

(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
27 décembre 2012 (27.12.2012)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/175642 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 47/48 (2006.01) A61K 9/50 (2006.01)
C07K 5/06 (2006.01) C07K 5/10 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2012/062035

(22) Date de dépôt international :
21 juin 2012 (21.06.2012)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1155468 21 juin 2011 (21.06.2011) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : DOMURADO, Dominique [FR/FR]; 3, rue Francisco Goya, F-34430 Saint-Jean-de-Vedas (FR).

(74) Mandataire : AHNER, Francis; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

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

(54) Title : PEPTIDE PRODRUGS

(54) Titre : PRODRUGUES PEPTIDIQUES

(57) Abstract : The present invention relates to peptide prodrugs which can optionally carry at least one active ingredient on the side chain of one of the amino acids making up said peptide prodrug. These peptide prodrugs can also be encapsulated in order to improve, or make possible, the biological or pharmacological activities thereof.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des prodrugs peptidiques, pouvant éventuellement porter au moins un principe actif sur la chaîne latérale de l'un des acides aminés constituant ladite prodrug peptidique. Ces prodrugs peptidiques peuvent en outre être encapsulées afin d'améliorer, voire rendre possible, leurs activités biologiques ou pharmacologiques.



WO 2012/175642 A1

PRODROGUES PEPTIDIQUES

L'objet de la présente demande concerne des prodrogues peptidiques vectorisées avec des propriétés antibiotiques modulables.

- 5 Une thérapie antibiotique au sens large, c'est-à-dire s'attaquant à des cellules biologiques pathogènes ou pathologiques comme les bactéries, les champignons, les cellules infectées par des virus, les cellules cancéreuses, les parasites tels que l'agent du paludisme, etc., peut prendre pour cible un ou plusieurs éléments structurels de la cellule biologique pathogène ou pathologique, afin d'altérer et empêcher le
- 10 fonctionnement de ladite cellule, de l'organisme pathogène ou de la tumeur le cas échéant, menant ainsi à la guérison du patient.

Les membranes sont un élément fondamental de la cellule.

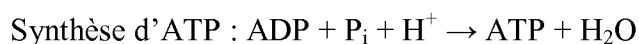
- Structuralement, les membranes sont un ensemble complexe de lipides, de protéines et de sucres (ou oses) organisé sur la base d'un double feuillet
- 15 phospholipidique.

- Ainsi, les membranes cellulaires sont des structures qui permettent de regrouper et délimiter les organites essentiels à la vie cellulaire, tels que l'appareil de Golgi ou les mitochondries dans les cellules eucaryotes, mais également permettent la régulation des échanges de matière entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule ou entre deux
- 20 compartiments cellulaires par des transporteurs, bourgeonnement de vésicules, phagocytose, etc.

Les membranes permettent ainsi de créer des gradients de concentration de divers produits utiles et nécessaires à la vie cellulaire. Ainsi, les membranes sont de véritables barrières physico-chimiques essentielles à la vie.

- 25 Par exemple, un élément fondamental de la vie cellulaire est la capacité de la cellule à générer et/ou utiliser l'énergie fournie par les molécules organiques sous forme d'ATP (Adénosine triphosphate : énergie contenue dans la liaison phosphate-phosphate).

- Or, pour la formation d'ATP, il est impératif de créer des gradients de
- 30 concentration de protons :



L'existence de ces gradients de concentration de protons, caractéristique universelle des cellules vivantes, est assurée par la présence de membranes.

Les membranes biologiques permettent en outre de créer des gradients de concentration de sels minéraux ou organiques, d'acides aminés, de peptides, d'ions sodium ou potassium, etc.

Ainsi, cibler les membranes biologiques dans les thérapies antibiotiques au sens large semble incontournable.

Ainsi, un certain nombre d'antibiotiques ciblant la membrane plasmique des organismes pathogènes est déjà connu. Toutefois en pratique, leur utilisation est limitée ou bien par un manque de spécificité des molécules antibiotiques considérées, provoquant ainsi des effets secondaires notoires, ou bien par l'existence d'organismes pathogènes ciblés résistants, en particulier sous forme persistante.

De plus, la forme persistante de certaines bactéries, telles que *Mycobacterium tuberculosis* dans sa forme persistante, possède un métabolisme résiduel et/ou est capable d'adaptation. Cependant, comme toute cellule présentant un métabolisme, même fortement réduit, la bactérie sous forme persistante requiert de l'ATP. Comme dans toute cellule, la synthèse de cet ATP nécessite l'existence d'un gradient transmembranaire de protons (Mitchell, Nature (1961), 191, p144-148). Il sera donc possible de tuer la bactérie en dissipant ce gradient de protons. Par ailleurs, la bactérie dans sa forme persistante procède encore, pour s'adapter à son environnement et y survivre, aux synthèses d'ARNs messagers et de protéines, même si ces synthèses se poursuivent avec une très faible intensité. Il sera d'autant plus possible d'annihiler ces synthèses d'ARNs messagers ou de protéines, et par conséquent de tuer la bactérie, que ces synthèses résiduelles sont faibles. Ainsi, il serait également avantageux dans la présente invention d'utiliser des produits qui interagissent avec les acides nucléiques, comme les antibiotiques de la famille des quinolones dans le cas de *Mycobacterium tuberculosis* par exemple. Toutefois, comme ces molécules inhibent en priorité la réplication de l'ADN, absente chez la forme persistante de la bactérie, il est nécessaire de les concentrer au niveau de la bactérie. De même, il serait aussi avantageux dans la présente invention d'utiliser des produits qui inhibent la synthèse protéique ou entraînent la synthèse de protéines anormales ou non fonctionnelles, comme des analogues d'acides aminés, 4-fluorophénylalanine ou acide 2-azétidine carboxylique par

exemple. Toutefois, comme ces molécules peuvent aussi agir sur les cellules humaines saines, il est nécessaire de les concentrer au niveau de la bactérie ou tout au moins au niveau des cellules pathogènes ou pathologiques.

De plus, la durée des recherches pour l'élaboration de nouveaux antibiotiques et les coûts associés liés à la rigueur des administrations de régulation de la santé limitent, à juste titre, le nombre d'antibiotiques sur le marché. Un autre aspect de la présente invention s'attache donc à trouver des solutions thérapeutiques rapides à mettre en œuvre, modulables, idéalement sous la forme d'un panel de solutions thérapeutiques que les praticiens pourraient adapter rapidement en réponse aux pathologies de leurs patients. Cet impératif passe par une simplification et une diversification de la chimie desdits antibiotiques, c'est-à-dire du principe actif.

Ainsi, dans le cadre de la présente invention, plusieurs objectifs ont été déterminés :

- trouver un ou des principes actifs qui soient spécifiques du double feuillet lipidique des cellules, élément récurrent dans les organismes pathogènes ;
- choisir un ou des principes actifs rendant la membrane de l'organite en charge de la production énergétique (mitochondrie ou membrane bactérienne, par exemple) perméable aux protons, affectant ainsi le métabolisme énergétique de la cellule ou de l'organisme ciblé ;
- et/ou choisir un ou des principes actifs inhibant la synthèse des ARNs ;
- et/ou choisir un ou des principes actifs inhibant la synthèse protéique ;
- et/ou choisir un ou des principes actifs entraînant la synthèse de protéines anormales ou non fonctionnelles ;
- trouver un ou des principes actifs de formule chimique aussi simple que possible ;
- trouver un moyen pour cibler les cellules pathogènes et donc éviter la toxicité des principes actifs liée à leurs effets secondaires ;
- avantageusement trouver un moyen pour cibler les acides nucléiques des cellules pathogènes et donc éviter la toxicité des principes actifs liée à leurs effets secondaires.

Au vu des critères décrits ci-dessus, et ceux plus généralement admis dans le cadre de la fabrication et l'utilisation de médicaments (toxicité, élimination, coûts de fabrication, etc...), une vectorisation du ou des principes actifs semblait une stratégie raisonnable pour répondre à ces objectifs. Toutefois, un certain nombre de problèmes techniques doivent être résolus et en premier lieu le choix du/des principes actifs.

Art Antérieur

Dans les articles scientifiques de Kruszewska et al. (Acta Pol. Pharm. 57 (Suppl.), 117, (2000); Acta Pol. Pharm. 59, 436, (2002) ; Acta Pol. Pharm. 61 (Suppl.), 436, (2004)), il est divulgué que certains principes actifs « non-antibiotiques » (c'est-à-dire *a priori* non connus pour une quelconque activité antibiotique), ont été utilisés in vitro sur divers organismes pathogènes unicellulaires. Plusieurs de ces principes actifs semblent avoir une activité anti-bactérienne. Il est divulgué en outre que certains de ces principes actifs semblent avoir une activité sur la membrane plasmique de certaines bactéries. Il peut être intéressant d'utiliser ces principes actifs, car leur(s) effet(s) secondaire(s) sont connus et leurs procédés d'obtention ont été optimisés. Toutefois, le prix de certains de ces principes actifs reste encore souvent élevé, ce qui est un facteur limitant. De plus, ces principes actifs auront obligatoirement des effets secondaires associés (au moins l'effet pharmaceutique initial). De ce point de vue, des principes actifs ayant des effets secondaires limités sont à privilégier.

Par exemple, même si d'autres principes actifs pourraient convenir, l'ibuprofène semblerait être une molécule candidate intéressante. D'un point de vue structural, l'ibuprofène est une molécule amphiphile, donc pouvant permettre de déstructurer suffisamment les membranes pour les rendre perméables aux protons. Les effets secondaires de l'ibuprofène sont bien connus et son prix de fabrication est limité. Toutefois, S. T. Byrne et al. (Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2007), 59, 313-316) montrent dans le cas de souris infectées par *Mycobacterium tuberculosis* que l'ibuprofène seul n'a aucune activité in vivo sur l'infection. Ainsi, si l'ibuprofène montre une activité in vitro, l'ibuprofène seul ne peut pas être utilisé en tant qu'antibiotique.

Ainsi, diverses molécules sont capables de dissiper les gradients transmembranaires de protons. Elles ont en commun deux propriétés : exister sous deux

formes, protonée et non-protonée (être ionisable), dans la gamme de pH cellulaire et être liposolubles, qu'elles soient ionisées ou non. De très nombreuses molécules présentent ces propriétés, en particulier certaines molécules déjà utilisées en thérapeutique humaine depuis plusieurs dizaines d'années comme l'ibuprofène (Adams
5 et al., Clinical study of analgesic and anti-inflammatory activity, Annals of the rheumatic diseases, (1968), 27(5), 457-62) ou l'acide valproïque (Carraz et al., Encephale (1965), 54, 458-465).

Cependant, comme ces molécules sont liposolubles, elles se distribuent dans les compartiments lipophiles de l'organisme et n'atteignent que très peu les organismes
10 pathogènes visés. D'autre part, comme toute cellule possédant un métabolisme requiert l'existence d'un gradient transmembranaire de protons, ces molécules ne présentent aucune spécificité d'action vis-à-vis des organismes pathogènes visés. Pour ces deux raisons, il est nécessaire de concentrer le principe actif au niveau des cellules infectées, par vectorisation par exemple.

15 Concernant la vectorisation de principes actifs, la littérature est assez bien fournie. Toutefois et pour rester dans l'idée initiale de simplifier la chimie, les essais de vectorisation impliquant un peptide court et/ou une structure répétitive d'un, voire deux ou trois acides aminés relié à un principe actif ont été retenus.

Dans W. D. Kingsbury et al., 1984 (Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 81, pp 4573-
20 4576) et W. D. Kingsbury et al., 1984 (J. Med. Chem, Vol. 27, 1447-1451), il est expliqué qu'un di- ou oligopeptide synthétique portant un principe actif passe facilement les systèmes de transport peptidique d'*Escherichia coli* et/ou *Candida albicans*, pour ensuite être hydrolysé par une peptidase, libérant ainsi le principe actif.

Un principe similaire a été repris par C. Gilvarg et al. dans US 4,479,898, US
25 4,427,582, US 4,454,065. Dans ces documents, il est divulgué des prodrogues peptidiques permettant, via des systèmes de transport peptidiques, c'est-à-dire des perméases, de traverser la membrane plasmique des cellules pathogènes, pour ensuite libérer la drogue dans le cytoplasme desdites cellules via l'action d'une peptidase. Il est décrit que les perméases sont répandues tant chez les organismes eucaryotes que
30 procaryotes. Le principe de C. Gilvarg et al. semble attirant, mais les principes actifs véhiculés sont des « résidus d'agents pharmaceutiques utiles, dérivés d'agents antimicrobiens ou antiparasites », c'est-à-dire des principes actifs aux structures

chimiques vraisemblablement compliquées. De plus, en pratique, les prodrogues peptidiques sont peu stables surtout in vivo où elles sont hydrolysées enzymatiquement. Cette hydrolyse est certes intéressante lorsque la prodrogue a atteint sa cible : elle permet ainsi de relarguer le principe actif. Toutefois, des conjugués polymériques de norfloxacin, de structure proche de ceux décrits par Gilvarg et al., ne sont pas
5 totalement stables dans des conditions « hydrolytiques » (E. Roseeuw et al., « Polymeric prodrugs of antibiotics with improved efficiency », journal of materials science : materials in medicine, 10, 1999, 743-746 (voir figure 2) ; E. Roseeuw et al., « Synthesis, degradation, and antimicrobial properties of targeted macromolecular
10 produgs of norfloxacin », Antimicrobial agents and chemotherapy, 47 (11), 2003, 3435-3441). En outre, la synthèse des prodrogues du même type que Gilvarg est plus compliquée qu'il n'y paraît : il est nécessaire d'activer d'abord un hydroxyle sur le peptide et ensuite de réaliser une substitution nucléophile qui ne se produit pas forcément à l'endroit voulu sur un peptide, c'est-à-dire une molécule comprenant un
15 certain nombre de liaisons amide. En outre, Gilvarg n'explique pas comment ses peptides peuvent, avant d'atteindre leur cible, être insensibles aussi bien à une hydrolyse in vivo qu'à une possible filtration rénale étant donné la faible masse de ces prodrogues. Enfin, comme les perméases sont présentes de manière assez uniforme à la fois dans les mondes eucaryote et procaryote, les prodrogues décrites manquent de sélectivité. De
20 plus, l'acide aminé portant le principe actif étant instable quand l'amine terminale est libre, et que cette amine est nécessaire à la reconnaissance par la perméase, l'acide aminé *N*-terminal ne peut pas porter de principe actif. Le transport maximal de principe actif (plusieurs molécules de principes actifs par peptide) en est d'autant plus réduit que le peptide est court. Ajouté à cela que l'acide aminé portant la molécule de principe actif
25 est, dans le document Gilvarg, racémique, et que les 2 acides aminés *N*-terminaux doivent être de forme L pour que le peptide soit reconnu par la perméase, si le 2^{ème} acide aminé porte un principe actif, seul la moitié des peptides serait susceptible d'être captée – dans l'éventualité où ces peptides arrivent même aux perméases. Ainsi, pour que l'ensemble des peptides soit susceptible d'être capturé, il faut donc au minimum des
30 tripeptides dont les deux acides aminés *N*-terminaux soient de forme L et ne portent donc pas de principe actif.

Plus récemment, des prodrogues thiodipeptidiques ont été développées par D. Foley et al. (Org. Biomol. Chem., 2009, vol 7, 3652-3656) dans le but de produire des molécules moins sensibles à l'hydrolyse. Intrinsèquement, leur solubilité en milieu aqueux est augmentée car les extrémités *N*- et *C*-terminales des peptides peuvent être
5 libres, i.e. non protégées. Toutefois, la synthèse de ces molécules reste complexe, et leur sélectivité *in vivo*, à prouver.

Des acides aminés ont également été couplés à des principes actifs dans l'invention divulguée dans WO 2005/046575 A2, US 2006/0241017 A1, US 2006/0287244 A1. En particulier, la thréonine semble intéressante afin de décupler les
10 propriétés thérapeutiques desdits principes actifs tout en assurant leur solubilité. En effet, il semblerait que la présence d'un acide aminé sur le principe actif pourrait permettre d'améliorer l'absorption, la stabilité, la bio-disponibilité du principe actif. Il n'est pas très clair si le véritable principe actif dans ce cas est le principe actif initial relié à l'acide aminé ou s'il y a une dégradation qui s'opère dans la cellule libérant ainsi
15 le principe actif initial. Dans tous les cas, la présence de l'acide aminé permet d'augmenter la solubilité du principe actif. Le problème ici est que les principes actifs sont déjà des molécules thérapeutiques qui ont une certaine spécificité intrinsèque et l'acide aminé permet d'exalter cette propriété. Ainsi, dans le cadre de la présente invention, ajouter un acide aminé sur une molécule qui n'a pas de cible déterminée de
20 par sa structure chimique, ne permet pas de résoudre le problème technique.

Or, un moyen de rendre les prodrogues plus sélectives est de vectoriser ces prodrogues en les encapsulant. La littérature s'est fortement enrichie cette dernière décennie par la divulgation de telles structures.

L'article scientifique d'E. Roseeuw et al. (Journal of material science: materials
25 in medicine, vol. 10, (1999), 743-746) divulgue des prodrogues polymériques d'antibiotiques. L'antibiotique qui a servi de témoin est la norfloxacin. La norfloxacin est d'abord couplée à un dipeptide dérivé de diglycine. Ce dérivé de diglycine-norfloxacin est ensuite lié à une structure polymérique de type dextrane, qui est en outre vectorisée par du mannose afin de cibler des macrophages infectés par l'agent
30 pathogène de la tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*. Ces expériences ont montré sur des souris infectées que la norfloxacin-prodrogue-vectorisée était beaucoup plus active que la norfloxacin seule. Toutefois, d'un point de vue pratique, des polymères

de dextrane sont difficiles à caractériser du fait de la variabilité des produits polymériques obtenus. Or, dans l'industrie pharmaceutique, il est impératif de pouvoir déterminer très spécifiquement la structure d'un composé avant de pouvoir l'administrer à un être humain. Ainsi, ces genres de polymères vectorisés seraient à exclure dans le
5 cadre de la présente invention, en raison de leur complexité structurale.

Toutefois, I. Hernandez-Valdepeña et al. (European Journal of Pharmaceutical Sciences, 36, (2009), 345-351) ont décrit des nano-agrégats de polyanions amphiphiles afin de véhiculer dans un milieu aqueux neutre de la clofazimine insoluble seule dans l'eau. La clofazimine est un agent antibiotique dont l'action contre les mycobactéries est
10 connue. Elle est utilisée dans le traitement de la lèpre. C'est une base faible insoluble dans l'eau à pH neutre, pouvant provoquer des effets secondaires sévères. Ces deux effets adverses ont été minimisés en combinant la clofazimine avec un véhicule composé d'agréats nanométriques formés par des poly(acide méthylvinyl éther-alt-maléique)s hydrophobisés afin de solubiliser la clofazimine en milieu aqueux neutre. Le
15 véhicule a aussi été fonctionnalisé par l'addition de mannose afin de cibler les macrophages infectés.

L'auteur de la présente invention a conçu et testé des prodrogues peptidiques avec des principes actifs de structure chimique simple permettant de rendre les membranes perméables aux protons. Les structures des prodrogues peptidiques
20 synthétisées ont été délibérément rendues hydrophobes afin de permettre de les encapsuler. Dans le cas présent, l'encapsulation s'est faite avec une structure polymère vectorisable. Contrairement aux préjugés initiaux, les tests biologiques effectués sur ces prodrogues peptidiques vectorisées montrent une activité biologique remarquable. Cette activité est surprenante à plusieurs égards:

- 25 – il est possible que des principes actifs de structure chimique simple puissent agir sur des fonctions-clé énergétiques d'organismes/cellules pathogènes ;
- malgré leurs propriétés hydrophobes marquées, les prodrogues peptidiques ont pu être utilisées dans un milieu biologique et ont permis de libérer précisément à l'endroit voulu le principe actif ;
- 30 – les prodrogues encapsulées sont libérées précisément au(x) lieu(x) de l'infection (c'est-à-dire dans le macrophage infecté) et au contact de la cellule à détruire, cellule cancéreuse ou plus généralement organisme pathogène considéré, et ce

malgré le fait que la prodrogue et la capsule ne soient pas reliées l'une à l'autre par une liaison covalente, impliquant par exemple l'action d'une enzyme particulière pour libérer le principe actif.

Le mécanisme de ce dernier point n'est d'ailleurs pas encore très bien compris.

5 Pour concentrer les principes actifs envisagés au niveau de leur site d'action, deux niveaux de guidage sont proposés :

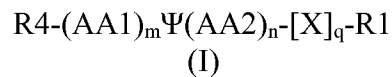
1. L'association de la prodrogue à un transporteur macromoléculaire qui sera capté par les cellules infectées (e.g. les macrophages, ou les cellules infectées par des virus), et éventuellement dans lesquelles les organismes pathogènes
10 peuvent survivre sous forme persistante (e.g. la forme persistante de *Mycobacterium tuberculosis*), ou encore qui sera concentré au niveau de la tumeur cancéreuse.
2. La transformation du principe actif en une prodrogue peptidique captée activement par les bactéries ou encore par les cellules humaines malades
15 (cellules cancéreuses ou cellules infectées par des virus).

Un premier aspect de l'objet de la présente invention concerne donc une prodrogue peptidique, élément véritablement novateur en raison de sa simplicité. Un deuxième aspect de l'objet de la présente invention concerne l'association de cette prodrogue peptidique avec un « véhicule » qui est une capsule, plus ou moins
20 fonctionnalisée. Ces deux éléments peuvent être caractérisés indépendamment. En effet, l'association prodrogue-transporteur macromoléculaire permet d'isoler ladite prodrogue de l'environnement biologique dans laquelle elle se trouve et qui tend naturellement à dégrader tout peptide étranger dans l'organisme, i.e. en milieu in vivo. Ainsi, l'association prodrogue-transporteur macromoléculaire permet également de simplifier
25 la chimie au niveau de la liaison même du principe actif à la partie peptidique de la prodrogue par l'utilisation d'une simple liaison ester, amide ou thioester, facilement hydrolysable une fois la prodrogue libérée au niveau du site d'action. De plus, la facilitation de la fixation du principe actif au reste de la prodrogue permet de synthétiser plus rapidement des agents antibiotiques, c'est-à-dire la prodrogue-principe actif,
30 pouvant être testés in vitro sans le transporteur macromoléculaire. Cette synthèse accélérée est donc parfaitement adaptée aux cas de maladies multirésistantes, ou à une thérapie « personnalisée ». Ainsi, le nombre de combinaisons entre les prodrogues

peptidiques et les capsules croît de manière exponentielle, ce qui permet de donner aux praticiens un nombre croissant de solutions thérapeutiques.

Résumé de l'invention :

- 5 L'objet de la présente demande concerne un composé de formule (I) :



- 10 caractérisée en ce que

R4 est choisi parmi l'atome d'hydrogène, les groupements C₁-C₆ alkyle, aryle, aryl-(C₁-C₆ alkyle), un résidu d'acide aminé ou un résidu peptidique comprenant de 2 à 10 résidus d'acides aminés, préférentiellement R4 est choisi parmi l'atome d'hydrogène, les groupements C₁-C₆ alkyle, aryle ou aryl-(C₁-C₆ alkyle),
 15 un résidu d'acide aminé naturel, un résidu d'acide aminé inhabituel pouvant contribuer à la synthèse de protéines non-fonctionnelles ou un résidu peptidique comprenant de 2 à 10 résidus d'acides aminés naturel, plus préférentiellement R4 est choisi parmi l'atome d'hydrogène, les groupements C₁-C₆ alkyle, aryle, aryl-(C₁-C₆ alkyle) ;

- 20 Ψ est une liaison peptidique ou pseudo-peptidique, préférentiellement Ψ est une liaison peptidique ;

R1 est choisi parmi l'atome d'hydrogène, ou les groupements C₁-C₆ alkyle, C₁-C₆ alkyle substitué par un OH ; aryle ou aryl-(C₁-C₆ alkyle) ;

- 25 m est un nombre entier naturel compris de 0 à 12, préférentiellement compris de 1 à 12, plus préférentiellement compris de 1 à 10, encore plus préférentiellement compris entre 3 et 8, plus préférentiellement encore compris entre 4 et 6 ;

n est un nombre entier naturel compris de 0 à 12, préférentiellement compris de 1 à 10, plus préférentiellement compris entre 3 et 8, encore plus préférentiellement compris entre 4 et 6 ;

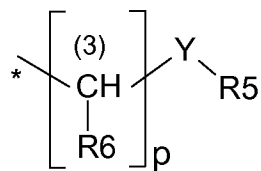
- 30 avec m+n est un nombre entier naturel compris de 2 à 12, préférentiellement m+n est un nombre entier naturel compris entre 2 et 10, plus préférentiellement compris entre 3 et 8, encore plus préférentiellement compris entre 4 et 6 ;

q est choisi entre 0 ou 1 ;

lorsque $q=1$, X est choisi entre les atomes d'oxygène, de soufre ou le groupement NH ;

AA1 représente une glycine ou pseudo-glycine déshydratée, substituée par un groupement R3, avantageusement sur le carbone alpha de AA1 ;

5 R3 est un fragment de formule (II) relié au reste de la molécule de formule (I) par la liaison marquée d'un * :



(II)

10 dans lequel Y est choisi entre les atomes d'oxygène, de soufre, le groupement CO, ou le groupement NH, préférentiellement Y est choisi parmi les atomes d'oxygène, de soufre et le groupement NH, plus préférentiellement Y est choisi parmi les atomes d'oxygène et le groupement NH ;

15 R5 est un principe actif, qui peut dissiper les gradients transmembranaires de protons, et/ou interagir avec les acides nucléiques, et/ou inhiber la synthèse protéique, et/ou induire la synthèse de protéines anormales ou non fonctionnelles, relié à Y par une liaison ester, thioester ou amide, préférentiellement ester ou amide, préférentiellement R5 n'est pas un fibrate, en particulier le gemfibrozil® (c'est-à-dire l'acide 5-(2,5-diméthylphénoxy)-2,2-diméthyl-pentanoïque) ou un dérivé de celui-ci ;

20 R6 est choisi parmi l'atome d'hydrogène, ou les groupements C₁-C₆ alkyle, aryle ou aryl-(C₁-C₆ alkyle) ;

p est un nombre entier naturel compris de 1 à 10 ;

lorsque $m>1$, les différents R3 sont choisis indépendamment les uns des autres,

25 lorsque $n>0$, AA2 représente une glycine ou pseudo-glycine déshydratée, substituée par un groupement R2, avantageusement sur le carbone alpha de AA2,

R2 est la chaîne latérale d'un acide aminé, préférentiellement R2 est la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou la chaîne latérale d'un acide aminé inhabituel pouvant contribuer à la synthèse de protéines non-fonctionnelles ;
lorsque $n > 1$, les différents R2 sont choisis indépendamment les uns des autres ;
5 lorsque les carbones substitués par les groupements R2 ou R3 et/ou le carbone (3) sont asymétriques, ces carbones sont indépendamment les uns des autres de configuration (R) ou (S). En particulier, le produit de formule (I) ne peut pas comprendre du glutathion ou un dérivé du glutathion, par exemple un glutathion déshydraté ou un fragment moléculaire correspondant au glutathion dans lequel
10 au moins un hydrogène a été remplacé par une liaison reliant ainsi le fragment glutathion à un groupement R3 par une liaison covalente.

Un autre objet de la présente invention concerne l'utilisation in vitro du produit (I) avec des agents pathogènes, des cellules infectées ou des cellules cancéreuses, en particulier pour un procédé de criblage. Ainsi, un autre objet de la présente invention
15 concerne un procédé de criblage dans lequel le produit de formule (I), mis en présence d'agents pathogènes, de cellules infectées ou de cellules cancéreuses, diminue la viabilité de ceux-ci au bout d'une semaine. Préférentiellement le nombre d'agents pathogènes, cellules infectées ou cellules cancéreuses est diminué au bout d'une semaine d'au moins 10% en nombre d'agents pathogènes, cellules infectées ou cellules
20 cancéreuses par rapport au nombre d'agents pathogènes, cellules infectées ou cellules cancéreuses initiaux, plus préférentiellement d'au moins 50%, encore plus préférentiellement d'au moins 75%, et encore plus préférentiellement encore de 100%.

En outre, dans la présente invention, le composé de formule (I) peut être encapsulé dans une structure polymère dénommée capsule.

25 Un autre objet de la présente demande concerne un procédé pour obtenir le composé de formule (I), caractérisé en ce que ledit composé de formule (I) est synthétisé en utilisant des techniques de synthèse peptidique.

Un autre objet de la présente demande concerne un composé de formule (I) pour son utilisation comme médicament.

30 Un autre objet de la présente demande concerne un composé de formule (I) pour son utilisation comme anti-infectieux.

Un autre objet de la présente demande concerne un composé de formule (I) pour son utilisation dans le traitement de la tuberculose, avantageusement lorsque la tuberculose est dans sa forme dite persistante.

De manière préférée, un objet de la présente demande concerne un composé de
 5 formule (I) pour son utilisation complémentaire dans le traitement de la tuberculose pour diminuer la viabilité de la/des formes persistantes de tuberculose, voire de les éradiquer.

Un autre objet de la présente demande concerne un composé de formule (I) pour son utilisation dans le traitement du cancer.

10 Un autre objet de la présente demande concerne une composition injectable comprenant un composé de formule (I).

Définitions

« C₁-C₆ alkyle »

15 Dans la présente invention, le terme « C₁-C₆ alkyle », est une chaîne hydrocarbonée saturée, linéaire ou ramifiée, comportant de 1 à 6 atomes de carbone, comme par exemple un groupement méthyle, éthyle, isopropyle, tertio-butyle, n-pentyle, etc.

« C₁-C₆ alkyle substitué par un OH »

20 Dans la présente invention, le terme « C₁-C₆ alkyle substitué par un OH » représente un fragment C₁-C₆ alkyle comme défini ci-dessus, dans lequel un atome d'hydrogène a été remplacé par un groupement hydroxy « -OH ». Les C₁-C₆ alkyles substitués par un OH selon la présente invention peuvent être par exemple choisis parmi
 25 les groupements suivants : -CH₂OH, -(CH₂)₂OH, -CH(OH)-CH₃, -(CH₂)₃OH, -CH(OH)-CH₂-CH₃, -CH₂-CH(OH)-CH₃, -CH(CH₃)-CH₂OH, -C(OH)(CH₃)₂, -(CH₂)₄OH, -CH(OH)-(CH₂)₂-CH₃, -(CH₂)₂-CH(OH)-CH₃, -CH₂-CH(OH)-CH₂-CH₃, -CH(OH)-CH(CH₃)₂, -C(OH)(CH₃)-CH₂-CH₃, -CH(CH₃)-CHOH-CH₃, -C(CH₃)₂-CH₂OH, -CH(CH₂-CH₃)-CH₂OH, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂OH, -CH(CH₃)-CH₂-CH₂OH, -(CH₂)₅OH,
 30 -CH(OH)-(CH₂)₃-CH₃, -CH₂-CH(OH)-(CH₂)₂-CH₃, -(CH₂)₂-CH(OH)-CH₂-CH₃, -(CH₂)₃-CH(OH)-CH₃, -(CH₂)₆OH, -CH(OH)-(CH₂)₄-CH₃, -CH₂-CH(OH)-(CH₂)₃-CH₃, -(CH₂)₂-CH(OH)-(CH₂)₂-CH₃, -(CH₂)₃-CH(OH)-CH₂-CH₃, -(CH₂)₄-CH(OH)-CH₃. Les

C₁-C₆ alkyles substitués par un OH préférés dans le cadre de la présente invention sont : -CH₂OH, -(CH₂)₂OH, -CH(OH)-CH₃, -(CH₂)₃OH, -(CH₂)₄OH, -(CH₂)₅OH, -(CH₂)₆OH. Les C₁-C₆ alkyles substitués par un OH plus préférés encore dans le cadre de la présente invention sont : -CH₂OH, -(CH₂)₂OH, -(CH₂)₃OH, -(CH₂)₄OH.

5

« Aryle »

Par groupement « aryle », on entend un groupement aromatique, comportant de préférence de 5 à 10 atomes de carbone, comprenant un ou plusieurs cycles et comprenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatome(s) en particulier un oxygène, un azote ou un soufre, comme par exemple un groupement phényle, furane, indole, pyridine, naphtalène, etc.

10

« Aryl-(C₁-C₆ alkyle) »

Par groupement « aryl-(C₁-C₆ alkyle) », on entend, au sens de la présente invention, un groupe aryle, comme défini ci-dessus, lié à la molécule par l'intermédiaire d'un groupement C₁-C₆ alkyle. À titre d'exemple, on peut citer les groupes benzyle, phényléthyle, ou encore phénylpropyle.

15

« Peptide »

Le terme « peptide » doit être compris comme un polymère d'acides aminés reliés entre eux par une liaison peptidique et/ou pseudopeptidique. Un peptide contient généralement entre 2 et 80 à 100 acides aminés, la limite supérieure n'étant pas clairement définie. Dans le cadre de la présente invention, les peptides contiennent entre 2 et 12 acides aminés.

20

25

« Résidu peptidique »

L'expression « résidu peptidique » doit être comprise comme un peptide relié à la molécule de formule (I) par son carbonyle C-terminal et donc ayant perdu au moins un OH.

30

« Liaison peptidique »

Une liaison peptidique relie un groupement carbonyle CO et un groupement amine NH dans un polymère d'acides aminés, c'est-à-dire un peptide. La liaison peptidique est donc une liaison amide reliant deux acides aminés entre eux.

5

« Liaison pseudopeptidique »

Une liaison pseudopeptidique présente des caractères physico-chimiques identiques ou proches de celles des liaisons peptidiques. Une liaison pseudopeptidique va donc relier deux acides aminés dont au moins l'un d'entre eux n'est pas un acide aminé naturel. Dans le cadre de la présente invention, les liaisons pseudopeptidiques peuvent relier l'un quelconque des groupements : C=O, C=S, C=CH₂, C=NH, CH₂, CH(OH), CH,

10

à l'un quelconque des groupements :

NH, NH-NH-, N(OH), N(C₁-C₆ alkyle), en particulier N(CH₃), N(C₁-C₆ alkyle substitué par un OH), N(NH₂), CH₂, O, S, CH,

15

à l'exception de la liaison amide (peptidique) et des liaisons impossibles telles que -CH=CH₂-.

Les liaisons pseudopeptidiques préférées selon la présente invention sont les liaisons reliant CO et N(C₁-C₆ alkyle), en particulier N(CH₃), CO et NH-NH-, CO et O, CO et S, C=S et NH, C=CH₂ et NH, CH et CH par une double liaison, C=O et N(OH).

20

« Acide aminé »

L'expression « acide aminé » doit être comprise comme toute molécule présentant au moins un acide carboxylique, au moins une amine et au moins un carbone reliant cette amine et cet acide carboxylique. Préférentiellement, les acides aminés pouvant être utilisés dans le cadre de la présente invention sont les acides aminés dits « naturels » et/ou les acides aminés_inhabituels pouvant contribuer à la synthèse de protéines non-fonctionnelles. Préférentiellement les acides aminés de la présente invention sont de forme L.

25

30

« Acides aminés inhabituels pouvant contribuer à la synthèse de protéines non-fonctionnelles »

Dans le cadre de la présente invention, par l'expression « acides aminés inhabituels pouvant contribuer à la synthèse de protéines non-fonctionnelles », il est
5 compris les acides aminés suivants : 4-fluorotryptophane, 5-fluorotryptophane, 6-fluorotryptophane, 5-méthyltryptophane, S-tritylcystéine, sélénocystéine, sélénométhionine, éthionine, β -(2-thiényle)alanine, β -chloroalanine, thiazolylalanine, triazolalanine, p-fluorophénylalanine, o-fluorophénylalanine, m-fluorophénylalanine, dihydroxyphénylalanine, 2,5-dihydrophénylalanine, norleucine, acide azétidine-2-
10 carboxylique, thioproline, acide pipécolique, canavanine, indospicine, 3,4-déhydroproline, histidinol.

« Acides aminés naturels »

L'expression « acide aminé naturel » représente entre autres les acides aminés
15 suivants : la glycine (Gly), l'alanine (Ala), la valine (Val), la leucine (Leu), l'isoleucine (Ile), la sérine (Ser), la thréonine (Thr), la phénylalanine (Phe), la tyrosine (Tyr), le tryptophane (Trp), la cystéine (Cys), la méthionine (Met), la proline (Pro), l'hydroxyproline (Hpr), l'acide aspartique (Asp), l'asparagine (Asn), la glutamine (Gln), l'acide glutamique (Glu), l'histidine (His), l'arginine (Arg), l'ornithine (Orn), et la
20 lysine (Lys). Les acides aminés naturels préférés selon la présente invention sont les acides aminés de la série L. Les acides aminés naturels préférés dans le cadre de la présente invention sont en outre les acides aminés suivants : la glycine (Gly), la valine (Val), la leucine (Leu), l'isoleucine (Ile), la sérine (Ser), la thréonine (Thr), la tyrosine (Tyr), le tryptophane (Trp), la cystéine (Cys), la méthionine (Met), la proline (Pro),
25 l'hydroxyproline (Hpr), l'acide aspartique (Asp), l'asparagine (Asn), la glutamine (Gln), l'acide glutamique (Glu), l'histidine (His), l'arginine (Arg) et l'ornithine (Orn).

« Résidu d'acide aminé »

L'expression « résidu d'acide aminé » doit être comprise comme étant un acide
30 aminé relié à la molécule de formule (I) par le carbonyle C-terminal et donc ayant perdu au moins un OH.

« Résidu d'acide aminé naturel »

L'expression « résidu d'acide aminé naturel » doit être comprise comme étant un acide aminé naturel relié à la molécule de formule (I) par le carbonyle C-terminal et donc ayant perdu au moins un OH.

5

« Résidu d'acide aminé inhabituel pouvant contribuer à la synthèse de protéines non-fonctionnelles »

L'expression « résidu d'acide aminé inhabituel pouvant contribuer à la synthèse de protéines non-fonctionnelles » doit être comprise comme étant un résidu d'acide aminé inhabituel pouvant contribuer à la synthèse de protéines non-fonctionnelles, relié à la molécule de formule (I) par le carbonyle C-terminal dudit acide aminé inhabituel et donc ayant perdu au moins un OH.

10

« Glycine déshydratée »

L'expression « glycine deshydratée » concerne le fragment moléculaire de la glycine sans le OH de la fonction acide carboxylique et un H de l'amine, et donc de formule $\text{-NH-CH}_2\text{-CO-}$. Le carbone alpha de la glycine est représenté par le carbone du $\text{-CH}_2\text{-}$.

15

L'expression « glycine deshydratée » concerne donc une glycine reliée d'une part par son extrémité CO (dite encore « extrémité C-terminale ») à un fragment moléculaire AA1, AA2, X ou R1, et relié par son extrémité NH (dite encore « extrémité N-terminale ») à un fragment moléculaire R4, AA1 ou AA2.

20

« Pseudoglycine déshydratée »

Le terme « pseudoglycine deshydratée » concerne le fragment moléculaire d'une glycine sans le OH de la fonction acide carboxylique et un H de l'amine, modifiée de manière à créer une liaison pseudopeptidique à son extrémité C-terminale ou à son extrémité N-terminale. Bien entendu, les expressions « extrémité C-terminale » et « extrémité N-terminale » s'applique par analogie à la glycine déshydratée. Par exemple, l'extrémité N-terminale de la pseudoglycine de formule $\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$, sera représentée par « -O- ».

25

30

« Chaîne latérale d'un acide aminé »

Le terme « chaîne latérale d'un acide aminé » représente le fragment porté par le carbone α d'un acide aminé. Par exemple, les chaînes latérales d'acides aminés naturels tels que la glycine, la valine, l'alanine et l'acide aspartique correspondent à l'atome
5 d'hydrogène, aux groupes isopropyle, méthyle et CH_2COOH respectivement.

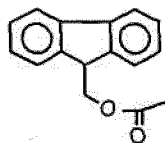
Les chaînes latérales d'autres acides aminés peuvent être inclus dans la définition de chaîne latérale d'un acide aminé, telles que celles des acides aminés suivants: acide 4-amino tétrahydropyran-4-carboxylique, allylglycine, acide diamino butyrique, acide diamino propionique, aminosérine, acide aminobutyrique, amino
10 butylglycine, phénylglycine, 4-chloro-phénylalanine, 4-fluoro-phénylalanine, 4-nitro-phénylalanine, citrulline, cyclohexylalanine, thiénylalanine, et de leurs semblables.

Les chaînes latérales des acides aminés peuvent être protégées par des groupements protecteurs (P) et plus particulièrement N-protecteurs, O-protecteurs ou S-protecteurs lorsque ces chaînes contiennent les hétéroatomes correspondants. La
15 protection de certaines des fonctions réactives des peptides est obligatoire lors de la synthèse desdits peptides. En effet, la synthèse des peptides se fait classiquement par l'activation de la fonction acide carboxylique d'un acide aminé, ou d'une chaîne d'acides aminés, par l'utilisation d'un agent de couplage. Cet acide activé est mis en présence d'un acide aminé, ou d'une chaîne d'acides aminés, dont l'amine terminale
20 n'est pas protégée, résultant ainsi en la formation d'une liaison amide, encore appelée liaison peptidique. Les conditions de couplage ainsi que les agents de couplage utilisés sont très bien connus de l'homme du métier.

Les groupements protecteurs (P) sont également des groupements connus de l'homme du métier. Ces groupements protecteurs et leur utilisation sont décrits dans des
25 ouvrages tels que par exemple Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley, New York, 2007 4e édition ; Harrison et al. "Compendium of Synthetic Organic Methods", Vol. 1 à 8 (J. Wiley & sons, 1971 to 1996). En outre, des techniques de synthèse peptidique sont décrites dans Paul Lloyd-Williams, Fernando Albericio, Ernest Giralt, "Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins", CRC Press,
30 1997 ou Houben-Weyl, "Methods of Organic Chemistry, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics", Vol E 22a, Vol E 22b, Vol E 22c, Vol E 22d., M. Goodman Ed., Georg Thieme Verlag, 2002. Les groupements protecteurs portés par un atome d'azote

seront désignés en tant que groupements N-protecteurs. Il en est de même pour les groupements S-protecteurs, O-protecteurs, etc. Par exemple, un hydroxy peut être protégé par un groupement trityl, ou un acide carboxylique peut être protégé sous forme d'un ester tert-butylique. Dans le cas d'une synthèse sur support solide, c'est la résine
5 qui sert de groupement protecteur à la fonction carboxylique C-terminale.

La protection du groupe amino de l'acide aminé peut être effectuée par exemple par un groupe tert-butyloxycarbonyl (désigné ci-après par Boc-) ou un groupe -9-fluorénylméthyloxycarbonyl (désigné ci-après par Fmoc-) représenté par la formule :



10 La protection est effectuée selon les procédés connus de l'art antérieur. Par exemple, la protection par le groupe Boc- peut être obtenue en faisant réagir l'acide aminé avec le di-tert-butylpyrocarbonate (Boc₂O).

« Principe actif dissipateur de gradients transmembranaires de protons »

15 Par « principe actif dissipateur de gradients transmembranaire de protons », il doit être compris dans le cadre de la présente invention les fragments ou les molécules qui, en raison de leurs propriétés physico-chimiques, peuvent s'insérer dans les bicouches lipidiques et rendre celles-ci perméables aux protons. Les protons étant des entités très petites, même à l'échelle moléculaire, voire atomique, la simple
20 déstructuration d'une membrane lipidique peut rendre ladite membrane perméable aux protons. Par exemple, les principes actifs dissipateurs de gradients transmembranaires de protons peuvent inclure des tensio-actifs, c'est-à-dire des molécules présentant un caractère amphiphile marqué, des molécules naturelles telles que le cholestérol, ou toute molécule présentant un caractère lipophile lui permettant à la fois de s'insérer dans une
25 bicouche lipidique et de provoquer un changement physico-chimique de celle-ci caractérisable par des techniques analytiques connues dans l'état de la technique. Les principes actif dissipateurs de gradients transmembranaires de protons préférés selon la présente invention sont l'ibuprofène, l'acide valproïque, l'acide 3,5,5-triméthylhexanoïque, l'acide pyrazinoïque, et la lévofloxacine, plus préférentiellement
30 l'ibuprofène, l'acide valproïque, l'acide 3,5,5-triméthylhexanoïque. Dans le but

d'étudier et éventuellement affiner le choix des conjugués peptidiques, au moins un principe actif dissipateur de gradients transmembranaires de protons peut être remplacé par une fluorescéine.

5 « Prodrogue peptidique encapsulée » et « capsule »

Par « prodrogue peptidique encapsulée », il est entendu dans le cadre de la présente invention que la prodrogue peptidique est enfouie dans une structure macromoléculaire, qui entoure totalement ou partiellement ladite prodrogue peptidique.

10 Par « structure macromoléculaire », il est compris un assemblage par formation de liaisons covalentes, par interaction(s) électrostatique(s), hydrophobe(s), ou hydrophile(s), etc. d'un très grand nombre de molécules engendrant une molécule ou une structure ayant un poids moléculaire élevé, c'est-à-dire supérieur à 1000 Da, plus préférentiellement supérieur à 10 000 Da.

15 Ainsi, la structure macromoléculaire qui entoure la prodrogue peptidique est dénommée « capsule ».

L'encapsulation est le processus qui permet d'encapsuler la prodrogue peptidique. L'encapsulation se fait de manière classique, ce qui est surprenant dans le présent cas de figure de par la nature plutôt hydrophile des conjugués peptidiques.

20 Le premier rôle de cette capsule est d'amener la prodrogue peptidique jusqu'à la cellule qui devra la capter. Dans le cas du macrophage, la capsule sera endocytée et introduira ainsi la prodrogue au contact de la bactérie. Dans le cas de la cellule cancéreuse, la capsule pénétrera la tumeur et amènera la prodrogue peptidique au contact de la cellule cancéreuse qui captera la prodrogue peptidique. Pour éviter l'accumulation de la capsule, qui est une structure macromoléculaire, dans l'organisme
25 et pour permettre le relargage de la prodrogue au contact de la cellule qui la captera (bactérie ou cellule cancéreuse), les capsules utilisées sont avantageusement dégradables, plus avantageusement bio-dégradables. De surcroît, étant donné que les prodrogues proposées dans la présente invention portent un ou plusieurs motifs de principes actifs, c'est-à-dire des molécules liposolubles ou aromatiques, elles sont peu
30 ou pas solubles dans l'eau et les capsules de structure macromoléculaire ont donc également pour fonction de stabiliser la prodrogue dans un environnement aqueux, à savoir les fluides biologiques. Pour solubiliser ou stabiliser dans l'eau une molécule

insoluble dans ce solvant, il est possible d'utiliser un polymère amphiphile aléatoire, car il forme des domaines hydrophobes dans lesquels les molécules insolubles dans l'eau peuvent s'insérer. De plus, comme les prodrogues proposées dans ce brevet sont cationiques par leur groupement N-terminal, il est judicieux d'utiliser comme capsule
5 un polyanion, ce qui permet la création de paires d'ions entre la prodrogue et la capsule, paires d'ions stabilisées par l'environnement hydrophobe des domaines dans lesquels la prodrogue se sera insérée.

La masse moléculaire des prodrogues de la présente invention étant inférieur au seuil de filtration rénale, la capsule de structure macromoléculaire a aussi pour fonction
10 de prévenir leur élimination rénale.

Les prodrogues peptidiques de la présente invention sont bio-dégradables et la capsule macromoléculaire a pour fonction de protéger la prodrogue entre le moment de son administration et son arrivée au niveau de la cellule infectée. Les prodrogues peptidiques ou pseudo-peptidiques de la présente invention, néanmoins reconnues par les
15 perméases, peuvent ne pas être biodégradables, en particulier par les peptidases, ce qui a l'avantage de ne pas apporter d'énergie (sous forme d'acides aminés métabolisables) à la cellule ciblée.

« Polymères biodégradables »

20 Par « polymère biodégradable », il est compris dans la présente invention tout polymère sectionné ou dégradé en plusieurs fragments de tailles identiques ou différentes dans l'organisme biologique même auquel ont été administrés ces polymères.

25 « Polyélectrolyte »

Par « polyélectrolyte », il est compris dans la présente invention toute macromolécule qui possède plusieurs groupements ioniques ou ionisables, ou les deux. Quand les groupements ioniques ou ionisés sont de charge négative, le polyélectrolyte est un polyanion.

« Polyanions amphiphiles »

Par « polyanion amphiphile », il est compris dans la présente invention tout polyanion dont au moins une partie de la structure est hydrophobe et au moins une autre partie de la structure est hydrophile.

5

« Dérivés de polymères d'acide malique, d'acide diméthylmalique, d'acide citrique, de L-lysine, de L-sérine, d'héparine »

Par « dérivés de polymères d'acide malique, d'acide diméthylmalique, d'acide citrique, de L-lysine, de L-sérine, d'héparine », il est compris dans la présente invention tout polymère ou copolymère d'acide malique, d'acide diméthylmalique, d'acide citrique, de L-lysine, de L-sérine, d'héparine ayant été alkylé, acylé, acétylé, hydroxylé, phosphatylé, sulfaté, nitré, aminé, etc avant ou après avoir été polymérisé, ainsi que les copolymères qu'ils peuvent former avec des hydroxyacides, tels que les acides glycolique, lactique, 5-hydroxyvalérique, 6-hydroxycaproïque.

15

« Résidu orienteur »

Par « résidu orienteur », il est compris dans la présente invention tout résidu ayant, en raison de sa structure, une affinité avec un ou plusieurs récepteurs biologiques, affinité qui permet à ces récepteurs de reconnaître ledit résidu ainsi que l'ensemble de la structure à laquelle ce résidu est greffé.

20

« Saccharide »

Par « saccharide », encore appelé carbohydrate, il est compris dans la présente invention tout composé organique constitué de carbone, hydrogène et oxygène, ayant pour formule empirique $C_m(H_2O)_n$. De manière structurale, les saccharides selon la présente invention sont des polyhydroxy aldéhydes et cétones. Les saccharides sont subdivisés en 2 groupes : les monosaccharides et les polysaccharides. Les monosaccharides comprennent des molécules comme le glucose, le mannose, le fructose, etc., tandis que les polysaccharides, tels que le sucrose, sont formés par la polymérisation de monosaccharides via la formation de la liaison osidique.

30

« Mis en présence »

Il est compris dans la présente invention que l'expression « mis en présence » équivaut à toute technique pouvant être utilisée par l'homme du métier pour faire réagir deux composés l'un avec l'autre. Par exemple, dans le cas de l'encapsulation d'une prodrogue, ladite prodrogue peut être simplement ajoutée à une solution de polymère servant à l'encapsuler.

« Agent anti-infectieux »

Par l'expression « agent anti-infectieux », il est compris dans la présente invention toute substance permettant de dégrader suffisamment pour le rendre inactif, ou empêcher par tout autre moyen, l'action d'un organisme pathogène, tel qu'un virus ou une bactérie.

« Tuberculose » et « forme persistante de tuberculose »

La tuberculose est une maladie infectieuse transmissible et non immunisante, avec des signes cliniques variables. Elle est provoquée par une mycobactérie du complexe *tuberculosis* correspondant à différents germes et principalement *Mycobacterium tuberculosis* (ou Bacille de Koch ; BK). Par « forme persistante de tuberculose », il est entendu forme persistante du germe responsable de la tuberculose, e.g. *Mycobacterium tuberculosis*.

« Cancer »

Dans le cadre de la présente invention, le terme « cancer » concerne les maladies caractérisées par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme, de telle manière que la survie de ce dernier est menacée. Ces cellules dérivent toutes d'un même clone, cellule initiatrice du cancer qui a acquis certaines caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment. Au cours de l'évolution de la maladie, certaines cellules peuvent migrer depuis leur lieu de production et former des métastases. Dans le cadre de la présente invention, le terme cancer désigne donc par exemple les carcinomes, les sarcomes, les mélanomes, les cancers hématopoïétiques, le cancer du sein, le cancer du colon, le cancer du pancréas, les myélomes, les myélomes multiples, les leucémies, le sarcome de Kaposi, les

lymphomes tels que la maladie de Hodgkin et le lymphome non-hodgkinien, le cancer des testicules et/ou le cancer des poumons. De préférence, la présente invention concerne les mélanomes, et en particulier les mélanomes de type B16.

5 « Composition injectable »

Une composition injectable implique la solubilisation du composé à injecter dans tout type de solvant approprié, tel que l'eau ou du liquide physiologique. Il est entendu par composition injectable des compositions destinées à être administrées par voie transcutanée, parentérale, intramusculaire, intraveineuse, sous la forme de
 10 perfusion, d'injection par l'utilisation d'une seringue ou de tout autre type de forme connu dans le domaine.

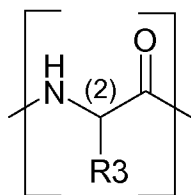
« Diminution de la viabilité »

Par la « diminution de la viabilité », il est compris la lyse, par nécrose ou par
 15 apoptose de cellules, ou l'arrêt, voire diminution de leur division cellulaire. Bien entendu le terme « viabilité » s'applique également aux organismes pathogènes, virus, tumeurs etc.

20 Description détaillée

Un mode de réalisation préféré concerne un composé de formule (I) comme décrit ci-dessus, caractérisé en ce que:

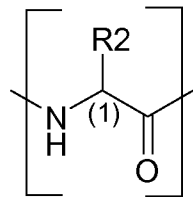
AA1 a pour structure :



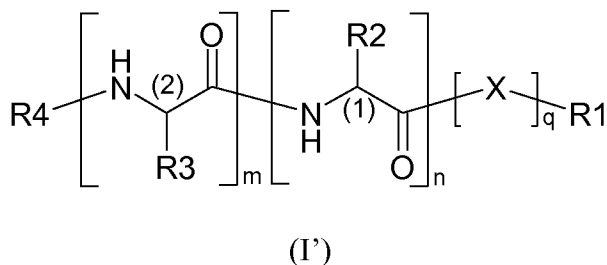
25

dans laquelle R3 est tel que défini comme ci-dessus ;

AA2 a pour structure :



- 5 dans laquelle R2 est tel que défini comme ci-dessus ;
 Ψ représente une liaison peptidique ;
 lorsque les carbones (1), (2) et (3) sont asymétriques, ces derniers sont indépendamment de configuration (R) ou (S).
- 10 En particulier un mode de réalisation préféré de la présente invention concerne un composé de formule (I') :



- 15 caractérisée en ce que :
- m est un nombre entier naturel compris de 0 à 12, préférentiellement compris de 1 à 12, plus préférentiellement compris de 1 à 10, encore plus préférentiellement compris entre 3 et 8, plus préférentiellement encore compris entre 4 et 6 ;
- 20 n est un nombre entier naturel compris de 0 à 12, préférentiellement compris de 1 à 10, plus préférentiellement compris entre 3 et 8, encore plus préférentiellement compris entre 4 et 6 ;
- avec m+n, nombre entier naturel compris de 2 à 12, préférentiellement m+n est un nombre entier naturel compris entre 2 et 10, plus préférentiellement compris entre 3 et 8, encore plus préférentiellement compris entre 4 et 6 ;
- 25 q est un nombre entier naturel choisi entre 0 ou 1 ;

lorsque $q=1$, X est choisi entre les atomes d'oxygène, de soufre ou le groupement NH ;

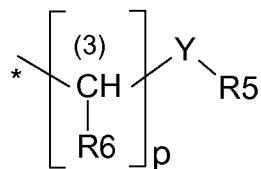
R1 est choisi parmi l'atome d'hydrogène, ou les groupements C_1-C_6 alkyle, C_1-C_6 alkyle substitué par un OH, aryle ou aryl- (C_1-C_6) alkyle) ;

5 lorsque $n>0$, R2 est la chaîne latérale d'un acide aminé, préférentiellement naturel R2 est la chaîne latérale d'un acide aminé naturel;

lorsque $n>1$, les différents R2 sont choisis indépendamment les uns des autres ;

R3 est un fragment de formule (II) relié au reste de la molécule de formule (I') par la liaison marquée d'un * :

10



(II)

15 dans lequel Y est choisi entre les atomes d'oxygène, de soufre, ou le groupement NH ;

R5 est un principe actif, qui peut dissiper les gradients transmembranaires de protons, et/ou interagir avec les acides nucléiques, et/ou inhiber la synthèse protéique, et/ou induire la synthèse de protéines anormales ou non fonctionnelles, relié à Y par une liaison ester, thioester ou amide ;

20 R6 est choisi parmi l'atome d'hydrogène, ou les groupements C_1-C_6 alkyle, aryle ou aryl- (C_1-C_6) alkyle) ;

p est un nombre entier naturel compris de 1 à 10 ;

lorsque $m>1$, les différents R3 sont choisis indépendamment les uns des autres ;

25 R4 est choisi parmi l'atome d'hydrogène, ou les groupements C_1-C_6 alkyle, aryle ou aryl- (C_1-C_6) alkyle) ; et

lorsque les carbones (1), (2) et (3) sont asymétriques, ces derniers sont indépendamment de configuration (R) ou (S).

Préférentiellement, un mode de réalisation de la présente invention concerne un composé de formule (I) ou (I') tel que décrit ci-dessus dans lequel m est un nombre

entier naturel compris de 1 à 10, n est un nombre entier naturel compris de 1 à 10 avec m+n est nombre entier naturel compris entre 2 et 10.

Préférentiellement, un mode de réalisation de la présente invention concerne un composé de formule (I) ou (I') tel que décrit ci-dessus dans lequel m est un nombre
 5 entier naturel compris de 1 à 6, n est un nombre entier naturel compris de 1 à 6 avec m+n est nombre entier naturel compris entre 2 et 8.

Préférentiellement, un mode de réalisation de la présente invention concerne un composé de formule (I) ou (I') tel que décrit ci-dessus dans lequel m est un nombre
 10 entier naturel compris de 3 à 8, n est un nombre entier naturel compris de 1 à 8 avec m+n est nombre entier naturel compris entre 3 et 9.

Préférentiellement, un mode de réalisation de la présente invention concerne un composé de formule (I) ou (I') tel que décrit ci-dessus dans lequel m est un nombre
 15 entier naturel compris de 4 à 6, n est un nombre entier naturel compris de 4 à 6 avec m+n est nombre entier naturel compris entre 4 et 10. Le mode de réalisation selon la formule (I') étant un mode de réalisation préféré de celui de la formule (I), les utilisations applicables aux composés de formule (I) sont bien entendu applicables aux composés de formule (I').

En particulier, l'objet de la présente invention concerne un composé caractérisé en ce que R5, c'est-à-dire le principe actif, est un acyle choisi parmi les groupements
 20 isobutyryle, ($\pm$)-2-méthylbutyryle, (S)-(+)-2-méthylbutyryle, (R)-(-)-2-méthylbutyryle, 2-éthylbutyryle, 2-méthylpentanoyle, 2-méthylhexanoyle, valproyle, 2-éthylhexanoyle, 2-méthylheptanoyle, 3,5,5-triméthylhexanoyle, (S)-3-méthylnonanoyle, 4-méthyl-1-cyclohexanecarbonyle *cis* et/ou *trans*, 3-méthyl-1-cyclohexanecarbonyle *cis* et/ou *trans*, cyclohexaneacétyle, 4-méthylcyclohexaneacétyle *cis* et/ou *trans*, 4-tert-butylcyclohexanecarbonyle *cis* et/ou *trans*, 4-pentylcyclohexanecarbonyle *cis* et/ou
 25 *trans*, α -méthylhydrocinnamoyle, ($\pm$)-2-(4-isobutylphényl)propanoyle, (+)-2-(4-isobutylphényl)propanoyle, (-)-2-(4-isobutylphényl)propanoyle, ($\pm$)-[2-[4-[(4-chlorophényl)phénylméthyl]-1-pipérazinyl]éthoxy]acétyle, (+)-[2-[4-[(4-chlorophényl)phénylméthyl]-1-pipérazinyl]éthoxy]acétyle, (-)-[2-[4-[(4-chlorophényl)phénylméthyl]-1-pipérazinyl]éthoxy]acétyle,
 30 chlorophényl)phénylméthyl]-1-pipérazinyl]éthoxy]acétyle, ($\pm$)-3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-aminopropanoyle, (+)-3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-

aminopropanoyle, (-)-3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-aminopropanoyle, 2-[1-(aminométhyl)cyclohexyl]acétyle et pyrazine-2-carbonyle.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que R5, c'est-à-dire le principe actif, est choisi parmi les groupements 3,5,5-triméthylhexanoyle, (±)-2-(4-isobutylphényl)propanoyle, valproyle ou pyrazine-2-carbonyle.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que R5, c'est-à-dire le principe actif, est le 3,5,5-triméthylhexanoyle.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que R5, c'est-à-dire le principe actif, est le (±)-2-(4-isobutylphényl)propanoyle.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que R5, c'est-à-dire le principe actif, est le valproyle.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que R5, c'est-à-dire le principe actif, est le pyrazine-2-carbonyle.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que :

m est un nombre entier naturel compris de 2 à 5, préférentiellement 2 ;

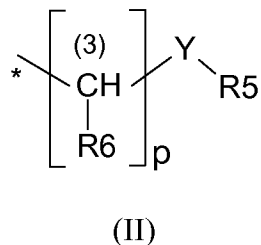
n est 0 ;

q est 1 ;

X est un atome d'oxygène ou de soufre, préférentiellement l'oxygène ;

R1 est C₁-C₆ alkyle, préférentiellement méthyle ou éthyle ;

R3 sont des fragments de formule (II) reliés à la molécule de formule (I) par la liaison marquée d'un * :



dans lequel R5 est choisi parmi les groupements 3,5,5-triméthylhexanoyle, ($\pm$)-2-(4-isobutylphényl)propanoyle, valproyle ou pyrazine-2-carbonyle,
p est un nombre entier naturel compris de 1 à 4, préférentiellement 1 ;
5 Y est choisi entre l'atome d'oxygène ou de soufre, préférentiellement l'oxygène ;
les différents R3 étant choisis indépendamment les uns des autres ;
R4 est l'atome d'hydrogène ; et
le cas échéant, le/les carbones (2) sont de configuration (S) et le/les
10 carbones (3) sont de configuration (R).

Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que ledit composé de formule (I) est encapsulé dans une structure polymère dénommée capsule.

15 Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que la capsule est une structure polymère choisie parmi des polymères biodégradables.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que la capsule est une structure polymère de type polyélectrolytes.

20 Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que la capsule est un dérivé de structure polymère de type polyélectrolytes.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que la capsule est une structure polymère choisie parmi les polyanions amphiphiles, tels que :

- 25
- l'héparine, et ses dérivés, en particulier hydrophobes,
 - les polymères d'acides di- ou tri-carboxyliques, tels que l'acide malique, l'acide diméthylmalique, l'acide citrique, ou de leurs dérivés,
 - les copolymères d'acides di- et/ou tri-carboxyliques, tels que l'acide malique, l'acide diméthylmalique, l'acide citrique, et/ou d'acides aminés, tels que la L-lysine, la L-sérine, et/ou de leurs dérivés,
 - 30 - les copolymères d'acides di- et/ou tri-carboxyliques, tels que l'acide malique, l'acide diméthylmalique, l'acide citrique, et/ou d'acides aminés, tels que la L-

- lysine, la L-sérine, et/ou de leurs dérivés, avec des hydroxyacides, tels que les acides glycolique, lactique, 5-hydroxyvalérique, et/ou 6-hydroxycaproïque,
- et de leurs mélanges.

Dans un mode de réalisation particulier et de manière préférée, la capsule est une structure polymère d'acide malique ou d'un de ses dérivés, telle que les polymères d'acide malique substitué par au moins un alkyle en C₁ à C₃₀, un acyle en C₁ à C₃₀, un phosphate, un nitrate, et/ou un aryl(alkyle en C₁ à C₃₀), une amine primaire, une amine secondaire substituée par un alkyle en C₁ à C₃₀, un acyle en C₁ à C₃₀, ou une amine tertiaire substitué par un alkyle en C₁ à C₃₀, un acyle en C₁ à C₃₀.

De manière plus préférée, la capsule est une structure polymère dérivée d'acide malique, caractérisé en ce que ce polymère d'acide malique est substitué par au moins un benzyle, au moins un phénéthyle, au moins un alkyle avec une chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée comportant entre 1 à 30 carbones, au moins un acétyle, et/ou au moins un acyle avec une chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée comportant entre 1 à 30 carbones.

Ainsi, de manière encore plus préférée, la capsule est une structure polymère d'acide malique substitué par au moins un benzyle.

Egalement encore plus préférée, la capsule est une structure polymère d'acide malique substitué par au moins un phénéthyle.

Egalement encore plus préférée, la capsule est une structure polymère d'acide malique substitué par au moins un acétyle.

Egalement encore plus préférée, la capsule est une structure polymère d'acide malique substitué par au moins un alkyl en C₁ à C₃₀.

Egalement encore plus préférée, la capsule est une structure polymère d'acide malique substitué par au moins un acyle en C₁ à C₃₀.

Dans un autre mode de réalisation particulier et de manière préférée, la capsule est une structure polymère d'acide diméthylmalique ou d'un de ses dérivés, telle que les polymères d'acide diméthylmalique substitué par au moins un alkyle en C₁ à C₃₀, un acyle en C₁ à C₃₀, un phosphate, un nitrate, et/ou un aryl(alkyle en C₁ à C₃₀), une amine primaire, une amine secondaire substituée par un alkyle en C₁ à C₃₀, un acyle en C₁ à C₃₀, ou une amine tertiaire substitué par un alkyle en C₁ à C₃₀, un acyle en C₁ à C₃₀.

De manière plus préférée, la capsule est une structure polymère dérivée d'acide diméthylmalique, caractérisé en ce que ce polymère d'acide diméthylmalique est substitué par au moins un benzyle, au moins un phénéthyle, au moins un alkyle avec une chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée comportant entre 1 à 30 carbones, au moins un acétyle, et/ou au moins un acyle avec une chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée comportant entre 1 à 30 carbones.

Ainsi, de manière encore plus préférée, la capsule est une structure polymère d'acide diméthylmalique substitué par au moins un benzyle.

Egalement encore plus préférée, la capsule est une structure polymère d'acide diméthylmalique substitué par au moins un phénéthyle.

Egalement encore plus préférée, la capsule est une structure polymère d'acide diméthylmalique substitué par au moins un acétyle.

Egalement encore plus préférée, la capsule est une structure polymère d'acide diméthylmalique substitué par au moins un alkyle en C_1 à C_{30} .

Egalement encore plus préférée, la capsule est une structure polymère d'acide diméthylmalique substitué par au moins un acyle en C_1 à C_{30} .

Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que la capsule est une structure polymère greffée d'un résidu orienteur.

Le résidu orienteur peut être directement lié à la structure polymère, ou lié par l'intermédiaire d'un groupement espaceur de type alkyle en C_1 à C_{20} , alkyloxy en C_1 à C_{20} , aryle, aryl(alkyle en C_1 à C_{20}), peptidique, acide aminé, etc., ou enfin de manière non-covalente par un groupement espaceur hydrophobe qui s'enfouit dans la capsule. En effet, le groupement "espaceur" hydrophobe de type alkyle en C_1 à C_{20} , alkyloxy en C_1 à C_{20} , aryle, aryl(alkyle en C_1 à C_{20}), etc. peut s'enfouir dans les domaines lipophiles de la capsule polymère. Il faut cependant une longueur suffisante pour que la liaison non-covalente mannose-capsule soit stable (au moins pendant le temps de transfert sanguin).

Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que le résidu orienteur comprend un saccharide.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que le résidu orienteur est constitué d'un saccharide.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que le résidu orienteur comprend un polysaccharide.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que le résidu orienteur est constitué d'un polysaccharide.

5 Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que le résidu orienteur comprend un monosaccharide.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que le résidu orienteur est constitué d'un monosaccharide.

10 Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que le saccharide est le mannose ou un dérivé de mannose.

Par dérivé de mannose, il est compris un polymère de mannose, préférentiellement compris de 2 à 10 sous-unités mannose reliées entre elles pas une ou plusieurs liaisons osidiques, un mannose dont au moins une fonction hydroxy a été substituée par au moins un alkyle en C₁ à C₃₀, un acyle en C₁ à C₃₀, un phosphate, un
15 nitrate, et/ou un aryl (alkyle en C₁ à C₃₀), ou au moins un groupement hydroxy a été remplacé par une amine primaire, une amine secondaire substituée par un alkyle en C₁ à C₃₀, un acyle en C₁ à C₃₀, ou une amine tertiaire substituée par un alkyle en C₁ à C₃₀, un acyle en C₁ à C₃₀.

20 Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que le saccharide est le mannose.

Le mannose est relié à la structure polymère par une liaison covalente entre ladite structure polymère et l'un quelconque des groupements hydroxy, ou par le carbone anomérique du mannose.

25 Dans un mode de réalisation particulier, le composé selon la présente invention est caractérisé en ce que le composé de formule (I) est mis en présence d'un polymère.

De manière préférée, le composé de formule (I) est mis en présence d'un polymère biodégradable.

De manière préférée, le composé de formule (I) est mis en présence d'un polymère choisi parmi les polymères d'acide malique, d'acide diméthylmalique, d'acide
30 citrique, de L-lysine, de L-sérine, d'héparine, et/ou de leurs dérivés tels que définis ci-dessus.

Figures :

La figure 1 est une illustration des résultats obtenus selon l'exemple 2 de la partie 2 ci-dessous. La courbe en pointillés avec des ronds représente les résultats obtenus après 2 jours de contact entre HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe et les bactéries persistantes. La courbe pleine avec des carrés représente les résultats obtenus après 7 jours de contact entre HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe et les bactéries persistantes. Cette expérience montre la rapidité d'action de la prodrogue HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe.

Exemples :

La présente invention est décrite plus en détail à l'aide des exemples suivants, qui sont donnés à titre d'illustration et auxquels l'invention n'est pas limitée.

Les HPLC analytiques ont été réalisées sur une colonne phase inverse (C18) avec un gradient linéaire de 0 % à 100 % en acétonitrile contenant 1 ‰ d'acide trifluoroacétique (TFA) (de 100 % à 0 % en eau contenant 1 ‰ de TFA) durant 3 minutes.

Les spectres RMN du proton ont été réalisés sur un appareil Brüker AMX 300 MHz. Les produits ont été dissous dans du DMSO deutéré.

Les spectres LC/MS ont été réalisés en mode positif après une chromatographie réalisée dans les conditions définies ci-dessus pour les HPLC analytiques.

Les HPLC préparatives ont été faites sur une colonne phase inverse (C18, 40 mm x 100 mm) avec un gradient variable selon les produits.

Partie 1 : Synthèse des produits**Exemple 1 : synthèse de H-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-OMe**

La synthèse se fait en 4 étapes :

a) 1re étape : synthèse de Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe à partir de Z-Ser(tBu)-OH + H-Ser(tBu)-OMe.

Z-Ser(tBu)-OH (Bachem, 2,95 g, 10 mmol), H-Ser(tBu)-OMe HCl (Bachem, 2,12 g, 10 mmol) et (Benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium

hexafluorophosphate (BOP) (4,87 g, 11 mmol) sont dissous dans l'acétate d'éthyle (100 ml). Le dichlorométhane peut également être utilisé comme solvant. Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de diisopropyléthylamine (DIEA) (6 ml) et la réaction se poursuit pendant une heure à température ambiante. La

5 disparition des produits de départ et l'apparition du dipeptide complètement protégé sont vérifiées par chromatographie sur couche mince de silice (CCM) avec un mélange acétate d'éthyle/hexane (5:5 v/v) comme phase mobile. Le mélange réactionnel est lavé trois fois avec une solution aqueuse de KHSO_4 (135 g/l, 100 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 (100 ml), et finalement une fois avec une

10 solution aqueuse saturée de NaCl (100 ml). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et le solvant évaporé. Le produit est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,97 min), par HPLC/MS (pics à 453,4 (Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe + H^+), 475,4 (Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe + Na^+), 397,3 (fragmentation : une Ser déprotégée), 341,2 (Z-Ser-Ser-OMe = fragmentation : 2 Ser déprotégées); et dans un autre exemple : 453,2 (Z-

15 Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe + H^+), 397,2 (fragmentation : une Ser déprotégée), 341,3 (Z-Ser-Ser-OMe = fragmentation : 2 Ser déprotégées), 905,5 (dimère (= $(2m + \text{H}^+)/z$, $z=1$) de Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe), 922,5 (dimère (= $(2m + \text{Na}^+)/z$, $z=1$) de Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe)) et par ^1H -RMN (doublet à 1,06 et 1,09, pic à 3,26, massif à 3,45, pic à 3,60, quadruplet à 4,15, massif à 4,45, pic à 5,00, massif à 7,3, doublet à 7,95).

20

b) 2e étape : synthèse de Z-Ser-Ser-OMe, à partir de Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe en présence de TFA

Du TFA (20 ml) est ajouté à Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe synthétisé durant l'étape précédente et la réaction se poursuit pendant une heure à température ambiante. La

25 disparition de Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe et l'apparition de Z-Ser-Ser-OMe sont vérifiées par HPLC. Le mélange réactionnel est refroidi en plongeant le ballon dans un mélange glace + sel et Z-Ser-Ser-OMe est précipité par addition d'éther éthylique à -10°C , puis filtré et séché sous vide. Le rendement global de ces deux étapes est de 70 %. Z-Ser-Ser-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 0,99 min), par LC/MS (pics à

30 341,2 (Z-Ser-Ser-OMe), 323,2 (une Ser fragmentée en déhydroAla), 681,2 (dimère (= $(2m + \text{H}^+)/z$, $z=1$) de Z-Ser-Ser-OMe)), et par ^1H -RMN (massif à 3,59, quadruplet à 4,15, massif à 4,35, pic à 5,00, doublet à 7,17 et 7,20, massif à 7,33, doublet à 8,05).

c) 3e étape : synthèse de Z-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-OMe, à partir de Z-Ser-Ser-OMe et d'ibuprofène

Z-Ser-Ser-OMe (2,38 g, 7 mmol), ibuprofénate de sodium (Sigma, 3,54 g, 15,5 mmol) et BOP (7,08 g, 16 mmol) sont dissous dans l'acétate d'éthyle (100 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (4 ml) et la réaction se poursuit pendant une heure à température ambiante. La disparition de Z-Ser-Ser-OMe et l'apparition du conjugué sont vérifiées par CCM (acétate d'éthyle/hexane 5:5 v/v). Une petite quantité d'eau est d'abord ajoutée pour dissoudre le précipité qui s'est formé durant la réaction, et éliminée. La phase organique est lavée trois fois avec une solution aqueuse de KHSO₄ (135 g/l, 100 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (100 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (100 ml). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et le solvant évaporé. Z-[Ser(ibuprofénate)]₂-OMe est purifié par chromatographie sur silice. Il est élué avec une phase mobile hexane/acétate d'éthyle (7:3 v/v). Le contenu des fractions est vérifié par HPLC, celles qui contiennent le produit pur sont rassemblées et le solvant évaporé.

Z-[Ser(ibuprofénate)]₂-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 2,64 min), par HPLC/MS (pics à 717,4 (Z-[Ser(ibuprofénate)]₂-OMe) et 739,3 (Z-[Ser(ibuprofénate)]₂-OMe + Na⁺), et par ¹H-RMN (doublet à 0,78 et 0,80, triplet à 1,13, doublet à 1,29 et 1,31, massif à 1,74, pic à 1,94, doublet à 2,33 et 2,35, pic à 3,29, doublet à 3,45, doublet à 3,52, massif à 3,65, massif à 3,98, pic à 4,10, pic à 4,25, pic à 4,40, pic à 4,60, triplet à 5,00, doublet à 7,02 et 7,05, pic à 7,10, triplet à 7,57, triplet à 8,60).

d) 4e étape : synthèse de H-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-OMe à partir de Z-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-OMe en présence de H₂ et de Pd/C.

Z-[Ser(ibuprofénate)]₂-OMe est dissous dans l'éthanol. Une solution aqueuse d'acide (HCl) est ajoutée pour neutraliser l'amine N-terminale qui sera déprotégée durant l'étape d'hydrogénolyse. Du palladium sur charbon (250 mg) est ajouté et de l'hydrogène est mis à buller pour une heure dans la suspension agitée à température ambiante. Après filtration du charbon, la disparition de Z-[Ser(ibuprofénate)]₂-OMe est vérifiée par HPLC. L'éthanol est évaporé et la solution aqueuse résiduelle est lyophilisée. H-

[Ser(ibuprofénate)]₂-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 2,23 min, par HPLC/MS (pics à 583,3 et 565,3 (- H₂O)), et par ¹H-RMN (doublet à 0,78 et 0,80, massif à 1,34, massif à 1,75, doublet à 2,34 et 2,36, triplet à 3,40, pic à 3,48, pic à 3,53, massif à 3,70, massif à 4,16, massif à 4,35, massif à 4,6, massif à 7,05).

5

Exemple 2 : Synthèse de H-Ala-Ser(ibuprofénate)-OMe

La synthèse se fait en 4 étapes :

a) 1^{re} étape : synthèse de Z-Ala-Ser(tBu)-OMe à partir de Z-Ala-OH + H-Ser(tBu)-OMe en présence de BOP en milieu alcalin

10 Z-Ala-OH (Bachem, 1,37 g, 6,14 mmol), H-Ser(tBu)-OMe HCl (Bachem, 1,3 g, 6,14 mmol) et BOP (2,72 g, 6,14 mmol) sont dissous dans le dichlorométhane (60 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (6 ml) et la réaction se poursuit pendant une heure à température ambiante. L'apparition du dipeptide complètement protégé est vérifiée par CCM (silice et acétate d'éthyle/hexane
15 5:5 v/v). Le mélange réactionnel est lavé trois fois avec une solution aqueuse de KHSO₄ (135 g/l, 60 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (60 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (60 ml). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et le solvant évaporé. La fin de la réaction est confirmée par HPLC, et la présence du dipeptide complètement protégé est confirmée
20 par HPLC/MS. Z-Ala-Ser(tBu)-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 2,76 min) et par LC/MS (pics à 381,1 (Z-Ala-Ser(tBu)-OMe), 403,2 (+ Na⁺), 325,1 (fragmentation : Z-Ala-Ser-OMe), 307,2 (fragmentation : Ser déprotégée transformée en déhydroAla)).

25 b) 2^e étape : synthèse de Z-Ala-Ser-OMe, à partir de Z-Ala-Ser(tBu)-OMe en présence de TFA

Du TFA (30 ml) est ajouté à Z-Ala-Ser(tBu)-OMe synthétisé durant l'étape précédente et la réaction se poursuit pendant deux heures à température ambiante. La disparition de Z-Ala-Ser(tBu)-OMe et l'apparition de Z-Ala-Ser-OMe sont vérifiées par
30 HPLC. Le TFA est évaporé au rotavapor et le résidu est séché sous vide. Z-Ala-Ser-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,08 min).

c) 3e étape : synthèse de Z-Ala-Ser(ibuprofénate)-OMe, à partir de Z-Ala-Ser-OMe et d'ibuprofène en présence de BOP en milieu alcalin

1,63 g de Z-Ala-Ser-OMe non purifié, ibuprofénate de sodium (1,08 g, 4,73 mmol) et BOP (2,09 g, 4,73 mmol) sont dissous dans le dichlorométhane (50 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (6 ml) et la réaction se poursuit pendant 18 heures à température ambiante. La réaction n'étant pas terminée, le mélange réactionnel est porté à 50°C pendant 3 heures. La fin de la réaction est vérifiée par HPLC. Le dichlorométhane est évaporé, remplacé par de l'acétate d'éthyle et cette solution est lavée trois fois avec une solution aqueuse de KHSO₄ (135 g/l, 50 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (50 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (50 ml). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et le solvant évaporé. Z-Ala-Ser(ibuprofénate)-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 2,13 min) et par LC/MS (pics à 512,9 et 535,1 (+ Na⁺) et dans un autre exemple pic à 513,2).

d) 4e étape : synthèse de H-Ala-Ser(ibuprofénate)-OMe à partir de Z-Ala-Ser(ibuprofénate)-OMe en présence de H₂ et de Pd/C.

Z-Ala-Ser(ibuprofénate)-OMe (221 mg) est dissous dans l'éthanol (10 ml). Une solution aqueuse d'acide (HCl) est ajoutée pour neutraliser l'amine N-terminale qui sera déprotégée durant l'étape d'hydrogénolyse. Du palladium sur charbon (50 mg) est ajouté et de l'hydrogène est mis à buller pour une heure dans la suspension agitée à température ambiante. Après filtration du charbon, la solution est évaporée. La disparition de Z-Ala-Ser(ibuprofénate)-OMe et la présence de H-Ala-Ser(ibuprofénate)-OMe sont vérifiées par HPLC. Purifié par HPLC préparative, H-Ala-Ser(ibuprofénate)-OMe sort à 45 % d'acétonitrile. Les fractions pures sont regroupées et lyophilisées. 71 mg (188 µmoles, rendement global = 6 %) de produit pur sont obtenus. H-Ala-Ser(ibuprofénate)-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,71 min) et par LC/MS (pics à 379,2 et 757,4 (dimère)).

Exemple 3: synthèse de H-Ser(valproate)-Ser(valproate)-OMe

À partir de Z-Ser-Ser-OMe dont la synthèse est décrite ci-dessus, cette synthèse se fait en 2 étapes :

a) 1re étape : synthèse de Z-Ser(valproate)-Ser(valproate)-OMe à partir de Z-Ser-Ser-OMe et d'acide valproïque

Z-Ser-SerO-Me (680 mg, 2 mmol), l'acide valproïque (Acros, 660 μ l, 4,2 mmol), le *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) (670 μ l, 4,3 mmol) et la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) (122 mg, 1 mmol) sont dissous dans le dichlorométhane (20 ml). La réaction se poursuit pendant 24 heures à température ambiante. La disparition de Z-Ser-Ser-OMe et l'apparition du conjugué sont vérifiées par HPLC. La phase organique est lavée deux fois avec une solution aqueuse de HCl (0,5 N, 20 ml) et une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (20 ml). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et le solvant évaporé. Z-[Ser(valproate)]₂-OMe est purifié par chromatographie sur silice. Il est élué avec une phase mobile hexane/acétate d'éthyle (7:3 v/v). Le contenu des fractions est vérifié par HPLC, celles qui contiennent le produit pur sont rassemblées et le solvant évaporé. On obtient 499 mg de produit (Rdt = 42,1 %).

Z-[Ser(valproate)]₂-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 2,41 et 2,49 min et par LC/MS (pics à 593,2 et 615,3 (+ Na⁺)) et par ¹H-RMN (massif entre 0,75 et 0,9, massif entre 1,15 et 1,3, massif entre 1,4 et 1,55, massif entre 2,1 et 2,25, pic à 3,25, pic à 7,3, pic à 11,9).

b) 2e étape : synthèse de H-Ser(valproate)-Ser(valproate)-OMe, à partir de Z-Ser(valproate)-Ser(valproate)-OMe en présence de H₂ et de Pd/C.

Z-[Ser(valproate)]₂-OMe (205 mg, 346 μ moles) est dissous dans l'éthanol. Une solution aqueuse d'acide (800 μ l, HCl 1N) est ajoutée pour neutraliser l'amine *N*-terminale qui sera déprotégée durant l'étape d'hydrogénolyse. Du palladium sur charbon (100 mg) est ajouté et de l'hydrogène est mis à buller pour une heure dans la suspension agitée à température ambiante. Après filtration du charbon, la disparition de Z-[Ser(valproate)]₂-OMe est vérifiée par HPLC. La solution est évaporée et H-[Ser(valproate)]₂-OMe est caractérisé par LC/MS (temps de rétention de 1,50 et 1,64 min, pics à 459,0 et 441,3 (- H₂O)).

30 Exemple 4: synthèse de H-Ser(triméthylhexanoate)-Ser(triméthylhexanoate)-OMe

À partir de Z-Ser-Ser-OMe, cette synthèse se fait en 2 étapes.

a) 1^{re} étape : synthèse de Z-Ser(triméthylhexanoate)-Ser(triméthylhexanoate)-OMe à partir de Z-Ser-Ser-OMe et d'acide 3,5,5-triméthylhexanoïque

Z-Ser-SerO-Me (716 mg, 2,1 mmol), l'acide 3,5,5-triméthylhexanoïque (Acros, 740 µl, 4,3 mmol), le DIC (670 µl, 4,3 mmol) et la DMAP (110 mg, 1 mmol) sont dissous dans le dichlorométhane (20 ml). La réaction se poursuit pendant 24 heures à température ambiante. La disparition de Z-Ser-Ser-OMe et l'apparition du conjugué sont vérifiées par HPLC. La phase organique est filtrée, lavée deux fois avec une solution aqueuse de HCl (0,5 N, 20 ml) et une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (20 ml). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et le solvant évaporé. Z-[Ser(triméthylhexanoate)]₂-OMe est purifié par chromatographie sur silice. Il est élué avec une phase mobile hexane/acétate d'éthyle (7:3 v/v). Le contenu des fractions est vérifié par HPLC, celles qui contiennent le produit pur sont rassemblées et le solvant évaporé. On obtient 567 mg (Rdt = 43,5 %).

Z-[Ser(triméthylhexanoate)]₂-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 2,30 et 2,41 (diastéréoisomères)) et par LC/MS (pic à 621,3).

b) 2^e étape : synthèse de H-Ser(triméthylhexanoate)-Ser(triméthylhexanoate)-OMe, à partir de Z-Ser(triméthylhexanoate)-Ser(triméthylhexanoate)-OMe en présence de H₂ et de Pd/C.

Z-[Ser(triméthylhexanoate)]₂-OMe (120 mg, 194 µmoles) est dissous dans l'éthanol. Une solution aqueuse d'acide (500 µl, HCl 1N) est ajoutée pour neutraliser l'amine N-terminale déprotégée durant l'étape d'hydrogénolyse. Du palladium sur charbon (50 mg) est ajouté et de l'hydrogène est mis à buller pour une heure dans la suspension agitée à température ambiante. Après filtration du charbon, la disparition de Z-[Ser(triméthylhexanoate)]₂-OMe est vérifiée par HPLC. La solution est évaporée et H-[Ser(triméthylhexanoate)]₂-OMe est caractérisé par LC/MS (temps de rétention de 1,65 min, pics à 487,1 et 469,3 (- H₂O)).

Exemple 5: synthèse de H-Ala-DL-Ser(pyrazinoate)-OMe

La synthèse se fait en 3 étapes :

a) 1^{re} étape : synthèse de Boc-Ala-DL-Ser-OMe à partir de Boc-Ala-OH et H-DL-Ser-OMe.

Boc-Ala-OH (Bachem, 1,89 g, 10 mmol), H-DL-Ser-OMe HCl (Bachem, 1,87 g, 12 mmol) et BOP (4,42 g, 10 mmol) sont dissous dans le dichlorométhane (100 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (12 ml) et la réaction se poursuit pendant une heure à température ambiante. La phase organique
5 est lavée trois fois avec une solution aqueuse de KHSO_4 (135 g/l, 100 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 (100 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (100 ml). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et concentrée. Boc-Ala-DL-Ser-OMe est purifié par chromatographie sur silice. Il est élué avec une phase mobile hexane/acétate d'éthyle (4:6 v/v). Le contenu des
10 fractions est vérifié par HPLC, celles qui contiennent le produit pur sont rassemblées et le solvant évaporé. 700 mg (2,41 μmoles , rendement = 24 %) de produit pur sont obtenus.

Boc-Ala-DL-Ser-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,76 min), par HPLC/MS (pics à 291,1 (Boc-Ala-DL-Ser-OMe), 313,0 (Boc-Ala-DL-Ser-OMe + Na^+), 235,0 (fragmentation : groupe tBu parti) et 191,1 (fragmentation : groupe Boc parti)) et par ^1H -RMN (doublet à 1,12 et 1,15, pic à 1,33, massif à 3,58, massif à 3,66, triplet à 4, massif à 4,3, massif à 4,98, triplet à 6,86, massif à 7,9).

b) 2e étape : synthèse de Boc-Ala-DL-Ser(pyrazinoate)-OMe à partir de Boc-Ala-DL-Ser-OMe et d'acide pyrazinoïque.

Boc-Ala-DL-Ser-OMe (700 mg, 2,4 mmol), l'acide pyrazinoïque (310 mg, 2,5 mmol) et le BOP (1,11 g, 2,5 mmol) sont dissous dans le dichlorométhane (25 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (2 ml) et la réaction se poursuit pendant une heure à température ambiante. La phase organique
25 est lavée trois fois avec une solution aqueuse de KHSO_4 (135 g/l, 25 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 (25 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (25 ml). Boc-Ala-DL-Ser(pyrazinoate)-OMe est purifié par chromatographie sur silice. Il est élué avec une phase mobile acétate d'éthyle contenant 2 % de méthanol. Le contenu des fractions est vérifié par HPLC, celles qui
30 contiennent le produit pur sont rassemblées et le solvant évaporé. 340 mg (859 μmoles , rendement = 35,8 %) de produit pur sont obtenus. Boc-Ala-DL-Ser(pyrazinoate)-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,18 min), par HPLC/MS (pics à 397,2

(Boc-Ala-DL-Ser(pyrazinoate)-OMe), 419,1 (Boc-Ala-DL-Ser(pyrazinoate)-OMe + Na⁺), 341,1 (fragmentation : groupe tBu parti) et 297,0 (fragmentation : groupe Boc parti)), et par ¹H-RMN (massif à 1,12, doublet à 1,19 et 1,21, pic à 3,28, doublet à 3,63 et 3,65, massif à 3,99, massif à 4,57, massif à 4,8, doublet à 6,85 et 6,87, triplet à 8,37, pic à 8,8, doublet à 8,86 et 8,87, pic à 9,17).

c) 3e étape : synthèse de H-Ala-DL-Ser(pyrazinoate)-OMe à partir de Boc-Ala-DL-Ser(pyrazinoate)-OMe

Boc-Ala-DL-Ser(pyrazinoate)-OMe (340 mg, 859 µmoles) est dissous dans un mélange dichlorométhane (2 ml) et TFA (2 ml). La réaction se poursuit pendant trente minutes à température ambiante. Le produit est purifié par HPLC préparative et les fractions contenant le produit pur sont regroupées et lyophilisées. 111 mg (375 µmoles, rendement = 43,7 %, rendement global des 3 étapes = 3,75 %) de produit pur sont obtenus. H-Ala-DL-Ser(pyrazinoate)-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 0,72 min) et par HPLC/MS (pics à 297,1 (H-Ala-DL-Ser(pyrazinoate)-OMe) et 319,0 (H-Ala-DL-Ser(pyrazinoate)-OMe + Na⁺)).

Exemple 6 : synthèse de H-Ser(pyrazinoate)-Ser(pyrazinoate)-OMe à partir de Z-Ser-Ser-OMe et d'acide pyrazinoïque

a) 1re étape : synthèse de Z-Ser(pyrazinoate)-Ser(pyrazinoate)-OMe à partir de Z-Ser-Ser-OMe et d'acide pyrazinoïque

Z-Ser-Ser-OMe (680 mg, 2 mmol), l'acide pyrazinoïque (546 mg, 4,4 mmol) et BOP (1,99 g, 4,5 mmol) sont dissous dans l'acétate d'éthyle (20 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (4 ml) et la réaction se poursuit pendant une heure à température ambiante. La disparition de Z-Ser-Ser-OMe et l'apparition du conjugué sont vérifiées par HPLC. La phase organique est lavée trois fois avec une solution aqueuse de KHSO₄ (135 g/l, 20 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (20 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (20 ml). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et le solvant évaporé. Z-[Ser(pyrazinoate)]₂-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,43 min) et par HPLC/MS (pics à 553,0 et 575,0 (+ Na⁺)).

b) 2e étape : synthèse de H-Ser(pyrazinoate)-Ser(pyrazinoate)-OMe à partir de Z-Ser(pyrazinoate)-Ser(pyrazinoate)-OMe en présence de H₂ et de Pd/C

- Z-[Ser(pyrazinoate)]₂-OMe (28 mg, 50,7 μmol) est dissous dans l'éthanol. Une solution aqueuse d'acide (HCl 1N, 51 μl) est ajoutée pour neutraliser l'amine *N*-terminale qui sera déprotégée durant l'étape d'hydrogénolyse. Du palladium sur charbon est ajouté et de l'hydrogène est mis à buller pendant une heure dans la suspension agitée à température ambiante. Après filtration du charbon et lavage du charbon au méthanol, la disparition de Z-[Ser(pyrazinoate)]₂-OMe et l'apparition de H-[Ser(pyrazinoate)]₂-OMe sont vérifiées par HPLC. Le solvant est évaporé.
- H-[Ser(pyrazinoate)]₂-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 0,7 min), et par LC/MS (pic à 419 (H-[Ser(pyrazinoate)]₂-OMe + H⁺).

Exemple 7 : synthèse de H-[NHCH({CH₂})₃Olévoxfloxacinat)CO]₂-OMe

- La synthèse se fait en 5 étapes :

a) 1re étape : synthèse de Z-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-OMe à partir de Z-Glu(OtBu)-OH + H-Glu(OtBu)-OMe

- Z-Glu(OtBu)-OH (Bachem, 3,37 g, 10 mmol), H-Glu(OtBu)-OMe HCl (Bachem, 2,54 g, 10 mmol) et BOP (4,87 g, 11 mmol) sont dissous dans le dichlorométhane (100 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (6 ml) et la réaction se poursuit pendant une heure à température ambiante. L'apparition du dipeptide complètement protégé est vérifiée par CCM (silice et acétate d'éthyle/hexane 5:5 v/v). Le mélange réactionnel est lavé trois fois avec une solution aqueuse de KHSO₄ (135 g/l, 100 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (100 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (100 ml). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et le solvant concentré. Z-[Glu(OtBu)]₂-OMe est purifié par chromatographie sur silice. Il est élué avec une phase mobile hexane/acétate d'éthyle (8:2 v/v). Le contenu des fractions est vérifié par HPLC, celles qui contiennent le produit pur sont rassemblées et le solvant évaporé. On obtient 4,76 g (Rdt = 88,8 %). Z-[Glu(OtBu)]₂-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,91 min) et par HPLC/MS (pics à 537,0, 559,3 (+ Na⁺), 481,2 (fragmentation : un Glu déprotégé), 425,2 (fragmentation : 2 Glu déprotégés)).

b) 2e étape : synthèse de Z-Glu-Glu-OMe à partir de Z-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-OMe en présence de TFA

Z-[Glu(OtBu)]₂-OMe est dissous dans le TFA (15 ml) et la réaction se poursuit pendant 10 minutes à température ambiante. La disparition de Z-[Glu(OtBu)]₂-OMe et l'apparition de Z-Glu-Glu-OMe sont vérifiées par HPLC. Le rendement est de 78 %. Z-Glu-Glu-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,10 min) et par HPLC/MS (pics à 425,3, 447,4 (+ Na⁺), 849,4 (dimère + H⁺), 871,4 (dimère + Na⁺), 381,2 (fragmentation : un Glu décarboxylé), 425,2 (fragmentation : - H₂O par rapport à la forme décarboxylée)).

10

c) 3e étape : synthèse de Z-[NHCH({CH₂})₃OH)CO]₂-OMe à partir de Z-Glu-Glu-OMe.

Z-Glu-Glu-OMe (3,36 g, 7,92 mmol) est dissous dans le diméthyléthylèneglycol (160 ml), le ballon étant refroidi par un mélange glace + sel. Dans la solution agitée, on ajoute de l'isobutylchloroformiate (2,3 ml, 17,4 mmol). Deux minutes plus tard, on ajoute de la *N*-méthylmorpholine (1,9 ml, 17,4 mmol). Enfin, cinq minutes plus tard, on ajoute en plusieurs fois du NaBH₄ (2 g, 52 mmol) dissous dans un peu d'eau. La réaction se poursuit pendant une heure en laissant la température du mélange réactionnel revenir à la température ambiante. Les solvants sont évaporés. Z-[NHCH({CH₂})₃OH)CO]₂-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,06 min) et par HPLC/MS (pics à 397,0, 419,2 (+ Na⁺), 793,3 (dimère + H⁺)).

20

d) 4e étape : synthèse de Z-[NHCH({CH₂})₃Olévoxfloxacinate)CO]₂-OMe à partir de Z-[NHCH({CH₂})₃OH)CO]₂-OMe et lévofloxacine

Z-[NHCH({CH₂})₃OH)CO]₂-OMe (145 mg, 0,37 mmol), lévofloxacine (Sigma, 660 mg, 1,83 mmol) et BOP (810 mg, 1,83 mmol) sont dissous dans le dichlorométhane (5 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (2 ml) et la réaction se poursuit pendant 18 heures à température ambiante. La DIEA est neutralisée par addition de TFA, le précipité blanc est filtré et le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans l'acétonitrile et purifié par HPLC préparative. Les fractions contenant Z-[NHCH({CH₂})₃Olévoxfloxacinate)CO]₂-OMe et le dipeptide ne portant qu'un seul résidu lévofloxacine sont lyophilisées. On obtient 17,5 mg (16

25

30

μmoles) de Z-[NHCH({CH₂})₃Olévoxfloxacinat)CO]₂-OMe. Il est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,37 min) et par HPLC/MS (pics à 1083,3, 542,2 (monomère + 2 H⁺), 362,2 (fragmentation : lévofloxacin), 318,3 (fragmentation : lévofloxacin décarboxylée)). Dans un autre exemple, l'HPLC/MS donne les pics à 1083,67, 542,39 (monomère + 2 H⁺), 361,90 (monomère + 3 H⁺) et 362,16 (fragmentation : lévofloxacin).

Pour le dipeptide ne portant qu'un seul résidu lévofloxacin, le temps de rétention HPLC est de 1,27 min et l'HPLC/MS donne les pics à 740,36, 762,16 (+ Na⁺), 370,89 (monomère + 2 H⁺) et 362,22 (fragmentation : lévofloxacin).

10

e) 5e étape : synthèse de H-[NHCH({CH₂})₃Olévoxfloxacinat)CO]₂-OMe à partir de Z-[NHCH({CH₂})₃Olévoxfloxacinat)CO]₂-OMe en présence de H₂ et de Pd/C.

Z-[NHCH({CH₂})₃Olévoxfloxacinat)CO]₂-OMe (17,5 mg, 16 μmoles) est dissous dans l'acétone (1 ml) à laquelle est ajouté de l'acide acétique (1,5 μl) pour neutraliser l'amine N-terminale déprotégée durant l'étape d'hydrogénolyse. On peut aussi utiliser éthanol + HCl comme solvant. Du palladium sur charbon (20 mg) est ajouté et de l'hydrogène est mis à buller pour une heure dans la suspension à température ambiante. Après filtration du charbon, la disparition de Z-[NHCH({CH₂})₃Olévoxfloxacinat)CO]₂-OMe et l'apparition de H-[NHCH({CH₂})₃Olévoxfloxacinat)CO]₂-OMe sont vérifiées par HPLC. Les fractions contenant H-[NHCH({CH₂})₃Olévoxfloxacinat)CO]₂-OMe sont lyophilisées. On recueille 1,2 mg de produit. H-[NHCH({CH₂})₃Olévoxfloxacinat)CO]₂-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,07 min) et par HPLC/MS (pics à 949,6 et 971,6 (+ Na⁺)). Dans un autre exemple, l'HPLC/MS donne les pics à 475,2 (monomère + 2 H⁺), 317,1 (monomère + 3 H⁺), et 362,2 (fragmentation : lévofloxacin).

Exemple 8 : synthèse de H-[NHCH({CH₂})₃Opyrazinoat)CO]₂-OMe

À partir de Z-[NHCH({CH₂})₃OH)CO]₂-OMe dont la synthèse est décrite ci-dessus, cette synthèse se fait en 2 étapes :

30

a) 1re étape : synthèse de Z-[NHCH({CH₂})₃Opyrazinoat)CO]₂-OMe à partir de Z-[NHCH({CH₂})₃OH)CO]₂-OMe et d'acide pyrazinoïque

Z-[NHCH({CH₂})₃OH)CO]₂-OMe (1,385 g, 3,5 mmol), l'acide pyrazinoïque (1,04 g, 8,4 mmol) et le BOP (3,7 g, 8,4 mmol) sont dissous dans le dichlorométhane (35 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (6 ml) et la réaction se poursuit pendant 1 heure 30 minutes à température ambiante. La disparition des produits de départ et l'apparition de Z-[NHCH({CH₂})₃Opyrazinoate)CO]₂-OMe sont vérifiées par chromatographie sur couche mince de silice (CCM) avec un mélange acétate d'éthyle/hexane (5:5 v/v) comme phase mobile. Le mélange réactionnel est lavé trois fois avec une solution aqueuse de KHSO₄ (135 g/l, 100 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (100 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (100 ml). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et filtrée. Le produit est purifié par chromatographie sur silice. Il est élué avec une phase mobile dichlorométhane/méthanol (100:3 v/v). Le contenu des fractions est vérifié par HPLC, celles qui contiennent le produit pur sont rassemblées et le solvant évaporé. On obtient 1,8 g de Z-[NHCH({CH₂})₃Opyrazinoate)CO]₂-OMe (rendement = 84 %).

Z-[NHCH({CH₂})₃Opyrazinoate)CO]₂-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,32 min ou 1,53 min selon les conditions), et par LC/MS (pics à 609,0 (Z-[NHCH({CH₂})₃Opyrazinoate)CO]₂-OMe + H⁺), 631,0 (Z-[NHCH({CH₂})₃Opyrazinoate)CO]₂-OMe + Na⁺).

20

b) 2e étape : synthèse de H-[NHCH({CH₂})₃Opyrazinoate)CO]₂-OMe à partir de Z-[NHCH({CH₂})₃Opyrazinoate)CO]₂-OMe en présence de H₂ et de Pd/C.

Z-[NHCH({CH₂})₃Opyrazinoate)CO]₂-OMe (748 mg, 1,23 μmol) est dissous dans l'éthanol (20 ml) auquel est ajouté HCl 0,5 N (2,6 μl) pour neutraliser l'amine N-terminale déprotégée durant l'étape d'hydrogénolyse. Du palladium sur charbon est ajouté et de l'hydrogène est mis à buller dans la suspension à température ambiante. Après filtration du charbon, la disparition de Z-[NHCH({CH₂})₃Opyrazinoate)CO]₂-OMe et l'apparition de H-[NHCH({CH₂})₃Opyrazinoate)CO]₂-OMe sont vérifiées par HPLC. H-[NHCH({CH₂})₃Opyrazinoate)CO]₂-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 0,91 min ou 1,09 min selon les conditions), et par LC/MS (pics à 475,1 (H-[NHCH({CH₂})₃Opyrazinoate)CO]₂-OMe + H⁺) et 497,3 (H-[NHCH({CH₂})₃Opyrazinoate)CO]₂-OMe + Na⁺).

Exemple 9 : synthèse de H-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-OMe

À partir de Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe dont la synthèse est décrite ci-dessus, la synthèse se fait en 7 étapes :

5

a) 1^{re} étape : synthèse de H-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe à partir de Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe.

Z-[Ser(tBu)]₂-OMe (préparation à la 1^{re} étape de l'exemple 1, environ 10 mmol) est dissous dans l'éthanol. Une solution aqueuse d'HCl 1N est ajoutée pour neutraliser l'amine N-terminale qui sera déprotégée durant l'étape d'hydrogénolyse. Du palladium sur charbon (250 mg) est ajouté et de l'hydrogène est mis à buller pour une heure dans la suspension agitée à température ambiante. Après filtration du charbon, la disparition de Z-[Ser(tBu)]₂-OMe est vérifiée par HPLC. L'éthanol est évaporé et la solution aqueuse résiduelle est lyophilisée. H-[Ser(tBu)]₂-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 0,94 min ou 1,1 min selon les conditions), et par HPLC/MS (pics à 319,1 (H-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe + H⁺), 263,1 (fragmentation : une Ser déprotégée), 207,1 (H-Ser-Ser-OMe = fragmentation : 2 Ser déprotégées), et 637,3 (dimère (= (2m + H⁺)/z, z=1)).

10

15

b) 2^e étape : synthèse de Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe à partir de Z-Ser(tBu)-OH + H-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe.

Z-Ser(tBu)-OH (Bachem, 2,95 g, 10 mmol), H-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe (préparé à l'étape précédente) et BOP (5,31 g, 12 mmol) sont dissous dans l'acétate d'éthyle (100 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de diisopropyléthylamine (DIEA) (6 ml) et la réaction se poursuit pendant une heure à température ambiante. La disparition des produits de départ et l'apparition du tripeptide complètement protégé sont vérifiées par HPLC. Le mélange réactionnel est lavé trois fois avec une solution aqueuse de KHSO₄ (135 g/l, 100 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (100 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (100 ml). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et le solvant évaporé. Le produit est purifié par chromatographie sur silice. Il est élué avec une phase mobile hexane/acétate d'éthyle (5:5 v/v). Le contenu des fractions est vérifié

20

25

30

par HPLC, celles qui contiennent le produit pur sont rassemblées et le solvant évaporé. Le produit est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 2,02 min ou 2,23 min selon les conditions), et par HPLC/MS (pics à 596,23 (Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe + H⁺), 540,13 (fragmentation : une Ser déprotégée), 618,21 (Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe + Na⁺)).

c) 3e étape : synthèse de H-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe à partir de Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe.

Z-[Ser(tBu)]₃-OMe (préparation à l'étape précédente) est dissous dans l'éthanol.

10 Une solution aqueuse d'HCl 1N est ajoutée pour neutraliser l'amine *N*-terminale qui sera déprotégée durant l'étape d'hydrogénolyse. Du palladium sur charbon (150 mg) est ajouté et de l'hydrogène est mis à buller pour une heure dans la suspension agitée à température ambiante. Après filtration du charbon, la disparition de Z-[Ser(tBu)]₃-OMe est vérifiée par HPLC. L'éthanol est évaporé et la solution aqueuse résiduelle est

15 lyophilisée. H-[Ser(tBu)]₃-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,27 min ou de 1,56 min selon les conditions), et par HPLC/MS (pics à 462,13 (H-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe + H⁺) et 406,17 (fragmentation : une Ser déprotégée)). En MS haute résolution, on observe une masse de 462,3178, contre 462,3179 masse théorique attendue pour la composition C₂₂ H₄₄ N₃ O₇ correspondant à H-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe + H⁺.

20

d) 4e étape : synthèse de Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe à partir de Z-Ser(tBu)-OH + H-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe.

Z-Ser(tBu)-OH (Bachem, 1,18 g, 4 mmol), H-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe

25 (préparé à l'étape précédente, environ 3,5 mmol) et BOP (1,95 g, 4,4 mmol) sont dissous dans l'acétate d'éthyle (40 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de diisopropyléthylamine (DIEA) (6 ml) et la réaction se poursuit pendant une heure à température ambiante. La disparition des produits de départ et l'apparition du térapeptide complètement protégé sont vérifiées par HPLC. Le mélange

30 réactionnel est lavé trois fois avec une solution aqueuse de KHSO₄ (135 g/l, 40 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (40 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (40 ml). La phase organique est séchée sur

Na₂SO₄, filtrée et le solvant évaporé. Le produit est purifié par chromatographie sur silice. Il est élué avec une phase mobile hexane/acétate d'éthyle (5:5 v/v). Le contenu des fractions est vérifié par HPLC, celles qui contiennent le produit pur sont rassemblées et le solvant évaporé. Le produit est caractérisé par HPLC (temps de
5 rétention de 2,11 min), et par HPLC/MS (pics à 739,3 (Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe + H⁺) et 683,2 (fragmentation : une Ser déprotégée)).

e) 5e étape : synthèse de Z-Ser-Ser-Ser-Ser-OMe, à partir de Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe en présence de TFA

10 Du TFA (10 ml) est ajouté à Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe (393 mg, 0,533 mmol) synthétisé durant l'étape précédente. La disparition de Z-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-OMe et l'apparition de Z-Ser-Ser-Ser-Ser-OMe sont vérifiées par HPLC. Le TFA est évaporé, puis Z-Ser-Ser-Ser-Ser-OMe est séché sous vide. Z-Ser-Ser-Ser-Ser-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 0,94 min
15 ou de 1 min selon les conditions), et par LC/MS (pics à 515,1 (Z-Ser-Ser-Ser-Ser-OMe + H⁺), et 497,1 (une Ser fragmentée en déhydroAla)).

f) 6e étape : synthèse de Z-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-OMe, à partir de Z-Ser-Ser-Ser-Ser-OMe et
20 d'ibuprofène

Z-Ser-Ser-Ser-Ser-OMe (environ 0,5 mmol), ibuprofénate de sodium (Sigma, 550 mg, 2,4 mmol) et BOP (1,1 g, 2,5 mmol) sont dissous dans l'acétate d'éthyle (20 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (2 ml) et la réaction se poursuit toute la nuit à température ambiante. La disparition de
25 Z-Ser-Ser-Ser-Ser-OMe et l'apparition du conjugué sont vérifiées par HPLC. Une petite quantité d'eau est d'abord ajoutée pour dissoudre le précipité qui s'est formé durant la réaction, et éliminée. La phase organique est lavée trois fois avec une solution aqueuse de KHSO₄ (135 g/l, 20 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (20 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (20
30 ml). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et le solvant évaporé. Z-[Ser(ibuprofénate)]₄-OMe est caractérisé par HPLC (2 pics à 3,01 et 3,05 min ou massif de 3 pics (16 diastéréoisomères possibles) avec temps de rétention entre 3,2 et 3,4 min

selon les conditions). Ce produit est trop hydrophobe pour être détecté par HPLC/MS (pas d'ionisation). On obtient sa masse ($1289,7 = Z\text{-[Ser(ibuprofénate)]}_4\text{-OMe} + \text{Na}^+$) par introduction directe et MALDI.

5 g) 7^e étape : synthèse de H-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-OMe à partir de Z-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-OMe en présence de H_2 et de Pd/C.

10 Z-[Ser(ibuprofénate)]₄-OMe (30 mg, 23,7 μmol) est dissous dans un mélange méthanol-éthanol (1 ml-10 ml). Une solution aqueuse d'acide (24 μl , HCl 1N) est ajoutée pour neutraliser l'amine N-terminale qui sera déprotégée durant l'étape d'hydrogénolyse. Du palladium sur charbon est ajouté et de l'hydrogène est mis à buller pendant une heure dans la suspension agitée à température ambiante. Après filtration du charbon, la disparition de Z-[Ser(ibuprofénate)]₄-OMe est vérifiée par HPLC. Le
15 solvant est évaporé.

H-[Ser(ibuprofénate)]₄-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 2,55 min) et par LC/MS (pic à 1133,7 (H-[Ser(ibuprofénate)]₄-OMe + H^+) et 1155,7 (H-[Ser(ibuprofénate)]₄-OMe + Na^+)).

20 On observe aussi un produit minoritaire caractérisé par HPLC (temps de rétention de 2,61 min), et par LC/MS (pic à 1147,7 (H-[Ser(ibuprofénate)]₄-OEt + H^+)). Ce produit provient d'une transestérification entre méthanol et éthanol au cours de la dernière étape où l'éthanol est utilisé comme solvant majoritaire.

Exemple 10 : synthèse de H-Lys(ibuprofénate)-Lys(ibuprofénate)-OMe

25 La synthèse se fait en 4 étapes :

a) 1^{re} étape : synthèse de Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OMe à partir de Z-Lys(Boc)-OH + H-Lys(Boc)-OMe en présence de BOP en milieu alcalin.

30 Z-Lys(Boc)-OH (Bachem, 3,8 g, 10 mmol), H-Lys(Boc)-OMe HCl (Bachem, 2,97 g, 10 mmol) et BOP (4,87 g, 11 mmol) sont dissous dans l'acétate d'éthyle (100 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (8 ml) et la réaction se poursuit pendant une heure 45 min à température ambiante. La disparition

des produits de départ et l'apparition du dipeptide complètement protégé sont vérifiées par HPLC. Le mélange réactionnel est lavé trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 (100 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse de KHSO_4 (135 g/l, 100 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (100 ml). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et le solvant évaporé. Le produit est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,88 min ou 2 min selon les conditions), et par HPLC/MS (pics à 623,3 (Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OMe + H^+), 645,2 (Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OMe + Na^+), 523,2 (fragmentation : une Lys déprotégée), 467,1 (fragmentation : une Lys déprotégée et départ d'un tBu)). On a aussi deux petits pics à 661 (Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OMe + K^+) et 567 (fragmentation : départ d'un tBu). En MS haute résolution, on observe une masse de 623,3657, contre 623,3656 masse théorique attendue pour la composition $\text{C}_{31} \text{H}_{51} \text{N}_4 \text{O}_9$ correspondant à Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OMe + H^+ .

b) 2e étape : synthèse de Z-Lys-Lys-OMe à partir de Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OMe en présence de TFA

Du TFA (20 ml) est ajouté à Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OMe synthétisé durant l'étape précédente et la réaction se poursuit pendant 15 min à température ambiante. La disparition de Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OMe et l'apparition de Z-Lys-Lys-OMe sont vérifiées par HPLC. Le TFA est évaporé en présence d'hexane, puis d'acétone et le produit est finalement séché sous vide durant la nuit. Z-Lys-Lys-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 0,76-0,78 min ou 0,92 min selon les conditions), et par LC/MS (pics à 423,1 (Z-Lys-Lys-OMe + H^+), 289,2 (fragmentation : départ du Z) et 212,2 (= (Z-Lys-Lys-OMe + 2H^+)/z, z=2)). En MS haute résolution, on observe une masse de 423,2590, contre 423,2607 masse théorique attendue pour la composition $\text{C}_{21} \text{H}_{35} \text{N}_4 \text{O}_5$ correspondant à Z-Lys-Lys-OMe + H^+ .

c) 3e étape : synthèse de Z-Lys(ibuprofénate)-Lys(ibuprofénate)-OMe, à partir de Z-Lys-Lys-OMe et d'ibuprofène

Z-Lys-Lys-OMe (2 mmol), ibuprofénate de sodium (Sigma, 525 mg, 2,3 mmol) et BOP (1,02 g, 2,3 mmol) sont dissous dans l'acétate d'éthyle (20 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (2 ml) et la réaction se

poursuit pendant une heure à température ambiante. La disparition de Z-Lys-Lys-OMe et l'apparition du conjugué sont vérifiées par HPLC. Le mélange réactionnel est lavé trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 (20 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse de KHSO_4 (135 g/l, 20 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (20 ml). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et le solvant évaporé. Le produit est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 2,34 min), et par HPLC/MS (pics à 799,6 (Z-[Lys(ibuprofénate)]₂-OMe + H^+), 821,6 (Z-[Lys(ibuprofénate)]₂-OMe + Na^+) et 665,5 (fragmentation : H-[Lys(ibuprofénate)]₂-OMe + H^+)).

10

d) 4e étape : synthèse de H-Lys(ibuprofénate)-Lys(ibuprofénate)-OMe à partir de Z-Lys(ibuprofénate)-Lys(ibuprofénate)-OMe en présence de H_2 et de Pd/C.

Z-[Lys(ibuprofénate)]₂-OMe (931 mg, 1,17 mmol) est dissous dans l'éthanol. Une solution aqueuse d'acide (HCl N) est ajoutée pour neutraliser l'amine N-terminale qui sera déprotégée durant l'étape d'hydrogénolyse. Du palladium sur charbon (250 mg) est ajouté et de l'hydrogène est mis à buller pour quatre heures 40 min dans la suspension agitée à température ambiante. Après filtration du charbon, la disparition de Z-[Ser(ibuprofénate)]₂-OMe et l'apparition de H-[Ser(ibuprofénate)]₂-OMe sont vérifiées par HPLC. L'éthanol est évaporé et la solution aqueuse résiduelle est lyophilisée. H-[Ser(ibuprofénate)]₂-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,72 min à vérifier sur l'HPLC analytique) et par HPLC/MS (pics à 665,4 (H-[Lys(ibuprofénate)]₂-OMe + H^+), et 333,2 (= (H-[Lys(ibuprofénate)]₂-OMe + 2H^+)/z, z=2) et 477,3 (fragmentation : un ibuprofénate parti)).

25 Exemple 11 : synthèse de H-Lys(pyrazinoate)-Lys(pyrazinoate)-OMe

À partir de Z-Lys-Lys-OMe dont la synthèse est décrite ci-dessus, la synthèse se fait en 2 étapes :

30 a) 1re étape : synthèse de Z-Lys(pyrazinoate)-Lys(pyrazinoate)-OMe, à partir de Z-Lys-Lys-OMe et d'acide pyrazinoïque.

Z-Lys-Lys-OMe (environ 1,3 mmol), acide pyrazinoïque (360 mg, 2,9 mmol) et BOP (1,3 g, 2,94 mmol) sont dissous dans l'acétate d'éthyle (20 ml). Le pH, vérifié au

papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (2 ml) et la réaction se poursuit pendant une heure 40 min à température ambiante. La disparition de Z-Lys-Lys-OMe et l'apparition du conjugué sont vérifiées par HPLC. Le mélange réactionnel est lavé trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 (20 ml), puis trois fois
5 avec une solution aqueuse de KHSO_4 (135 g/l, 20 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (20 ml). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et le solvant évaporé. Le produit est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,34 min), et par HPLC/MS (pics à 635,2 (Z-[Lys(pyrazinoate)]₂-OMe + H^+), 657,2 (Z-[Lys(pyrazinoate)]₂-OMe + Na^+) et 501,1 (fragmentation : H-[Lys(pyrazinoate)]₂-OMe
10 + H^+)). En MS haute résolution, on observe une masse de 635,2942 contre 635,2936 masse théorique attendue pour la composition $\text{C}_{31} \text{H}_{39} \text{N}_8 \text{O}_7$ correspondant à Z-Lys(pyrazinoate)-Lys(pyrazinoate)-OMe + H^+ .

b) 2e étape : synthèse de H-Lys(pyrazinoate)-Lys(pyrazinoate)-OMe à partir de
15 Z-Lys(pyrazinoate)-Lys(pyrazinoate)-OMe en présence de H_2 et de Pd/C.

Z-[Lys(pyrazinoate)]₂-OMe (78 mg, 123 μmol) est dissous dans l'éthanol. Une solution aqueuse d'acide (HCl 1N, 123 μl) est ajoutée pour neutraliser l'amine N-terminale qui sera déprotégée durant l'étape d'hydrogénolyse. Du palladium sur charbon (250 mg) est ajouté et de l'hydrogène est mis à buller pendant une heure dans la
20 suspension agitée à température ambiante. Après filtration du charbon, la disparition de Z-[Lys(pyrazinoate)]₂-OMe et l'apparition de H-[Lys(pyrazinoate)]₂-OMe sont vérifiées par HPLC. Le solvant est évaporé. H-[Lys(pyrazinoate)]₂-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 0,83 min), par LC/MS (pics à 501,2 (H-[Lys(pyrazinoate)]₂-OMe + H^+) et 523,2 (H-[Lys(pyrazinoate)]₂-OMe + Na^+)), et par
25 MS haute résolution. Dans ce dernier cas, on observe une masse de 501,2574 contre 501,2563, masse théorique pour la formule brute $\text{C}_{23} \text{H}_{33} \text{N}_8 \text{O}_5$ correspondant à H-Lys(pyrazinoate)-Lys(pyrazinoate)-OMe + H^+ .

30 Exemple 12 : synthèse de H-Ser(ibuprofénate)-NH(CH₂)₂Oibuprofénate

La synthèse se fait en 2 étapes :

a) 1re étape : synthèse de Z-Ser(ibuprofénate)-NH(CH₂)₂Oibuprofénate à partir de Z-SerOH et d'éthanolamine, puis d'ibuprofène

ZSerOH (Bachem, 478 mg, 2 mmol), éthanolamine (122 mg, 2 mmol) et BOP (885 mg, 2 mmol) sont dissous dans l'acétonitrile (20 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (4 ml) et la réaction se poursuit pendant deux heures à température ambiante. On ajoute alors ibuprofénate de sodium (1,6 g, 7 mmol) et BOP (3,1 g, 7 mmol). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (3 ml) et la réaction se poursuit toute la nuit à température ambiante. L'acétonitrile est évaporé et remplacé par l'acétonitrile (20 ml). Le mélange réactionnel est lavé trois fois avec une solution aqueuse de KHSO₄ (135 g/l, 20 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (20 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (20 ml). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et le solvant évaporé. Le produit est purifié par chromatographie sur silice. Il est élué avec une phase mobile hexane/acétate d'éthyle (6:4 v/v). Le contenu des fractions est vérifié par HPLC, celles qui contiennent le produit pur sont rassemblées et le solvant évaporé. On obtient 206 mg (Rdt = 15,6 %). Le produit est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 2,55 min, et par HPLC/MS (pics à 659,3 (Z-Ser(ibuprofénate)-NH(CH₂)₂Oibuprofénate + H⁺), 681,3 (Z-Ser(ibuprofénate)-NH(CH₂)₂Oibuprofénate + Na⁺)).

20

b) 2e étape : synthèse de H-Ser(ibuprofénate)-NH(CH₂)₂Oibuprofénate à partir de Z-Ser(ibuprofénate)-NH(CH₂)₂Oibuprofénate

Z-Ser(ibuprofénate)-NH(CH₂)₂Oibuprofénate (206 mg, 313 μmol) est dissous dans l'éthanol. Une solution aqueuse d'HCl 1N est ajoutée pour neutraliser l'amine N-terminale qui sera déprotégée durant l'étape d'hydrogénolyse. Du palladium sur charbon est ajouté et de l'hydrogène est mis à buller pendant trois heures dans la suspension agitée à température ambiante. Après filtration du charbon, la disparition de Z-Ser(ibuprofénate)-NH(CH₂)₂Oibuprofénate et l'apparition de H-Ser(ibuprofénate)-NH(CH₂)₂Oibuprofénate sont vérifiées par HPLC. L'éthanol est évaporé et la solution aqueuse résiduelle est lyophilisée. H-Ser(ibuprofénate)-NH(CH₂)₂Oibuprofénate est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,84 min), et par HPLC/MS (pics à 525,3 (H-Ser(ibuprofénate)-NH(CH₂)₂Oibuprofénate + H⁺), 547,3 (H-Ser(ibuprofénate)-

$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{Oibuprofénate} + \text{Na}^+$) et 507,2 (fragmentation : - H_2O)). En MS haute résolution, on observe une masse de 525,3328, contre 525,3329 masse théorique attendue pour la composition $\text{C}_{31} \text{H}_{45} \text{N}_2 \text{O}_5$ correspondant à H-Ser(ibuprofénate)- $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{Oibuprofénate} + \text{H}^+$.

5

Exemple 13 : Synthèse de H-Lys(FITC)-Ala-OMe

La synthèse se fait en 4 étapes :

10 a) 1re étape : synthèse de Boc-Lys(Z)-Ala-OMe à partir de BocLys(Z)OH et H-Ala-OMe en présence de BOP en milieu alcalin

BocLys(Z)OH (Bachem, 761 mg, 2 mmol), H-Ala-OMe HCl (279 mg, 2 mmol) et BOP (885 mg, 2 mmol) sont dissous dans l'acétate d'éthyle (20 ml). Le pH, vérifié au papier pH, est amené dans la gamme 10-12 par addition de DIEA (6 ml) et la réaction se poursuit pendant deux heures à température ambiante. La disparition de BocLys(Z)OH et l'apparition de Boc-Lys(Z)-Ala-OMe sont vérifiées par HPLC. Le mélange réactionnel est lavé trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 (20 ml), puis trois fois avec une solution aqueuse de KHSO_4 (135 g/l, 20 ml), et finalement une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl (20 ml). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et le solvant évaporé. Le produit est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,57 min ou 1,64 min selon les conditions), par HPLC/MS (pics à 466,2 (Boc-Lys(Z)-Ala-OMe + H^+), 488,3 (Boc-Lys(Z)-Ala-OMe + Na^+), 504,2 (Boc-Lys(Z)-Ala-OMe + K^+), 410,3 (fragmentation : - tBu), 366,2 (fragmentation : - Boc)) et en MS haute résolution. Dans ce dernier cas, on observe une masse de 466,2553, contre 466,2548, masse théorique pour la formule brute $\text{C}_{23} \text{H}_{36} \text{N}_3 \text{O}_7$ correspondant à Boc-Lys(Z)-Ala-OMe + H^+ .

25

b) 2e étape : synthèse de Boc-Lys-Ala-OMe à partir de Boc-Lys(Z)-Ala-OMe

Boc-Lys(Z)-Ala-OMe est dissous dans l'éthanol (10 ml) et du méthanol (5 ml). Une solution aqueuse d'acide (HCl 1N, 2,5 ml) est ajoutée pour neutraliser l'amine latérale qui sera déprotégée durant l'étape d'hydrogénolyse. Du palladium sur charbon est ajouté et de l'hydrogène est mis à buller pendant une heure 40 min dans la suspension agitée à température ambiante. Après filtration du charbon, le solvant est

30

éaporé. La disparition de Boc-Lys(Z)-Ala-OMe et la présence de Boc-Lys-Ala-OMe sont vérifiées par HPLC. Boc-Lys-Ala-OMe est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 0,87 min ou 0,92 min selon les conditions), par LC/MS (pics à 332,3 (Boc-Lys-Ala-OMe + H⁺), 276,2 (fragmentation : - tBu), 232,2 (fragmentation : - Boc) ; et dans un autre exemple, pic supplémentaire à 663, 5 (dimère (= (2m + H⁺)/z, z=1) de Boc-Lys-Ala-OMe)), et enfin par MS haute résolution. Dans ce dernier cas, on observe une masse de 332,2185, contre 332,2168, masse théorique pour la formule brute C₁₅ H₃₀ N₃ O₅ correspondant à Boc-Lys-Ala-OMe + H⁺.

10 c) 3e étape : synthèse de Boc-Lys(FITC)-Ala-OH à partir de Boc-Lys-Ala-OMe et de FITC

Boc-Lys-Ala-OMe (49 mg, 148 µmol) et FITC (39 mg, 100 µmol) sont dissous dans de l'eau (10 ml) avec de la DIEA (1 ml). La réaction se poursuit pendant 25 min à température ambiante. Le produit est purifié par HPLC préparative et lyophilisé. Le produit est caractérisé par HPLC (temps de rétention de 1,43 min ou 1,49 min selon les conditions), et par LC/MS, pic à 707,2 (Boc-Lys(FITC)-Ala-OH + H⁺) : alors qu'on cherchait à synthétiser Boc-Lys(FITC)-Ala-OMe (m = 720,25), on a obtenu Boc-Lys(FITC)-Ala-OH, dont l'extrémité C-terminale est libre, l'ester méthylique ayant été hydrolysé.

20 d) 4e étape : synthèse de H-Lys(FITC)-Ala-OH à partir de Boc-Lys(FITC)-Ala-OH

À Boc-Lys(FITC)-Ala-OH, on ajoute 0,2 ml d'HCl 36 % qu'on laisse agir 1 min, puis on ajoute 30 ml d'eau et 0,16 ml de NH₃ 28 %. Le produit est lyophilisé. H-Lys(FITC)-Ala-OH est caractérisé par HPLC (temps de rétention 1,09 min ou de 1,2 min selon les conditions), et par LC/MS (pics à 607,2 (H-Lys(FITC)-Ala-OH + H⁺), 304,2 (dimère (= (2m + H⁺)/z, z=1) de H-Lys(FITC)-Ala-OH), 390,0 (fragmentation : FITC + H⁺) et 348,1 (fragmentation : FITC ayant perdu son atome de soufre et un atome de carbone + H⁺)).

30 Exemple 14 : Encapsulation de peptides prodrogues comprenant de l'ibuprofène

La solubilité du peptide H-Ser(ibuprofénate)-Ser(ibuprofénate)-OMe dans l'eau est de 196 mg/l. Dans une solution aqueuse de poly(acide diméthylmalique) comprenant

40 % d'ester hexylique, sa solubilité est de 884 mg/l. Dans une solution aqueuse de Soluplus® (BASF), sa solubilité est de 2367 mg/l.

La solubilité du peptide H-Lys(ibuprofénate)-Lys(ibuprofénate)-OMe dans l'eau est de 247 mg/l. Dans une solution aqueuse de poly(acide diméthylmalique) comprenant
5 40 % d'ester hexylique, sa solubilité est de 651 mg/l. Dans une solution aqueuse de Soluplus® (BASF), sa solubilité est de 1338 mg/l.

Partie 2 : Test biologiques, le cas de *Mycobacterium tuberculosis*

En dépit de la découverte, depuis près de 70 ans, de nombreuses molécules
10 antituberculeuses, la tuberculose n'a pas été éradiquée et reste un problème de santé publique au niveau mondial. Ceci est dû au fait que la bactérie responsable de cette maladie, *Mycobacterium tuberculosis*, peut survivre dans l'organisme humain sous au moins une forme, dite persistante, phénotypiquement insensible à la plupart des molécules dirigées contre elle. La persistance de la bactérie se traduit par une infection
15 latente, asymptomatique, qui peut durer plusieurs décennies avant de déterminer une infection active lors d'un affaiblissement intercurrent du système immunitaire.

Plusieurs paramètres, qui tendent tous à réduire l'apport d'énergie à la bactérie (hypoxie, carence nutritionnelle, présence de NO inhibant la respiration), peuvent faire apparaître la persistance. Wayne et al. (Annual Review of
20 Microbiology (2001), 55, 139-163) ont montré que la forme persistante ne synthétisait plus ni ADN, ni paroi cellulaire, ce qui explique qu'elle devienne insensible aux antibiotiques actifs sur ces métabolismes.

Mycobacterium tuberculosis possède deux perméases à peptide (gènes Rv1280c-Rv1283c et Rv3663c-Rv3666c, TubercuList). Étant donné le grand nombre de peptides
25 théoriques qu'il est possible de construire à partir des 20 acides aminés naturels (400 dipeptides, 8 000 tripeptides, 160 000 tétrapeptides, etc.), il est impossible que les perméases à peptide bactériennes soient spécifiques de peptides particuliers. Au contraire, leur spécificité doit être très large. Effectivement, les perméases à peptide bactériennes qui ont été étudiées sont spécifiques de la chaîne principale des peptides,
30 mais pas de la chaîne latérale des acides aminés qui les composent. En fixant une molécule à activité antibactérienne sur la chaîne latérale d'un acide aminé inclus dans un peptide, il est possible de contraindre les bactéries à endocyter des molécules qui

pourraient les détruire.

Les perméases à oligopeptides peuvent reconnaître les peptides portant un groupe carboxyle C-terminal estérifié ou comprenant, en position C-terminale, le dérivé décarboxylé d'un acide aminé (Payne et al. Journal of Biological Chemistry (1968), 243(2), 335-40). Les perméases à peptide requièrent la présence d'un groupe amine N-terminal. Au plus, le groupe amine N-terminal peut être monoalkylé sans entraver la reconnaissance du peptide (Payne, Journal of General Microbiology (1974), 80 (Pt 1), 269-76). Enfin, les deux premiers acides aminés composant le peptide doivent obligatoirement posséder la configuration naturelle L (Transport and utilization of peptides by bacteria, Payne, J. W., Edited by Payne, John Weston, Microorganisms and Nitrogen Sources. Transport and Utilization of Amino Acids, Peptides, Proteins, and Related Substrates (1980), 211-56, Wiley).

Les prodrogues proposées dans la présente invention couvrent donc des oligopeptides où le groupe amine N-terminal est libre et où les principes actifs, molécules susceptibles de dissiper les gradients transmembranaires de protons ou d'interagir avec l'ADN bactérien, sont liés aux chaînes latérales des acides aminés composant le peptide. La présente invention couvre également des peptides comprenant des analogues des 20 acides aminés dits « naturels », qui une fois intégrés aux protéines, induisent des modifications structurales et/ou fonctionnelles desdites protéines, rendant ces protéines anormales ou inopérantes. Les tests microbiologiques ont été effectués in vitro sur *Mycobacterium tuberculosis* (souche T280) produite en milieu de culture liquide (Middlebrook 7H9). La bactérie a été centrifugée pour éliminer le milieu de culture, lavée trois fois, par addition d'eau stérile et centrifugation, pour supprimer toute trace de nutriment dans le milieu, et finalement suspendue dans de l'eau stérile. Après 4 à 5 jours, le bacille est sous forme persistante (Betts et al., Mol Microbiol. (2002), 43, 717-31). Pour être sûr d'avoir affaire à la forme persistante de la bactérie, les tests ont eu lieu sur des bactéries ayant séjourné au minimum une semaine dans l'eau stérile.

Exemple 1 : Test sur la forme persistante de *Mycobacterium tuberculosis* (souche T280)

La forme persistante de la bactérie a été mise pendant une semaine en présence de 1, 4, 16 et 64 mg/l d'ibuprofénate de sodium, et de HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe et de HAlaSer(Ibuprofène)OMe représentant des

quantités d'ibuprofène libre correspondant aux concentrations de 1, 4, 16 et 64 mg/l d'ibuprofénate de sodium. Au bout d'une semaine, les bactéries sont lavées pour éliminer les produits ajoutés et resuspendues dans l'eau. 5 µl de cette suspension et de cinq dilutions de 10 en 10 sont déposés sur milieu gélosé (Middlebrook 7H11) en boîte de Pétri (méthode de Miles et Misra : Miles, A. A.; Misra, S. S.; Irwin, J. O., Journal of Hygiene (1938), 38, 732-49.). Après trois semaines à l'étuve à 37°C, la croissance bactérienne a été évaluée.

Aux concentrations étudiées, l'ibuprofénate de sodium et HAlaSer(Ibuprofène)OMe n'ont aucune action inhibitrice sur la croissance bactérienne. De la même manière, HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe n'a pas d'action inhibitrice sur la croissance bactérienne aux concentrations correspondant à 1, 4 et 16 mg/l d'ibuprofénate de sodium. En revanche, avec HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe à une concentration correspondant à 64 mg/l d'ibuprofénate de sodium, un maximum de deux colonies a été observé au niveau du dépôt de la suspension non diluée et aucune colonie quand la suspension a été préalablement diluée. Comme on observe sur le contrôle 15 à 20 colonies pour la dilution la plus forte (1/100 000), il y a 1,5 à 2 millions de bactéries dans la suspension originelle. La décroissance bactérienne due à HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe est donc de 6 log. Ces résultats sont regroupés dans le tableau 1 :

20

Tableau 1 : Etude comparative de sources d'ibuprofène sur une forme persistante de *Mycobacterium tuberculosis* (souche T280) au bout d'une semaine

Concentration équivalente en PA	PA	H-Ser(Ibu)Ser(Ibu)-OMe	H-Ala-Ser(Ibu)-OMe (Contrôle)
1 mg/L	X	X	X
4 mg/L	X	X	X
16 mg/L	X	X	X
64 mg/L	X	Activité antibiotique: décroissance bactérienne de 6 log	X

PA : ibuprofénate de sodium

X : pas d'activité

Ibu : ibuprofène

- 5 L'expérience a été répétée avec HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe représentant des quantités d'ibuprofène libre correspondant aux concentrations de 32, 64, 128 et 256 mg/l d'ibuprofénate de sodium. HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe n'a pas d'action inhibitrice sur la croissance bactérienne à la concentration correspondant à 32 mg/l d'ibuprofénate de sodium. Pour des quantités de
- 10 HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe représentant des quantités d'ibuprofène libre correspondant aux concentrations de 64, 128 et 256 mg/l d'ibuprofénate de sodium, un maximum de deux colonies a été observé au niveau du dépôt de la suspension non diluée et aucune colonie quand la suspension a été préalablement diluée. Ce résultat montre l'effet « tout ou rien » de l'activité antituberculeuse de la prodrogue
- 15 HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe. Ces résultats sont regroupés dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Détermination de la quantité active de H-Ser(Ibuprofène)-Ser(Ibuprofène)-OMe sur une forme persistante de *Mycobacterium tuberculosis* (souche T280) au bout d'une semaine

20

Concentration équivalente en PA	PA	H-Ser(Ibu)Ser(Ibu)-OMe
32 mg/L	X	X
64 mg/L	X	Activité antibiotique
128 mg/L	X	Activité antibiotique
256 mg/L	X	Activité antibiotique

PA : ibuprofénate de sodium

X : pas d'activité

Ibu : ibuprofène

25

Exemple 2: survie des mycobactéries persistantes

Dans une autre répétition de cette expérience, les bactéries (souche de référence T280) ont été mises en présence de HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe représentant des quantités d'ibuprofène libre correspondant aux concentrations de 32, 64 et 128 mg/l d'ibuprofénate de sodium. Après lavage des bactéries afin d'éliminer la prodrogue et le principe actif éventuellement libéré, les bactéries ont étéensemencées au bout de 2 jours et de 7 jours de contact avec la prodrogue afin d'évaluer le délai d'action de cette dernière. Le résultat est exprimé sous forme d'une courbe donnée dans la figure 1. Après 2 jours de contact entre HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe et les bactéries persistantes, on obtient la courbe en pointillés avec des ronds de la figure 1. Après 7 jours de contact entre HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe et les bactéries persistantes, on obtient la courbe pleine avec des carrés. Cette expérience montre la rapidité d'action de la prodrogue HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe.

L'ibuprofénate de sodium ne présente aucune activité antibactérienne jusqu'à 256 mg/l.

Pour garantir que les bactéries persistantes avaient bien été tuées et ne se trouvaient pas sous une forme viable mais non-cultivable, le même dépôt de bactéries persistantes mises préalablement en présence de HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe a été effectué sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose coulée à partir d'un mélange de deux tiers de gélose neuve (Middlebrook 7H11) et d'un tiers de milieu liquide (Middlebrook 7H9) dans lequel la même souche bactérienne avait préalablement poussé et qui avait été stérilisé par ultrafiltration. Le dépôt de bactéries n'ayant pas été mises en contact avec HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe a servi de contrôle. Aucune pousse bactérienne n'a été observée pour les bactéries persistantes préalablement exposées à HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe représentant des quantités d'ibuprofène libre correspondant à une concentration égale ou supérieure à 64, 128 et 256 mg/l d'ibuprofénate de sodium alors que les bactéries témoins poussent normalement.

Il a aussi été vérifié que la mort des bactéries n'était pas consécutive à une hypoxie, elle-même due à l'augmentation de la respiration bactérienne entraînée par l'action découplante du principe actif.

Une expérience préliminaire effectuée avec la souche de référence H37Rv a donné des résultats similaires.

Exemple 3 : Bactéries en croissance de *Mycobacterium tuberculosis* (souche T280)

Sur des bactéries en croissance (dilution de HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe dans la gélose de Middlebrook 7H11), aucune
5 activité antibactérienne n'a été observée pour des quantités de HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe représentant des quantités d'ibuprofène libre correspondant à une concentration égale ou inférieure à 256 mg/l d'ibuprofénate de sodium.

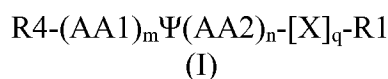
Pour garantir que les bactéries persistantes avaient bien été tuées et ne se
10 trouvaient pas sous une forme viable mais non-cultivable, le même dépôt de bactéries persistantes mises préalablement en présence de HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe a été effectué sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose coulée à partir d'un mélange de deux tiers de gélose neuve (Middlebrook 7H11) et d'un tiers de milieu liquide (Middlebrook 7H9) dans lequel la même souche bactérienne avait préalablement poussé
15 et qui avait été stérilisé par ultrafiltration. Le dépôt de bactéries n'ayant pas été mises en contact avec HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe a servi de contrôle. Aucune pousse bactérienne n'a été observée pour les bactéries persistantes préalablement exposées à HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe représentant des quantités d'ibuprofène libre correspondant à une concentration égale ou supérieure à 64, 128 et 256 mg/l
20 d'ibuprofénate de sodium alors que les bactéries témoins poussent normalement.

Partie 3 : Tests Biologiques, le cas de cellules cancéreuses

Une expérience faite sur mélanome B16 a également montré que des concentrations d'ibuprofénate de sodium de 1 et 10 μ M et de H-Ser(Ibuprofène)-
25 Ser(Ibuprofène)OMe correspondant à 1 μ M d'ibuprofénate de sodium n'ont aucune action inhibitrice sur la croissance cellulaire. En revanche, avec H-Ser(Ibuprofène)-Ser(Ibuprofène)OMe à une concentration correspondant à 10 μ M d'ibuprofénate de sodium, la disparition des cellules est quasi-totale. Ce résultat montre que HSer(Ibuprofène)Ser(Ibuprofène)OMe semble avoir une action inhibitrice sur la
30 croissance cancéreuse alors qu'avec l'ibuprofénate de sodium, aucune activité n'a été constatée à 10 μ M.

REVENDECATIONS

1. Composé de formule (I) :



5

caractérisée en ce que

R4 est choisi parmi l'atome d'hydrogène, les groupements C₁-C₆ alkyle, aryle, aryl-(C₁-C₆ alkyle), un résidu d'acide aminé ou un résidu peptidique comprenant de 2 à 10 résidus d'acides aminés;

10

Ψ est une liaison peptidique ou pseudo-peptidique ;

R1 est choisi parmi l'atome d'hydrogène, ou les groupements C₁-C₆ alkyle, C₁-C₆ alkyle substitué par un OH ; aryle ou aryl-(C₁-C₆ alkyle) ;

m est un nombre entier naturel compris de 0 à 12, préférentiellement compris de 1 à 12;

15

n est un nombre entier naturel compris de 0 à 12 ;

avec m+n est un nombre entier naturel compris de 2 à 12 ;

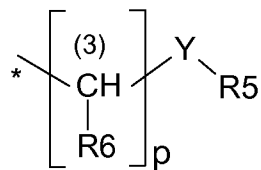
q est choisi entre 0 ou 1 ;

lorsque q=1, X est choisi entre les atomes d'oxygène, de soufre ou le groupement NH ;

20

AA1 représente une glycine ou pseudo-glycine déshydratée, substituée par un groupement R3, avantageusement sur le carbone alpha de AA1 ;

R3 est un fragment de formule (II) relié au reste de la molécule de formule (I) par la liaison marquée d'un * :



25

(II)

dans lequel Y est choisi entre les atomes d'oxygène, de soufre, le groupement CO, ou le groupement NH ;

R5 est un principe actif, qui peut dissiper les gradients transmembranaires de protons, et/ou interagir avec les acides nucléiques, et/ou inhiber la synthèse protéique, et/ou induire la synthèse de protéines anormales ou non fonctionnelles, relié à Y par une liaison ester, thioester ou amide ;

5 R6 est choisi parmi l'atome d'hydrogène, ou les groupements C₁-C₆ alkyle, aryle ou aryl-(C₁-C₆ alkyle) ;

p est un nombre entier naturel compris de 1 à 10 ;

lorsque m>1, les différents R3 sont choisis indépendamment les uns des autres

10 lorsque n>0, AA2 représente une glycine ou pseudo-glycine déshydratée, substituée par un groupement R2, avantageusement sur le carbone alpha de AA2,

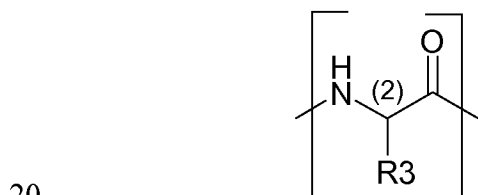
R2 est la chaîne latérale d'un acide aminé;

lorsque n>1, les différents R2 sont choisis indépendamment les uns des autres ;

15 lorsque les carbones substitués par les groupements R2 ou R3 et/ou le carbone (3) sont asymétriques, ces carbones sont indépendamment les uns des autres de configuration (R) ou (S).

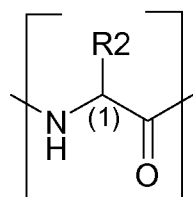
2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que:

AA1 a pour structure :



dans laquelle R3 est tel que défini selon la revendication 1 ;

AA2 a pour structure :



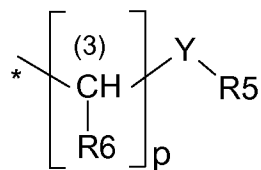
dans laquelle R2 est tel que défini selon la revendication 1 ;

25 Ψ représente une liaison peptidique ;

lorsque les carbones (1), (2) et (3) sont asymétriques, ces derniers sont indépendamment de configuration (R) ou (S).

3. Composé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que R5 est un acyle choisi parmi les groupements isobutyryle, ($\pm$)-2-méthylbutyryle, (S)-(+)-2-méthylbutyryle, (R)-(-)-2-méthylbutyryle, 2-éthylbutyryle, 2-méthylpentanoyle, 2-méthylhexanoyle, valproyle, 2-éthylhexanoyle, 2-méthylheptanoyle, 3,5,5-triméthylhexanoyle, (S)-3-méthylnonanoyle, 4-méthyl-1-cyclohexanecarbone *cis* et/ou *trans*, 3-méthyl-1-cyclohexanecarbone *cis* et/ou *trans*, cyclohexaneacétyle, 4-méthylcyclohexaneacétyle *cis* et/ou *trans*, 4-*tert*-butylcyclohexanecarbone *cis* et/ou *trans*, 4-pentylcyclohexanecarbone *cis* et/ou *trans*, α -méthylhydrocinnamoyle, ($\pm$)-2-(4-isobutylphényl)propanoyle, (+)-2-(4-isobutylphényl)propanoyle, (-)-2-(4-isobutylphényl)propanoyle, ($\pm$)-[2-[4-[(4-chlorophényl)phénylméthyl]-1-pipérazinyl]éthoxy]acétyle, (+)-[2-[4-[(4-chlorophényl)phénylméthyl]-1-pipérazinyl]éthoxy]acétyle, (-)-[2-[4-[(4-chlorophényl)phénylméthyl]-1-pipérazinyl]éthoxy]acétyle, ($\pm$)-3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-aminopropanoyle, (+)-3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-aminopropanoyle, (-)-3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-aminopropanoyle, 2-[1-(aminométhyl)cyclohexyl]acétyle et pyrazine-2-carbone.
4. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que R5 est choisi parmi les groupements 3,5,5-triméthylhexanoyle, ($\pm$)-2-(4-isobutylphényl)propanoyle, valproyle ou pyrazine-2-carbone.
5. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que :
 - m est un nombre entier naturel compris entre 2 à 5, préférentiellement 2 ;
 - n est 0 ;
 - q est 1 ;
 - X est un atome d'oxygène ou de soufre, préférentiellement l'oxygène ;
 - R1 est C₁-C₆ alkyle, préférentiellement méthyle ou éthyle ;

R3 sont des fragments de formule (II) reliés à la molécule de formule (I) par la liaison marquée d'un * :



(II)

5 dans lequel R5 est choisi parmi les groupements 3,5,5-triméthylhexanoyle, (±)-2-(4-isobutylphényl)propanoyle, valproyle ou pyrazine-2-carbonyle,

p est un nombre entier naturel compris de 1 à 4, préférentiellement 1 ;

10 Y est choisi entre l'atome d'oxygène ou de soufre, préférentiellement l'oxygène ;

les différents R3 étant choisis indépendamment les uns des autres ;

R4 est l'atome d'hydrogène ; et

le cas échéant, le/les carbones (2) sont de configuration (S) et le/les carbones (3) sont de configuration (R).

15

6. Composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit composé de formule (I) est encapsulé dans une structure polymère dénommée capsule.

20

7. Composé encapsulé selon la revendication 6 caractérisé en ce que la capsule est une structure polymère choisie parmi des polymères biodégradables.

8. Composé encapsulé selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7 caractérisé en ce que la capsule est une structure polymère de type polyélectrolytes.

25

9. Composé encapsulé selon la revendication 8 caractérisé en ce que la capsule est une structure polymère choisie parmi les polyanions amphiphiles, tels que :

– l'héparine, et ses dérivés, en particulier hydrophobes,

- les polymères d'acides di- ou tri-carboxyliques, tels que l'acide malique, l'acide diméthylmalique, l'acide citrique, ou de leurs dérivés,
 - les copolymères d'acides di- et/ou tri-carboxyliques, tels que l'acide malique, l'acide diméthylmalique, l'acide citrique, et/ou d'acides aminés, tels que la L-lysine, la L-sérine, et/ou de leurs dérivés,
 - les copolymères d'acides di- et/ou tri-carboxyliques, tels que l'acide malique, l'acide diméthylmalique, l'acide citrique, et/ou d'acides aminés, tels que la L-lysine, la L-sérine, et/ou de leurs dérivés, avec des hydroxyacides, tels que les acides glycolique, lactique, 5-hydroxyvalérique, et/ou 6-hydroxycaproïque,
 - et de leurs mélanges.
10. Composé encapsulé selon l'une quelconque des revendications 6 à 9 caractérisé en ce que la capsule est une structure polymère greffée d'un résidu orienteur.
11. Composé encapsulé selon la revendication 10 caractérisé en ce que le résidu orienteur comprend un saccharide.
12. Composé encapsulé selon la revendication 11 caractérisé en ce que le saccharide est le mannose.
13. Procédé pour obtenir le composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le composé de formule (I) est synthétisé en utilisant des techniques de synthèse peptidique.
14. Procédé pour obtenir le composé selon l'une quelconque des revendications 6 à 12, caractérisé en ce que le composé de formule (I) est mis en présence d'un polymère.
15. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour son utilisation comme médicament.

16. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour son utilisation comme anti-infectieux.
17. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour son utilisation dans le traitement de la tuberculose.
18. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour son utilisation dans le traitement du cancer.
19. Composition injectable comprenant un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.
20. Utilisation in vitro d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 avec des agents pathogènes, des cellules infectées ou des cellules cancéreuses.

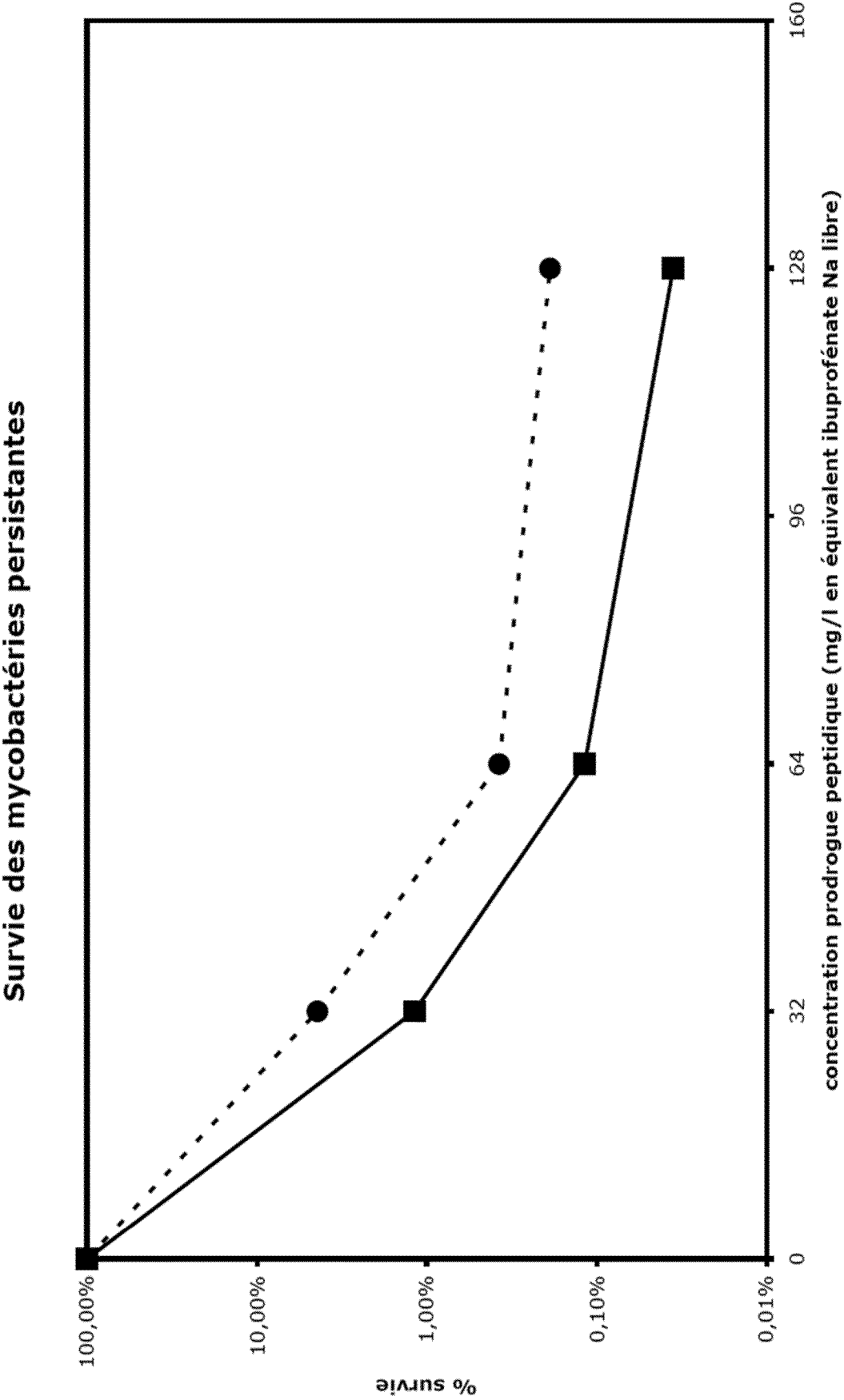


FIGURE 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/062035

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48 C07K5/06 A61K9/50 C07K5/10
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 C07K

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, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AKIHIRO KIKUCHI ET AL: "Peptide derivation of poorly absorbable drug allows intestinal absorption via peptide transporter", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 98, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 1775-1787, XP055016489, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.21551 figure 1 ----- -/--	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

30 August 2012

Date of mailing of the international search report

06/09/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schleifenbaum, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/062035

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LARRYN W. PETERSON ET AL: "Serine Side Chain-Linked Peptidomimetic Conjugates of Cyclic HPMP and HPMPA: Synthesis and Interaction with hPEPT1 +", MOLECULAR PHARMACEUTICS, vol. 7, no. 6, 6 December 2010 (2010-12-06), pages 2349-2361, XP055016469, ISSN: 1543-8384, DOI: 10.1021/mp100186b compounds 2,4 -----	1-20
X	KOHCHI ET AL: "Design and synthesis of novel prodrugs of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine activated by membrane dipeptidase overexpressed in tumor tissues", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 17, no. 8, 30 March 2007 (2007-03-30), pages 2241-2245, XP022009241, ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/J.BMCL.2007.01.066 compound 23 -----	1-20
X	WO 03/101476 A1 (NEW RIVER PHARMACEUTICALS INC [US]; PICCARIELLO THOMAS [US]; KIRK RAND) 11 December 2003 (2003-12-11) chapitre III; paragraph [0209] -----	1-20
X	WO 2005/021024 A1 (XENOPORT INC [US]; GALLOP MARK A [US]; XU FENG [US]; CUNDY KENNETH C []) 10 March 2005 (2005-03-10) claims 15,18,21 -----	1-20
X	M. P. GRILLO ET AL: "Stereoselective Flunoxaprofen-S-acyl-glutathione Thioester Formation Mediated by Acyl-CoA Formation in Rat Hepatocytes", DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, vol. 38, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 133-142, XP055016479, ISSN: 0090-9556, DOI: 10.1124/dmd.109.029371 composés FLX-SG, Ibuprofen-SG ----- -/--	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/062035

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DAVID FOLEY ET AL: "The in vitro transport of model thiodipeptide prodrugs designed to target the intestinal oligopeptide transporter, PepT1", ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY, vol. 7, no. 18, 1 January 2009 (2009-01-01), page 3652, XP055016465, ISSN: 1477-0520, DOI: 10.1039/b909221h cited in the application compounds 48-53 -----	1-20
X	US 4 427 582 A (GILVARG CHARLES [US] ET AL) 24 January 1984 (1984-01-24) claim 15 -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2012/062035

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **1-20 (in part)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box II.2**Claims 1-20 (in part)**

1 The current claims 1-20 cover an extremely large number of compounds and products, such as all the peptides and pseudo-peptides comprising 2 to 22 amino acids. However, only a very small number of these claimed compounds and products are supported and disclosed (PCT Articles 5 and 6) (see the examples). The claims fail to comply with the substantive requirements to such an extent that the search in respect of claims 1-20 had to be limited (PCT Guidelines, Chapter 9.19 and 9.23). The search was limited to the compounds in the examples and to the general principle of the application.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on subject matter that has not been searched. This applies whether or not the claims were amended after receipt of the search report or during any Chapter II procedure. The applicant is reminded that if the application proceeds to the regional phase before the EPO, an additional search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines, C-VI, 8.2), provided that the problems which led to the declaration under PCT Article 17(2) have been resolved.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/062035

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03101476	A1	11-12-2003	AU 2003240949 A1 19-12-2003
		US 2004063628 A1 01-04-2004	
		WO 03101476 A1 11-12-2003	

WO 2005021024	A1	10-03-2005	AU 2004268492 A1 10-03-2005
		CA 2510677 A1 10-03-2005	
		CN 1744908 A 08-03-2006	
		CN 101255123 A 03-09-2008	
		EP 1587527 A1 26-10-2005	
		JP 2007521250 A 02-08-2007	
		KR 20060055438 A 23-05-2006	
		MX PA05007792 A 31-01-2006	
		NZ 540699 A 29-06-2007	
		US 2005004381 A1 06-01-2005	
		WO 2005021024 A1 10-03-2005	
		ZA 200504940 A 27-09-2006	

US 4427582	A	24-01-1984	AU 562703 B2 18-06-1987
			AU 1446283 A 15-12-1983
			DE 3377578 D1 08-09-1988
			DK 261283 A 09-12-1983
			EP 0128249 A2 19-12-1984
			ES 8504692 A1 16-07-1985
			GR 77483 A1 24-09-1984
			IE 55428 B1 12-09-1990
			JP 59005150 A 12-01-1984
			PT 76786 A 01-06-1983
			US 4427582 A 24-01-1984
			ZA 8303350 A 25-04-1984

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2012/062035

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K47/48 C07K5/06 A61K9/50 C07K5/10 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 C07K		
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, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	AKIHIRO KIKUCHI ET AL: "Peptide derivation of poorly absorbable drug allows intestinal absorption via peptide transporter", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 98, no. 5, 1 mai 2009 (2009-05-01), pages 1775-1787, XP055016489, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.21551 figure 1 ----- -/--	1-20
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ 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 30 août 2012		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 06/09/2012
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Schleifenbaum, A

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LARRYN W. PETERSON ET AL: "Serine Side Chain-Linked Peptidomimetic Conjugates of Cyclic HPMPc and HPMPA: Synthesis and Interaction with hPEPT1 +", MOLECULAR PHARMACEUTICS, vol. 7, no. 6, 6 décembre 2010 (2010-12-06), pages 2349-2361, XP055016469, ISSN: 1543-8384, DOI: 10.1021/mp100186b composés 2,4 -----	1-20
X	KOHCHI ET AL: "Design and synthesis of novel prodrugs of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine activated by membrane dipeptidase overexpressed in tumor tissues", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 17, no. 8, 30 mars 2007 (2007-03-30), pages 2241-2245, XP022009241, ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/J.BMCL.2007.01.066 composé 23 -----	1-20
X	WO 03/101476 A1 (NEW RIVER PHARMACEUTICALS INC [US]; PICCARIELLO THOMAS [US]; KIRK RAND) 11 décembre 2003 (2003-12-11) chapitre III; alinéa [0209] -----	1-20
X	WO 2005/021024 A1 (XENOPORT INC [US]; GALLOP MARK A [US]; XU FENG [US]; CUNDY KENNETH C []) 10 mars 2005 (2005-03-10) revendications 15,18,21 -----	1-20
X	M. P. GRILLO ET AL: "Stereoselective Flunoxaprofen-S-acyl-glutathione Thioester Formation Mediated by Acyl-CoA Formation in Rat Hepatocytes", DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, vol. 38, no. 1, 1 janvier 2010 (2010-01-01), pages 133-142, XP055016479, ISSN: 0090-9556, DOI: 10.1124/dmd.109.029371 composés FLX-SG, Ibuprofen-SG ----- -/--	1-20

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DAVID FOLEY ET AL: "The in vitro transport of model thiodipeptide prodrugs designed to target the intestinal oligopeptide transporter, PepT1", ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY, vol. 7, no. 18, 1 janvier 2009 (2009-01-01), page 3652, XP055016465, ISSN: 1477-0520, DOI: 10.1039/b909221h cité dans la demande composés 48-53	1-20
X	----- US 4 427 582 A (GILVARG CHARLES [US] ET AL) 24 janvier 1984 (1984-01-24) revendication 15 -----	1-20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2012/062035

Cadre n°. II Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Le rapport de recherche internationale n'a pas été établi en ce qui concerne certaines revendications conformément à l'article 17.2)a) pour les raisons suivantes :

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration chargée de la recherche internationale n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir :
2. ☒ Les revendications n^{os} 1-20(en partie)
parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier :
voir FEUILLE ANNEXÉE PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n^{os} parce qu'elles sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre n°. III Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles exigées ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les revendications qui se prêtent à la recherche ont pu faire l'objet de cette recherche sans effort particulier justifiant des taxes additionnelles, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucunes taxes de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}.
4. ☐ Aucune taxes additionnelles demandées n'ont été payées dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}.

Remarque quant à la réserve ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant et, le cas échéant, du paiement de la taxe de réserve.

☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant mais la taxe de réserve n'a pas été payée dans le délai prescrit dans l'invitation.

☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre II.2

Revendications nos.: 1-20(en partie)

1 Les présentes revendications 1-20 couvrent un nombre extrêmement important de composés et produits, par exemple tous les peptide et pseudo-peptides comprenant de 2 à 22 acides aminés. Un fondement et un exposé au sens des art. 6 et 5 PCT ne peuvent cependant être trouvés que pour un nombre très restreint de ces composés et produits revendiqués (voir les exemples). La non-conformité avec les exigences quant au fond est telle, qu'il a été nécessaire de limiter la recherche portant sur les revendication 1-20 (Directives du PCT, chapitre 9.19 et 9.23). La recherche a été limitée aux composés des exemples et au principe générale de la demande.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II. Si la demande devait être poursuivie dans la phase régionale devant l'OEB, il est rappelé au déposant qu'une recherche pourrait être effectuée durant la procédure d'examen devant l'OEB (voir Directive OEB C-VI, 8.2) à condition que les problèmes ayant conduit à la déclaration conformément à l'Article 17(2) PCT aient été résolus.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2012/062035

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 03101476	A1	11-12-2003	AU 2003240949 A1	19-12-2003
			US 2004063628 A1	01-04-2004
			WO 03101476 A1	11-12-2003

WO 2005021024	A1	10-03-2005	AU 2004268492 A1	10-03-2005
			CA 2510677 A1	10-03-2005
			CN 1744908 A	08-03-2006
			CN 101255123 A	03-09-2008
			EP 1587527 A1	26-10-2005
			JP 2007521250 A	02-08-2007
			KR 20060055438 A	23-05-2006
			MX PA05007792 A	31-01-2006
			NZ 540699 A	29-06-2007
			US 2005004381 A1	06-01-2005
			WO 2005021024 A1	10-03-2005
			ZA 200504940 A	27-09-2006

US 4427582	A	24-01-1984	AU 562703 B2	18-06-1987
			AU 1446283 A	15-12-1983
			DE 3377578 D1	08-09-1988
			DK 261283 A	09-12-1983
			EP 0128249 A2	19-12-1984
			ES 8504692 A1	16-07-1985
			GR 77483 A1	24-09-1984
			IE 55428 B1	12-09-1990
			JP 59005150 A	12-01-1984
			PT 76786 A	01-06-1983
			US 4427582 A	24-01-1984
			ZA 8303350 A	25-04-1984
