de 2-(triméthylsilyl)éthyle *p*-nitrophényle, le cholestéryl chloroformiate sont disponibles commercialement, ainsi que la Kanamycin A. En outre, la N,N'-bis-*tert*-butoxycarbonylthiourée a été préparée conformément à la procédure publiée dans *Synth. Commun.* (1993), 23, pp. 1443-1445.

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire du Proton (RMN ¹H) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker 200 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (partie par million) et les multiplicités par les abréviations usuelles

Les plasmides utilisés sont :

- le pCMV-Luc décrit dans la publication de Patel et al. (BBRC, 2001, 6, pp. 536-543), qui contient le gène luc codant pour la luciférase sous contrôle du promoteur ultraprécoce CMV du cytomégalovirus. Ce plasmide est représenté à la figure 8. Il a été construit en sous-clonant le promoteur CMV (à partir du

plasmide pcDNA3 de Invitrogen) en amont du gène luc dans le plasmide pGL2-Basic (Promega). Sa taille est de 6255 bp.

- le pCIK-CAT (pour les transfections *in vivo*) obtenu de D. Giel (Oxford, UK) et qui est décrit par Pitard et al. (J. Med. Chem., sous presse). Il a été construit en sous-clonant le gène CAT de E. Coli dans le plasmide pCI (Promega). Ce plasmide est représenté à la figure 9. Sa taille est de 4697 bp.

Exemple 1 : Synthèse du 3β[6'-kanamycin-carbamoyl]cholestérol (« KanaChol »)

a) Synthèse de la [(1,3,3''-triamino)-6'-N-(benzyloxycarbonyl)]kanamycine A

- 10 A une solution de kanamycine A sous forme de base libre (8g ; 16,5 mmol) dans un mélange de diméthylsulfoxyde (800 ml) et d'eau (80 ml), on ajoute du N-benzyloxycarbonyloxy-5-norbornène-2,3-dicarboximide (5,18 g ; 16,5 mmol) et de la triéthylamine (1,67 g ; 16,5 mmol). Après une nuit sous agitation à température ambiante, un important précipité s'est formé et l'analyse du mélange réactionnel par
- 15 CCM (chromatographie sur couche mince) révèle la présence de produits n'ayant pas réagi. On ajoute alors à nouveau de l'eau (640 ml) jusqu'à ce que le mélange devienne homogène, puis du N-benzyloxycarbonyloxy-5-norbornène-2,3-dicarboximide (2,6 g ; 8,3 mmol). Après 4 jours d'agitation, les solvants sont évaporés sous vide et le résidu est chromatographié sur une colonne de silice avec un
- 20 éluant variant d'un mélange dichlorométhane/méthanol/ammoniac (5/4/1) à un mélange méthanol/ammoniac (9/1). En évaporant les solvants des fractions concernées, on récupère le composé attendu (7,15 g ; 70 %).

b) Synthèse de la [(1,3,3''-triaz-(triméthylsilyl)-éthoxycarbonyl)]-[6'-N-(benzyloxycarbonyl)]kanamycine A (« Kana-tri[Teoc]-mono[Cbz] »)

- 25 A une solution de Kana-mono[Cbz] (0,5 g ; 0,81 mmol) dans un mélange eau (7 ml)/dioxane (16 ml), on ajoute de la triéthylamine (0,25 g ; 3 équivalents ; 2,42 mmol) et du carbonate mixte de 2-(triméthylsilyl)éthyle et de *p*-nitrophényle

(0,92 g ; 4 équivalents ; 3,23 mmol). Le mélange est agité à 55°C pendant 48 heures et, après concentration, la suspension obtenue est versée dans du butanol présaturé d'eau (60 ml). Après plusieurs lavages par une solution de soude 1N (800 ml) et par une solution saturée de chlorure de sodium, la phase butanolique est évaporée à sec.

- 5 En ajoutant au résidu un mélange de méthanol et d'acétone et en concentrant la solution ainsi obtenue, on obtient le produit désiré sous forme d'une poudre jaune (0,73 g ; 86 %).

c) Synthèse de la [(1,3,3''-triaz-(triméthylsilyl)-éthoxycarbonyl)]kanamycine A (« Kana-tri[Teoc]-NH₂ »)

- 10 A une solution dégazée de Kana-tri[Teoc]-mono[Cbz] (0,3 g ; 0,29 mmol) dans du méthanol, (25 ml), on ajoute du palladium sur charbon (Pd/C à 10 % ; 0,3 g) et on fait barboter un courant d'hydrogène dans le mélange pendant 1 heure. Celui-ci est encore agité pendant une nuit sous atmosphère d'hydrogène, puis la suspension est filtrée sur de la célite et évaporée à sec. On obtient ainsi le produit désiré sous forme d'un solide
- 15 blanc (0,23 g ; 90 %).

d) Synthèse de la [(1,3,3''-triaz-(triméthylsilyl)-éthoxycarbonyl)]-[6'-N-(3-oxocarbonyl cholestéryl)] kanamycine A (« Kana-tri[Teoc]-Chol »)

- A une solution de Kana-tri[Teoc]-NH₂ (0,1 g ; 0,11 mmol) dans un mélange de tétrahydrofurane (5 ml) et de diméthylformamide (2 ml), on ajoute de la
- 20 triéthylamine (1,5 équivalents ; 0,017 g ; 0,16 mmol) et du chloroformiate de cholestéryle (1,5 équivalents ; 0,074 g ; 0,16 mmol). On agite à la température ambiante pendant 48 heures avant de concentrer sous pression réduite jusqu'à ce que seul le diméthylformamide reste. En ajoutant de l'eau à cette solution, il se forme un précipité blanc que l'on filtre (0,12 g ; 83 %).

- 25 e) Synthèse du trifluoroacétate de 1,3,3''-triamino-6'-N-(3-oxocarbonyl cholestéryl) kanamycine A (« Kanachol »)

Le Kana-tri[Teoc]-Chol obtenu à l'étape précédente (0,070 g ; 0,053 mmol) est suspendu pendant 45 minutes dans de l'acide trifluoroacétique maintenu à 0°C dans un bain de glace. Après retour à la température ambiante, le mélange est concentré à sec. Le résidu est repris dans du méthanol et à nouveau concentré à sec. En répétant
 5 cette opération à plusieurs reprises, on obtient le Kanachol sous forme d'un solide blanc (0,063 g ; 97 %).

RMN ¹H (CD₃OD) : δ (ppm) 5,32 (m, 1H, H anomérique) ; 5,09 (m, 1H, H du cholestérol) ; 4,97 (m, 1H, H anomérique) ; 4,30 (m, 1H, H du cholestérol) ; 3,85-2,98 (m, 16H, divers protons des cycles glycosidiques) ; 2,30-0,81 (m, 44H, divers
 10 protons des cycles glycosidiques et du noyau cholestérol) ; 0,63 (s, 3H, CH₃ du cholestérol).

Exemple 2 : Synthèse du 3β[6'-(1,3,3''-triguanidino)kanamycin-carbamoyl]-cholestérol (« TGKC »)

a) Synthèse de la [1,3,3''-triaza-(N,N'-bis-*tert*-butoxycarbonyldiaminométhylène)-6'-
 15 *N*-(3-oxocarbonyl cholestéryl) kanamycine A (« Kana-tri[GuanBoc]-Chol »)

A une solution de Kanachol obtenu selon le protocole de l'exemple précédent (0,15 g ; 0,12 mmol) dans le diméthylformamide (10 ml), on ajoute successivement de la triéthylamine (30 équivalents ; 0,36 g ; 3,63 mmol), de la N,N'-bis-*tert*-butoxycarbonylthiourée (3,5 équivalents ; 0,117 g ; 0,42 mmol) et du chlorure
 20 mercurique (3,5 équivalents ; 0,115 g ; 0,42 mmol). Le mélange est agité à température ambiante et sous atmosphère inerte pendant 48 heures. La solution est alors versée dans un mélange d'eau et d'acétate d'éthyle et la phase aqueuse est extraite 4 fois à l'acétate d'éthyle. Après lavage avec une solution saturée de chlorure de sodium et séchage sur sulfate de sodium, les fractions organiques réunies sont
 25 concentrées à sec. Le produit souhaité est obtenu sous forme d'une poudre blanche (0,1 g ; 51 %).

b) Synthèse du sel de triflate de [1,3,3''-triaza-(N,N'-bis-diaminométhylène)-6'-*N*-(3-oxocarbonyl cholestéryl) kanamycine A (« Kana-tri[Guan]-Chol » ou « KTGC »)

Le Kana-tri[GuanBoc]-Chol obtenu à l'étape précédente (0,060 g ; 0,037 mmol) est mis en suspension dans de l'acide trifluoroacétique maintenu dans un bain de glace. Après 2,5 heures à 0°C puis retour à température ambiante, le mélange est concentré à sec. Le résidu rouge-brun est repris dans du méthanol puis concentré à nouveau à sec. Cette opération est renouvelée 3 fois. On ajoute alors du pentane et le mélange est soumis à une sonification de façon à obtenir une fine suspension qui est alors centrifugée. On récupère ainsi 0,030 g de KTGC pur (rendement : 60%).

RMN ^1H (D_2O) : δ (ppm) 5,48 (m, 1H, H anomérique) ; 5,05 (m, 1H) ; 3,97 (m, 1H, H du cholestérol) ; 3,70-2,60 (m, divers protons des cycles glycosidiques) ; 2,18-0,80 (m, divers protons des cycles glycosidiques et du noyau cholestérol).

Exemple 3 : Courbes dose-réponse de la transfection *in vitro* du composé transfectant KanaChol en milieu aqueux

Le but de cet exemple est d'illustrer la capacité des composés transfectants selon l'invention à transfecter des cellules *in vitro*.

Cette étude a été menée pour des lipoplexes comprenant différentes quantités de KanaChol : 6,6 ou 13,2 ou 33 ou 66 ou 132 nmoles de KanaChol pour 5 μg d'ADN. Afin de déterminer le rapport de charge moyen théorique, il a été considéré que 1 μg d'ADN représente 3 nmol de charges négatives et que 3 groupes amino de la kanamycine sont protonés à pH neutre lors de la formation des lipoplexes et de la transfection. En fait, des études de retard électrophorétique sur gel de la kanamycine complexée avec des acides nucléiques suggèrent que la charge positive moyenne du KanaChol serait plutôt de 2-3.

Préparation des lipoplexes KanaChol/ADN : le KanaChol obtenu selon l'exemple 1 est dissout dans une solution tampon Hepes à 20 mM (pH 7,4) à une concentration de 20 mM en charges positives (en considérant que 3 fonctions amino sont protonées à pH neutre). Puis, les lipoplexes sont préparés conformément au protocole décrit par Vigneron et al. (*PNAS*, 93, pp. 9682-9686, Sept. 1996) ou par Patel et al. (*Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 281, pp. 536-543, 2001).

Culture des cellules : des cellules HeLa (American type Culture Collection (ATCC) Rockville, MD, USA) dérivées d'un carcinome d'épithélium cervical humain, sont mises en culture en présence d'un milieu de type MEM (« minimum essential medium ») supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et des antibiotiques. Le milieu et les additifs proviennent de Gibco/BRL life Technologies (Gaithersburg, MD, USA). Les cellules sont cultivées en flacons à 37°C et à 5 % de dioxyde de carbone en incubateur. La même procédure est utilisée pour les cellules HEK293 et COS.

Transfection : un jour avant la transfection, les cellules HeLa sont transférées dans des plaques de 6 puits avec un nombre de cellules d'environ 250 000 par puits. Ces dilutions représentent approximativement 80% de confluence après 24 heures. Pour la transfection, les cellules sont lavées deux fois et incubées à 37°C avec 500 µl de milieu sans sérum. 500 µl de complexes contenant 5 µg d'ADN plasmidique sont ajoutés dans chaque puit (les complexes sont préparés au moins 30 minutes avant l'ajout dans les puits). Après six heures à 37°C les plaques sans sérum sont complémentées avec 10 % (v/v) de SVF (« Sérum de Veau Fœtal »). L'ensemble des plaques est placé 24 heures à 37°C et à 5 % de dioxyde de carbone.

Ce protocole est analogue à ceux décrits par Vigneron et al. (*PNAS*, 93, pp. 9682-9686, Sept. 1996) ou par Patel et al. (*Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 281, pp. 536-543, 2001).

Détermination de l'activité luciférase : Brièvement, les cellules transfectées sont lavées deux fois avec 500 µl de PBS (tampon phosphate) puis lysées avec 250 µl de réactif (triphosphate 25 mM, pH 7,8 / MgCl₂ 8 mM / dithiothreitol 1 mM / glycérol 15 % / triton X-100 1 %). Le lysat est alors clarifié par centrifugation (15 minutes à 15 °C) dans une microcentrifugeuse.

Un aliquote de 20 µl de surnageant du lysat centrifugé est dilué dans 100 µl de tampon de lyse, auquel on ajoute 4 µl d'ATP 25 mM (Sigma) et 20 µl de luciférine 25 mM (Sigma) . Les échantillons sont alors placés dans un luminomètre Lumet

LB9501 (Berthold, Nashua, NH) et la valeur d'intégration de l'émission de lumière est mesurée pendant 10 secondes.

L'activité luciférase est ainsi exprimée en Unité de Lumière Relative («RLU» : «Relative light unit») et normalisée avec la concentration de protéines de l'échantillon obtenue par l'utilisation d'un kit Biorad.

Ce protocole est analogue à celui décrit par Vigneron et al. (*PNAS*, 93, pp. 9682-9686, Sept. 1996) ou par Patel et al. (*Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 281, pp. 536-543, 2001).

Les résultats pour les 3 lignées cellulaires résumés dans la Figure 1 montrent des taux d'expression élevés avec une efficacité de transfection optimale pour les lipoplexes ayant un rapport de charge moyen théorique d'environ 5. La transfection est la plus élevée dans la lignée cellulaire COS.

Un contrôle a également été réalisé avec des complexes formés entre la kanamycine (non-liée à un dérivé de cholestérol) et l'ADN : aucune transfection n'a été observée.

Ces données démontrent donc que le KanaChol permet d'effectuer une transfection efficace de l'ADN dans les cellules *in vitro*. Ces résultats sont également cohérents avec l'hypothèse que la transfection est liée à l'interaction électrostatique entre les lipoplexes positifs et la surface cellulaire globalement négative.

La figure 1 montre également que l'efficacité de transfection diminue pour des rapports de charge très élevés (supérieurs à environ 7). Cette diminution pourrait refléter un certain effet toxique des lipides cationiques en général, et donc du KanaChol en particulier, lorsqu'il sont utilisés en grande quantité.

Ainsi, la cytotoxicité du KanaChol a également été mesurée à différents rapports de charges avec l'ADN. La toxicité a été quantifiée en utilisant la quantité totale de protéines cellulaires dans le lysat cellulaire par puit comme index du nombre de cellules. Une diminution de la quantité totale de protéines cellulaires dans le lysat cellulaire par puit correspond à la diminution du nombre de cellules et témoigne par

conséquent de l'existence d'une certaine toxicité des lipoplexes KanaChol/ADN vis-à-vis des cellules.

Détermination du niveau de protéine : la détermination du niveau de protéine a été effectuée en utilisant le kit Biorad selon un protocole identique à celui décrit par Oudrhiri et al. (*PNAS*, 94, pp. 1651-1656, 1997), et en se conformant aux instructions du fabricant.

Les résultats résumés dans la figure 3 montrent une diminution du nombre de protéines cellulaires extractibles total à rapport de charges élevé, c'est-à-dire une augmentation de la cytotoxicité parallèlement à l'augmentation des concentrations en KanaChol. Ainsi, la diminution de l'activité de transfection à rapports de charges élevés dans les 3 lignées cellulaires testées pourrait être liée à l'existence d'une certaine toxicité du KanaChol utilisé en très grandes quantités.

Exemple 4 : Courbes dose-réponse de la transfection *in vitro* des liposomes KanaChol/DOPE

Le but de cet exemple est d'illustrer la capacité des composés transfectants selon l'invention à transfecter des cellules *in vitro* lorsqu'ils sont formulés sous forme de liposomes avec des lipides neutres.

Fréquemment, les lipides cationiques sont formulés sous forme de liposomes avec du lipide neutre DOPE. On pense en effet que l'utilisation de la DOPE, du fait de ses propriétés fusogéniques, aiderait la transfection en facilitant la sortie des lipoplexes des vésicules endocytiques dans lesquelles ils sont internalisés.. Il a ainsi été montré par Felgner et al. (*J. Biol. Chem.*, 1994, 269, pp. 2550-2561) pour une série de lipides cationiques que leur formulation avec 50% de DOPE permettait d'augmenter l'efficacité de transfection de 2 à 5 fois par rapport à des formulations sans lipide zwitterionique.

C'est pourquoi des liposomes KanaChol/DOPE (1 :1 molaire) ont été préparés de la façon suivante : un mélange de KanaChol et de DOPE (rapport molaire 1 :1) dans du chloroforme est évaporé sous vide et resuspendu dans une solution tampon

Hepes à 20 mM (pH 7,4). La concentration finale en lipides est de 5 mg/ml. Le mélange est ensuite soniqué pendant 10 minutes en utilisant un appareil à ultrasons Branson Sonifier 450 équipé d'un terminal Sonifier Cell Disruptor B-30, pour obtenir des liposomes. La solution résultante est refroidie à température ambiante avant
5 filtration à travers un filtre de 0,22 µm (Millex GS, Millipore).

De la même façon qu'à l'exemple précédent, cette étude a été menée pour des liposomes comprenant différentes quantités de KanaChol de façon à mesurer l'efficacité de transfection à rapports de charges moyens théoriques variables, dans les 3 lignées cellulaires HeLa, HEK293 et COS.

10 Les résultats résumés dans la figure 2 montrent des niveaux d'expression élevés de la luciférase pour les 3 lignées cellulaires. Ces niveaux de transfection sont tout à fait comparables à ceux obtenus avec les formulations de KanaChol seul (sans DOPE), ce qui pourrait s'expliquer par le fait que les 3 lignées cellulaires utilisées sont très facilement transfectables. En revanche, on observe qu'il n'y a pas de
15 diminution claire de l'activité de transfection à rapports de charges élevés lorsqu'on utilise des liposomes KanaChol/DOPE/ADN.

Ainsi, la cytotoxicité des liposomes KanaChol/DOPE a également été mesurée à différents rapports de charges avec l'ADN, selon un protocole analogue à celui décrit à l'exemple précédent. Les données résumées à la figure 4 indiquent que ces
20 formulations liposomales ne présentent pas de toxicité apparente à rapports de charges élevés. Il apparaît donc que le KanaChol, utilisé en formulation liposomale, est un vecteur de transfection à la fois efficace et non toxique.

Exemple 5 : Spectres de l'activité de transfection *in vitro* du composé transfectant KanaChol et des liposomes KanaChol/DOPE

25 Le but de cet exemple est d'illustrer la capacité des composés transfectants selon l'invention à transfecter d'autres types cellulaires *in vitro*, qu'ils soient utilisés seuls ou sous forme de liposome avec de la DOPE.

Les expériences de transfection *in vitro* menées dans les exemples 3 et 4 ont à nouveau été effectuées de manière similaire, mais avec d'autres lignées cellulaires moins usuelles (l'espèce et la spécificité de chaque lignée cellulaire sont indiquées à la Figure 5). Les formulations KanaChol/ADN et KanaChol/DOPE/ADN sont
5 utilisées à des rapports de charges compris entre 3 et 5 (valeurs optimales telles que définies aux exemples 3 et 4). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau de la figure 5.

Il apparaît que la formulation KanaChol/DOPE (rapport molaire 1 :1) induit une efficacité de transfection élevée pour toutes les lignées cellulaires, le KanaChol
10 utilisé seul (sans DOPE) étant globalement moins efficace, en particuliers dans les lignées cellulaires 16HBE et HepG2. Il semble donc que l'utilisation de la DOPE aurait un effet bénéfique sur l'efficacité de transfection.

Exemple 6 : Activité de transfection *in vitro* des liposomes TGKC/DOPE

Le but de cet exemple est d'illustrer la capacité des composés transfectants
15 polyguanidylés selon l'invention (formulés sous forme de liposomes) à transfecter des cellules *in vitro*.

Des formulations TGKC/DOPE (rapport molaire 1 :1) obtenues de façon analogue au protocole décrit dans l'exemple 4 sont ainsi utilisées pour transfecter *in vitro* différentes lignées cellulaires (COS, HeLa, NIH3T3 et MITC), selon des
20 méthodes de transfection similaires à celles décrites dans les exemples précédents. Le rapport de charge des lipoplexes TGKC/DOPE/ADN a été fixé entre 3 et 5, c'est-à-dire à des valeurs qui s'étaient révélées optimales précédemment avec le KanaChol. Naturellement, afin de déterminer le rapport de charges moyen théorique, il a été considéré que les 3 groupes guanidiniums du TGKC sont chargés positivement à pH
25 neutre (du fait du pKa élevé des fonctions guanidiniums).

Les résultats résumés à la figure 6 montrent clairement que les liposomes TGKC/DOPE permettent de transfecter efficacement les différentes lignées cellulaires testées.

Exemple 7 : Transfert de gènes *in vivo* dans les voies aériennes de la souris par les liposomes KanaChol/DOPE/Chol-PEG

Cet exemple illustre la capacité des composés transfectants selon l'invention à transfecter l'ADN dans des cellules *in vivo*.

- 5 Le transfert de gène *in vivo* a été effectué avec 50 µl de liposomes KanaChol/DOPE stabilisés par du Chol-PEG dans les voies aériennes de souris femelles BALB/c ayant un poids de 30 g (administration intranasale). Chaque animal a reçu 3 doses à des intervalles d'environ 4 heures, soit une quantité totale de 100 µg d'ADN plasmidique pCIK-CAT.
- 10 Les formulations utilisées ont été préparées de la façon suivante : des liposomes KanaChol/DOPE sont préparés selon le protocole décrit dans l'exemple 4. Puis on ajoute une solution de stabilisant stérique Chol-PEG (un cholestérol lié à une chaîne de polyéthylène glycol contenant environ 100 unités d'oxyéthylène) immédiatement avant le mélange avec l'ADN plasmidique pCIK-CAT en solution
- 15 aqueuse. La concentration en ADN est ainsi d'approximativement 0,6 mg/ml et le rapport de charges positif est de 3,75. Le rapport final Chol-PEG/ADN est alors de 2 (poids/poids). L'utilisation de Chol-PEG permet l'obtention de solutions stables colloïdalement, ce qui permet d'avoir une efficacité de transfection très élevée dans les voies aériennes de la souris *in vivo* par instillation intranasale des formulations
- 20 liposomales.

- Le gène reporter utilisé dans le cas présent est le gène CAT (« *Escherichia Coli* chloramphénicol acetyltransferase »). L'administration dans les voies aériennes est effectuée par instillation intranasale. 48 heures post-transfection, les animaux sont tués et les poumons et la trachée sont prélevés séparément pour analyse. Les
- 25 morceaux de tissus sont placés dans un tampon TEN (40 mM de Tris-HCl, 1 mM d'EDTA et 150 mM de chlorure de sodium, pH de 7,8) et agités sur de la glace pendant environ 30 secondes en utilisant un agitateur Ultrax-Turrax T25 (Fisher Bioblock Scientific, Strasbourg, France). Les cellules sont ensuite lysées par 3 cycles gel-dégel et un supernageant clair est obtenu par centrifugation. La concentration en

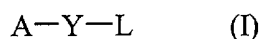
CAT est déterminée en utilisant un essai CAT ELISA effectué conformément aux instructions du fabricant (Boehringer Mannheim). Les niveaux de CAT sont exprimés en ng de protéine CAT pour 100 mg de protéines totales, la concentration en protéines étant déterminée en utilisant un essai Bio-Rad.

- 5 Le tableau de la figure 7 présente les niveaux d'expression du gène CAT obtenus dans les homogénats de trachée et de poumon. L'expression du gène CAT est la plus élevée dans le poumon. La figure 7 indique également que des niveaux très bas d'expression sont obtenus après administration de doses identiques d'ADN « nu » (c'est-à-dire non-formulé). Ces résultats suggèrent que dans les conditions de
- 10 l'expérience, les liposomes KanaChol/DOPE permettent une efficacité de transfection *in vivo*, dans les voies respiratoires de la souris, supérieure à celle obtenue avec de l'ADN nu. Ces résultats sont également tout à fait analogues avec ceux qui avaient été obtenus avec des formulations BGTC/DOPE (décrites dans la demande WO 97/31935), formulations qui s'étaient révélées tout particulièrement efficaces et
- 15 intéressantes pour la transfection des voies respiratoires (Densmore et al., *J. of Gene Med.*, 1999, Vol 1(4)).

REVENDEICATIONS

1. Composé transfectant caractérisé en ce qu'il est constitué d'un aminoglycoside relié à un lipide par l'intermédiaire d'un espaceur, et ses dérivés polyguanidylés, le cas échéant sous forme d'isomère, de mélange ou de sel.

5 2. Composé transfectant selon la revendication 1 de formule générale(I) :



dans laquelle :

- A représente un aminoglycoside ou bien son dérivé polyguanidylé,
- Y représente un espaceur, et
- 10 - L représente :
 - soit un radical $-(R_1)R_2$ avec R_1 et R_2 qui représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou une chaîne aliphatique grasse ou R_1 ou R_2 est absent, étant entendu que l'un au moins de R_1 et de R_2 représente une chaîne aliphatique grasse,
 - 15 • soit un radical $-N-R_3$ ou $-O-R_3$, avec R_3 qui représente un dérivé stéroïdien,

le cas échéant sous forme d'isomère, de mélange ou de sel.

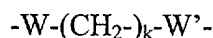
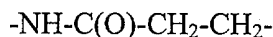
3. Composé transfectant selon les revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que ledit aminoglycoside est choisi parmi l'amikacine, l'arbécacine, la
 20 déoxyhydrostreptomycine, la destomycine A, la dibécacine, la dihydrostreptomycine, la genticine, la gentamicine, l'hygromycine, l'isépamycine, la kanamycine, la micromycine, la paromomycine, la ribostamycine, la streptomycine, la streptonicozide, la néomycine, la tobramycine, la sisomycine, ou les aminosides d'hémisynthèse.

25 4. Composé transfectant selon les revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que ledit espaceur comprend une ou plusieurs fonctions chimiques choisies parmi les alkyles ayant 1 à 6 atomes de carbone, les fonctions cétone, ester, éther, amino, amide,

amidine, carbamate, thiocarbamate, le glycérol, l'urée, la thiourée, ou les cycles aromatiques.

5. Composé transfectant selon la revendication 4 caractérisé en ce que ledit espaceur est choisi parmi les radicaux de formule :

5



10 dans laquelle i, j et k sont des entiers choisis entre 1 et 6 inclus et W et W' sont des groupes identiques ou différents choisis parmi les fonctions cétone, ester, éther, amino, amide, amidine, carbamate, thiocarbamate, le glycérol, l'urée, la thiourée, ou encore les cycles aromatiques,

15 6. Composé transfectant selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que ladite ou lesdites chaînes aliphatiques grasses sont choisies parmi les radicaux alkyle contenant 10 à 22 atomes de carbone et éventuellement une ou plusieurs insaturations.

7. Composé transfectant selon la revendication 6 caractérisé en ce que ladite ou lesdites chaînes aliphatiques grasses sont choisies parmi les radicaux aliphatiques $(CH_2)_{11}CH_3$, $(CH_2)_{13}CH_3$, $(CH_2)_{15}CH_3$ et $(CH_2)_{17}CH_3$.

20 8. Composé transfectant selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que ledit dérivé stéroïdien est un composé polycyclique de type cholestane.

9. Composés transfectant selon la revendication 8 caractérisé en ce que ledit dérivé stéroïdien est choisi parmi le cholestérol, le cholestanol, le 3- α -5-cyclo-5- α -cholestan-6- β -ol, l'acide cholique, le cholestérylformiate, le cholestanylformiate, le 3 α ,5-cyclo-5 α -cholestan-6 β -yl formiate, la cholestérylamine, la 6-(1,5-

25

diméthylhexyl)-3a,5a-diméthylhexadécahydrocyclopenta[a]cyclopropa[2,3]-cyclopenta[1,2-f]naphta-lèn-10-ylamine, ou la cholestanylamine.

10. Composé transfectant selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il s'agit du 3 β [6'-kanamycin-carbamoyl]cholestérol.
- 5 11. Composé transfectant selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il s'agit du 3 β [6'-(1,3,3''-triguanidino)kanamycin-carbamoyl]cholestérol.
12. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend un composé transfectant selon l'une des revendications 1 à 11, et un acide nucléique.
13. Composition selon la revendication 12 caractérisée en ce que l'acide nucléique est
10 un acide désoxyribonucléique ou bien un acide ribonucléique.
14. Composition selon la revendication 12 ou 13 caractérisée en ce que ledit acide nucléique comprend un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique sous contrôle de séquences de régulation.
15. Composition selon les revendications 12 à 14 caractérisée en ce que ledit acide
15 nucléique est un gène ou une séquence antisens.
16. Composition selon l'une des revendications 12 à 15 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un ou plusieurs adjuvants.
17. Composition selon la revendication 16 caractérisée en ce que ledit ou lesdits adjuvant(s) sont choisis parmi les lipides, les peptides, les protéines et/ou les
20 polymères.
18. Composition selon la revendication 17 caractérisée en ce que ledit ou lesdits adjuvant(s) sont choisis parmi les lipides neutres.
19. Composition selon la revendication 18 caractérisée en ce que ledit lipide neutre est choisi parmi les lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de
25 charge ionique dans les conditions physiologiques.

20. Composition selon la revendication 19 caractérisée en ce que ledit lipide neutre est choisi parmi la dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoylpalmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois, les
5 phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérebrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines), les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2), la DOPC et le cholestérol.
21. Composition selon la revendication 17 caractérisée en ce que ledit adjuvant est le
10 polyéthylène glycol (PEG) ou le PEG-Cholestérol.
22. Composition selon l'une des revendications 12 à 21 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un élément de ciblage extracellulaire ou intracellulaire.
23. Composition selon la revendication 22 caractérisée en ce que ledit élément de ciblage est choisi parmi les sucres, les peptides, les protéines, les oligonucléotides, les
15 lipides, les neuromédiateurs, les hormones, les vitamines ou leurs dérivés.
24. Composition selon les revendications 22 ou 23 caractérisée en ce que ledit élément de ciblage est lié covalamment à une chaîne alkyle grasse contenant au moins 10 atomes de carbone ou à un polyéthylène glycol (PEG).
25. Composition selon la revendication 22 caractérisée en ce que ledit élément de
20 ciblage est lié covalamment soit au composé transfectant selon l'une des revendications 1 à 11, soit à l'acide nucléique.
26. Composition selon l'une des revendications 12 à 25 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.
- 25 27. Composition selon l'une des revendications 12 à 25 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une administration sur la peau et/ou les muqueuses.

28. Utilisation d'un composé transfectant selon l'une des revendications 1 à 11 pour le transfert d'acides nucléiques.
29. Utilisation d'une composition selon la revendication 12 pour fabriquer un médicament destiné à soigner les maladies.
30. Méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :
- (1) la mise en contact de l'acide nucléique avec un composé transfectant tel que défini dans les revendications 1 à 11 pour former un complexe, et
 - (2) la mise en contact des cellules avec le complexe formé en (1).
31. Méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules selon la revendication 30 caractérisée en ce que ledit agent de transfert et/ou ledit acide nucléique sont préalablement mélangés à un ou plusieurs adjuvant(s) et/ou à un élément de ciblage tels que définis dans les revendications 17 à 24.
32. Méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules selon la revendication 30 caractérisée en ce que un ou plusieurs adjuvants tels que définis aux revendications 17 à 21 sont préalablement administrés aux cellules.
33. Méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules selon l'une des revendications 30 à 32 caractérisée en ce que les cellules sont en outre soumises à un traitement chimique ou physique.
34. Kit de transfection caractérisé en ce qu'il comprend un ou plusieurs composés transfectants selon l'une des revendications 1 à 11 et leurs mélanges.

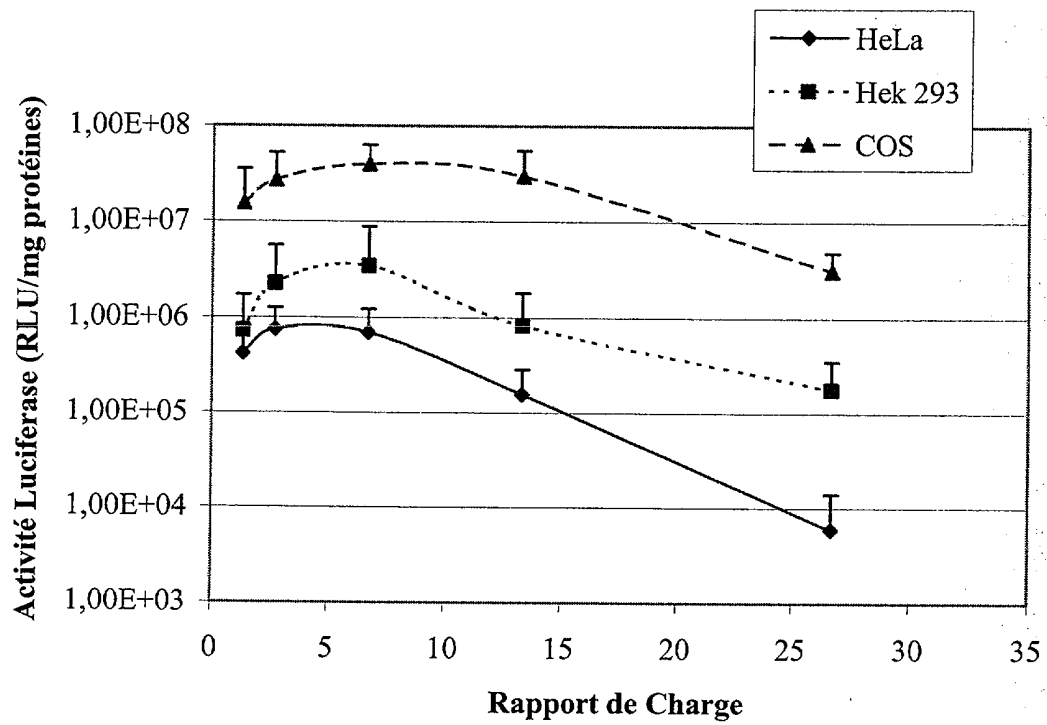
FIG. 1**Formulations KanaChol/ADN à divers rapports de charges**

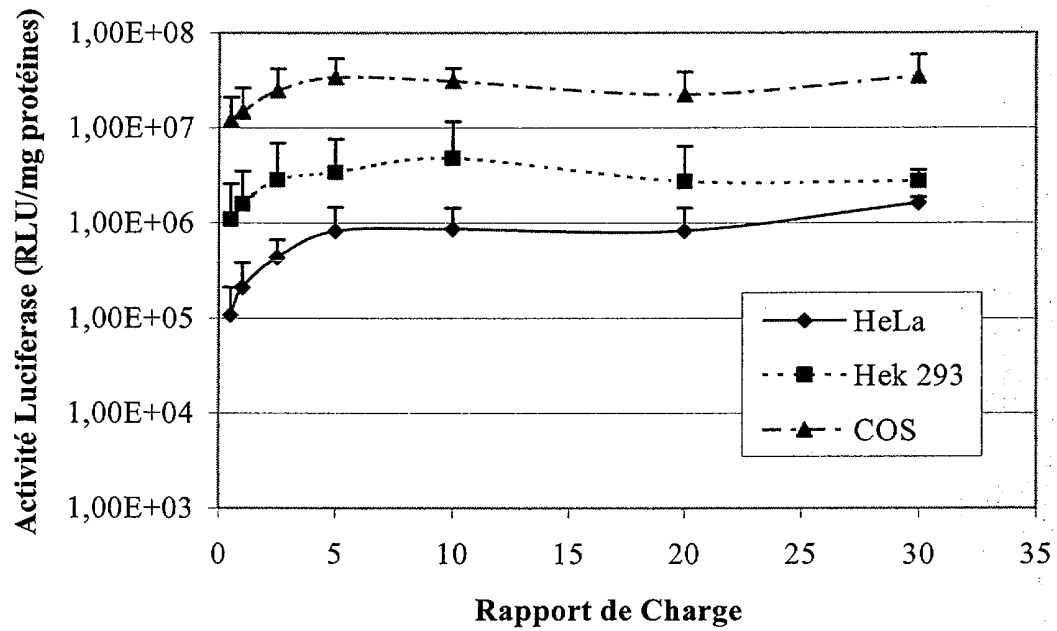
FIG. 2**Formulations KanaChol/DOPE/ADN à divers rapports de charges**

FIG. 3

Cytotoxicité des formulations KanaChol/ADN
à divers rapports de charges

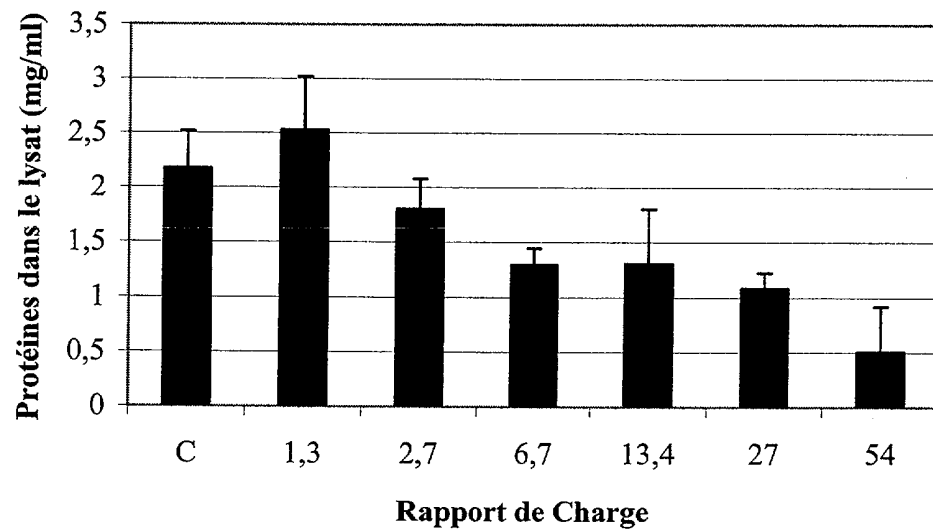


FIG. 4

Cytotoxicité des formulations KanaChol/DOPE/ADN
à divers rapports de charges

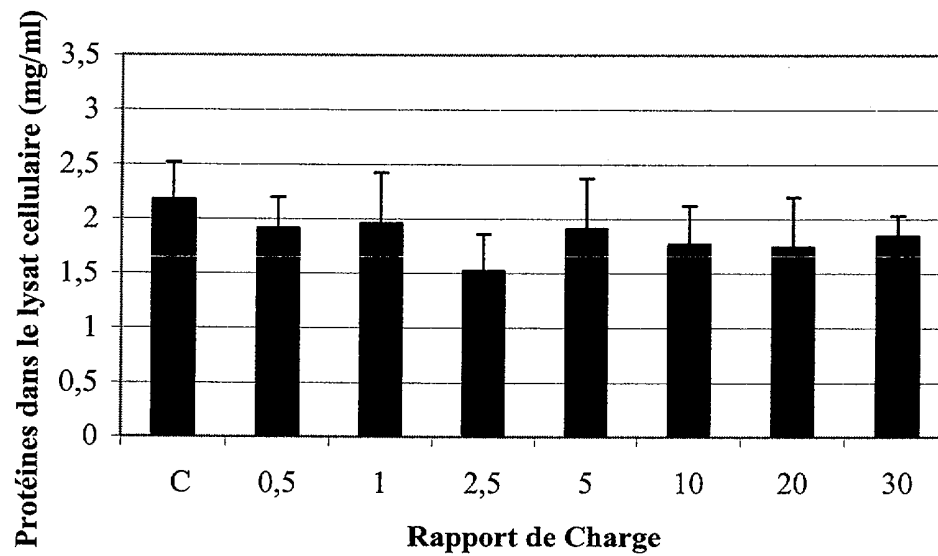


FIG. 5

Expression de la Luciférase (RLU / mg protéines) dans différentes
lignées cellulaires de mammifères transfectées avec KanaChol ou
KanaChol/DOPE (rapport molaire 1:1)

Lignée cellulaire	Espèce/type de Tissus	KanaChol	KanaChol/DOPE
NIH 3T3	Fibroblastes de souris	$4,5 \times 10^5$	$4,3 \times 10^6 (\pm 3 \times 10^6)$
A549	Carcinome du poumon humain	$2 \times 10^5 (\pm 0,3 \times 10^5)$	$8,5 \times 10^6 (\pm 6 \times 10^6)$
16HBE	Epithelium bronchique humain	$3,4 \times 10^3 (\pm 1,7 \times 10^3)$	$3 \times 10^6 (\pm 0,4 \times 10^6)$
HepG2	hépatoblastome humain	$5 \times 10^4 (\pm 4 \times 10^4)$	$5,2 \times 10^6 (\pm 3,2 \times 10^6)$
MITC	cellules myoïdes thymiques humaines	$3,2 \times 10^6 (\pm 0,3 \times 10^6)$	$1,5 \times 10^7 (\pm 0,5 \times 10^7)$

FIG. 6**Expression de la Luciferase dans des lignées cellulaires de mammifères transfectées avec des liposomes TGKC/DOPE**

Lignée Cellulaire	Activité Luciferase (RLU / mg protéines)
COS	$4,5 \times 10^6 (\pm 1 \times 10^6)$
HeLa	$5 \times 10^5 (\pm 2,5 \times 10^5)$
NIH 3T3	$5,2 \times 10^5 (\pm 2 \times 10^5)$
MITC	$5,6 \times 10^6 (\pm 1 \times 10^6)$

FIG. 7

Expression de CAT dans les voies aériennes de la souris suite à une
instillation intranasale de lipoplexes KanaChol/DOPE/ADN
stabilisés par Chol-PEG

Type de vecteur	Expression de CAT dans la trachée (ng / 100 mg protéines)	Expression de CAT dans les poumons (ng / 100 mg protéines)
KanaChol/DOPE	0,8 ± 0,9	6,1 ± 3,5
ADN non-formulé	0,03 ± 0,05	0,14 ± 0,16

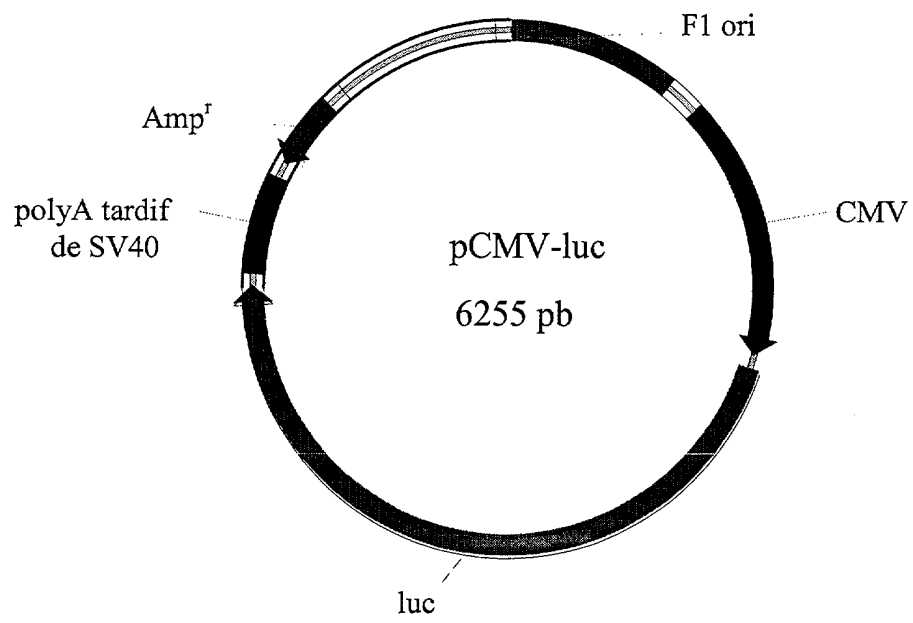
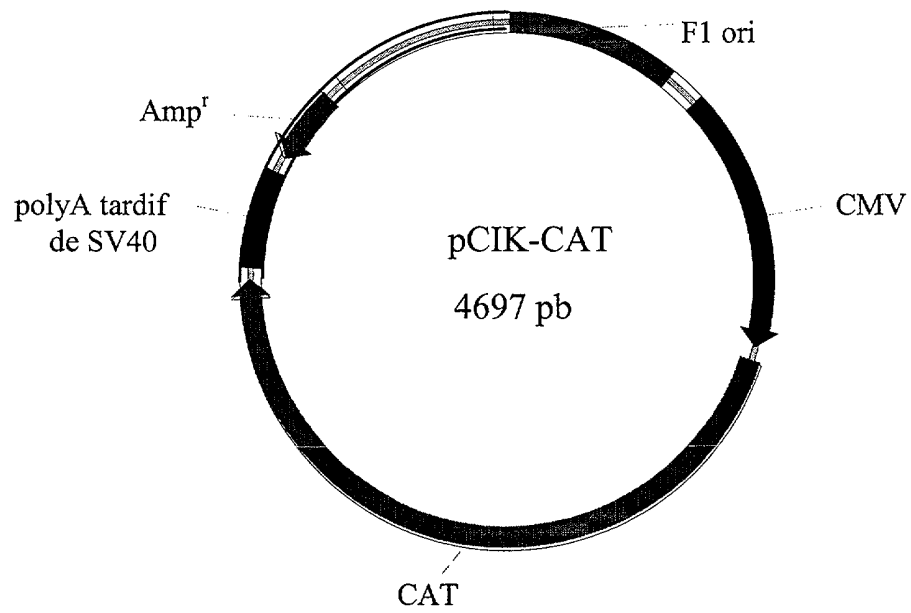
FIG. 8

FIG. 9

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 01 48233 A (MILLER ANDREW DAVID ;PEROUZEL ERIC (GB); ALTON ERIC (GB); MATTHEWS) 5 juillet 2001 (2001-07-05)	1-5,8,9, 12-34	C07J9/00 C07H21/00 A61K48/00 A61K31/575
Y	* page 11, alinéa 2 - page 12, alinéa 4 * * page 13, alinéa 4 * * page 16, dernier alinéa * * page 17, dernier alinéa * * page 19, alinéas 4,5 * * page 20, alinéas 3,4 * * exemple 13 *	10,11	
X	WO 98 55490 A (BESSODES MICHEL ;HERSCOVICI JEAN (FR); SCHERMAN DANIEL (FR); RHONE) 10 décembre 1998 (1998-12-10)	1-5,8,9, 12-34	
Y	* page 8, dernier alinéa; exemple 3G * * revendications 21,22 * * page 16, dernier alinéa * * page 17, dernier alinéa * * revendication 23 * * revendication 24 * * page 19, dernier alinéa - page 20, alinéa 1 * * page 21, alinéas 1,2 * * page 21, dernier alinéa - page 22, alinéa 1 * * page 23, alinéa 1 * * page 23, ligne 25 - page 24, alinéa 1 * * page 19, alinéa 1 * * revendication 29 *	10,11	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			C07J A61K
X	WO 99 12945 A (TAGLIAFERRI FRANK ;GENEMEDICINE INC (US); MUMPER RUSSELL J (US)) 18 mars 1999 (1999-03-18)	1-5,8,9, 12-34	
Y	* le document en entier *	10,11	
X	WO 96 24334 A (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC) 15 août 1996 (1996-08-15)	1-5,8,9, 12-34	
Y	* revendications 1-4 *	10,11	
	-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
28 mai 2002		Watchorn, P	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 611583
FR 0111199

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche ou ont fait l'objet d'une recherche incomplète, à savoir:

Revendications ayant fait
l'objet de recherches complètes:
10,11

Revendications ayant fait
l'objet de recherches incomplètes:
1-5,8,9,12-34

Revendications n'ayant pas fait
l'objet de recherches:
6,7

Raison:

La phase initiale de la recherche a mis en évidence un très grand nombre de documents pertinents quant à la question de nouveauté. Tant de documents ont été trouvés qu'il est impossible de déterminer quelles parties de la/des revendication/s peuvent être considérées comme définissant la matière pour laquelle une protection pourrait être légitimement revendiquée (Art. L.612-6 CPI). Pour ces raisons, une recherche significative sur toute l'étendue de la/des revendication(s) est impossible.

Par conséquent, la recherche a été limitée aux dérivés STEROLÉS des amino-glycosides antibiotiques spécifiques mentionnées dans la revendication 3 (pas à autres dérivés lipides non-sterols de ces amino-glycosides antibiotiques de la revendication 3), ce qui comprend complètement les composés des revendications 10 et 11, et partiellement les composés des revendications 1-5,8,9. La recherche sur les compositions, kit, utilisations et méthodes utilisant ces composés selon les revendications 12-34 a été limitée de la même façon.

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0111199 FA 611583**

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

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **28-05-2002**

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

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0148233	A	05-07-2001	AU	1871601 A	09-07-2001
			WO	0148233 A1	05-07-2001
WO 9855490	A	10-12-1998	FR	2764304 A1	11-12-1998
			AT	214708 T	15-04-2002
			AU	737579 B2	23-08-2001
			AU	8025098 A	21-12-1998
			BR	9809953 A	01-08-2000
			CN	1259134 T	05-07-2000
			DE	69804302 D1	25-04-2002
			EP	0986568 A1	22-03-2000
			WO	9855490 A1	10-12-1998
			HU	0004577 A2	28-04-2001
			JP	2002504815 T	12-02-2002
			NO	995858 A	30-11-1999
			PL	337177 A1	14-08-2000
			ZA	9804845 A	29-12-1998
WO 9912945	A	18-03-1999	AU	9383998 A	29-03-1999
			CA	2305575 A1	18-03-1999
			EP	1015465 A2	05-07-2000
			JP	2001515913 T	25-09-2001
			WO	9912945 A2	18-03-1999
WO 9624334	A	15-08-1996	AU	4923696 A	27-08-1996
			WO	9624334 A1	15-08-1996
WO 0040692	A	13-07-2000	AU	2600100 A	24-07-2000
			WO	0040692 A2	13-07-2000