

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 878 846

21 N° d'enregistrement national : 04 13028

51 Int Cl⁸ : C 07 C 43/115 (2006.01), C 07 C 31/27, A 61 K 31/09,
31/047, 9/127

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 07.12.04.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 09.06.06 Bulletin 06/23.

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

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71 Demandeur(s) : ECOLE NATIONALE SUPERIEURE
DE CHIMIE DE RENNES Etablissement public — FR.

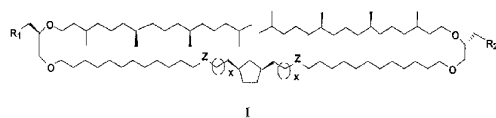
72 Inventeur(s) : BENVEGNI THIERRY, PLUSQUEL-
LEC DANIEL, RETHORE GILDAS, SACHET
MICKAELLE, FEREC CLAUDE, MONTIER TRISTAN,
DELEPINE PASCAL et LEHN PIERRE.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) : CABINET PATRICE VIDON.

54 COMPOSES ANALOGUES DE LIPIDES MEMBRANAIRES D'ARCHAEBACTERIES ET COMPOSITIONS
LIPOSOMIALES INTEGRANT DE TEL COMPOSES.

57 L'invention concerne un composé de formule généra- présentant un agent de ciblage.
le (I):



dans laquelle x est égal à zéro ou un, Z représente un
O, un S ou un CH₂, R₁ et R₂ qui peuvent être identiques ou
différents, représentent l'un ou l'autre des substituants
suivants: OH; OY avec Y qui représente un groupement
protecteur; OR₃, R₃ représentant un substituant monosac-
charide ou disaccharide; A₁-CH₂-N⁺(CH₃)₃, X, X représen-
tant un halogène, A₁ représente une liaison amide
(NHC(O)) ou ester (OC(O)); OPO(OM)₂, M représentant un
cation de métal alcalin ou alcalino-terreux; OP(O)O⁻-
O(CH₂)₂-N⁺(CH₃)₃, A₂-(PEG_{X1}-A₃)_n-R₄, n étant égal à 0 ou
1, PEG_{X1} étant un polyéthylèneglycol de poids moléculaire
X₁, X₁ étant inférieur ou égal à 5000 daltons, A₂ et A₃ pou-
vant être identiques ou différents et représentant une liaison
éther (O), ester (OC(O)), amide (NHC(O)), urée
(NHC(O)NH), thiourée (NHC(S)NH), ou thioéther (S), R₄ re-

FR 2 878 846 - A1



Composés analogues de lipides membranaires d'archaeobactéries et compositions liposomiales intégrant de tels composés.

La présente invention concerne le domaine pharmaceutique.

Plus précisément l'invention concerne de nouveaux composés synthétiques
5 analogues de lipides membranaires d'archaeobactéries.

L'invention concerne également de nouvelles compositions liposomiales mettant en œuvre de tels composés ainsi que l'utilisation de telles compositions pour la vectorisation de molécules d'intérêts thérapeutiques et/ou la vectorisation de molécules d'ARN ou d'ADN.

10 Le développement de systèmes performants pour administrer et transporter une molécule biologiquement active jusqu'à sa cible biologique constitue un enjeu majeur. En effet, aucun médicament ne peut exercer une activité thérapeutique si la substance active qu'il renferme n'est pas capable de franchir les barrières biologiques qui séparent le site d'administration du site d'action.

15 Les liposomes se sont désormais positionnés comme des candidats prometteurs dans ce domaine et leur introduction récente dans l'arsenal thérapeutique en cancérologie et en infectiologie représente l'aboutissement d'efforts considérables déployés en recherche et en développement.

Néanmoins, de nombreux problèmes demeurent notamment si l'on
20 considère des modes d'administration par voie orale ou par voie sanguine. Ces problèmes sont liés à l'instabilité du liposome *in vivo* dans des milieux acides tels que par exemple celui observé dans le compartiment stomacal où règne un pH égal à 2, et/ou à la déstabilisation de la paroi liposomiale par interaction avec des protéines et lipoprotéines du sang.

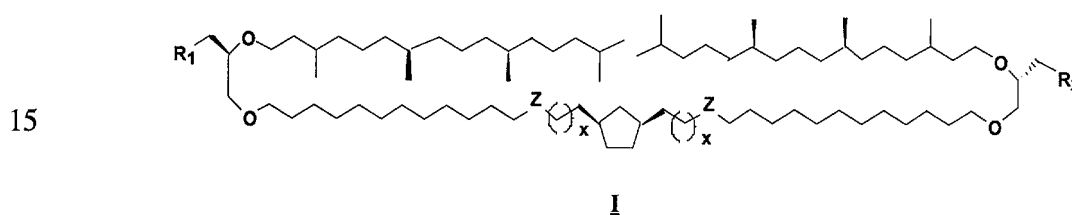
25 Une approche possible pour améliorer les propriétés de ces formulations consiste à utiliser des lipides bipolaires d'archaeobactéries thermophiles et méthanogènes apportant une stabilité accrue comparativement aux liposomes conventionnels. Pour cette raison, ceux-ci offrent un potentiel d'applications intéressant en tant que vecteurs de principes actifs et de gènes thérapeutiques ou
30 comme systèmes d'administration de vaccins.

Cependant, les techniques de culture, d'extraction et de purification utilisées actuellement ne permettent pas d'obtenir des quantités importantes de lipides naturels. La préparation de liposomes à partir de lipides synthétiques de structure parfaitement définie, s'avère donc être une alternative intéressante.

5 Un objet de la présente invention est de proposer des analogues de lipides membranaires d'archaebactéries dont la longueur de l'espaceur lipophile est comparable à celle des molécules naturelles.

Un autre objet de la présente invention est de décrire de nouvelles compositions liposomiales intégrant de tels analogues.

10 Ces objectifs sont atteints grâce à l'invention, qui concerne des composés de formule générale (I) :



dans laquelle : . x est égal à zéro ou un ;

20 . Z représente un O, un S ou un CH₂ ;

. R₁ et R₂ qui peuvent être identiques ou différents, représentent l'un ou l'autre des substituants suivants :

. OH

25 . OY avec Y qui représente un groupement protecteur, préférentiellement un groupement allyle ou benzyle ou tétrahydropyranyle, ou trialkylsilyle ;

. OR₃, R₃ représentant un substituant monosaccharidique ou disaccharidique ;

. A₁-CH₂-N⁺(CH₃)₃, X⁻, X représentant un halogène,

30 A₁ représente une liaison amide (NHC(O)) ou ester (OC(O)) ;

. OPO(OM)_2 , M représentant un cation de métal alcalin ou alcalino-terreux ;

. $\text{OP(O)O}^-\text{-O(CH}_2)_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$,

5 . $\text{A}_2\text{-(PEG}_{X_1}\text{-A}_3)_n\text{-R}_4$, n étant égal à 0 ou 1, PEG_{X_1} étant un polyéthylèneglycol de poids moléculaire X_1 , X_1 étant inférieur ou égal à 5000 daltons, A_2 et A_3 pouvant être identiques ou différents et représentant une liaison éther (O), ester (OC(O)), amide (NHC(O)), urée (NHC(O)NH), thiourée (NHC(S)NH), ou thioéther (S), R_4 représentant un agent de ciblage.

10

Les composés hémimacrocycliques de formule générale (I) selon la présente invention sont caractérisés par :

- un squelette lipophile hémi-macrocyclique comprenant un espaceur incluant un motif cyclopentane 1,3-disubstitué au milieu de la chaîne lipophile et deux chaînes ramifiées dérivées du phytanol dont la longueur cumulée correspond à celle de l'espaceur et
- deux têtes polaires identiques ou différentes, neutres, anioniques, cationiques ou zwitterioniques.

15

Les composés selon la présente invention se caractérisent notamment par la présence inédite d'un motif cyclopentane dans leur formule.

20

Préférentiellement, lorsque les composés selon la présente invention intègrent un agent de ciblage, celui-ci est avantageusement choisi dans le groupe constitué par l'acide folique, les structures multiantennées comportant plusieurs motifs R_3 , les anticorps, les peptides ; ces ligands étant reconnus spécifiquement par les récepteurs membranaires correspondants : récepteurs au folate pour l'acide folique, les intégrines pour les peptides RGD, les lectines pour les glycoconjugués.

25

Egalement préférentiellement, lorsque les composés selon la présente invention intègrent un substituant R_3 , celui-ci est avantageusement choisi dans le

groupe constitué par les substituants D-galactosyle, D-glucosyle, D-mannosyle, lactosyle, maltosyle.

Egalement préférentiellement, les composés selon la présente invention répondent à la formule générale (I) dans laquelle :

- 5 . x est égal à zéro ou un ;
 . Z représente un O ou un CH_2 ;
 . R_1 et R_2 sont identiques ou différents et représentent l'un ou l'autre des substituants suivants :

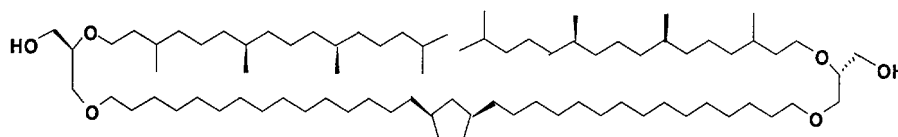
- . OH
 10 . OR_3 , R_3 représentant un substituant lactosyle ;
 . $\text{OP}(\text{O})\text{O}^- - \text{O}(\text{CH}_2)_2 - \text{N}^+(\text{CH}_3)_3$;
 . $\text{OPO}(\text{OM})_2$, M représentant un cation de métal alcalin ou alcalino-terreux ;
 . $\text{A}_1 - \text{CH}_2 - \text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, X^- , X représentant un halogène,
 15 A_1 représente une liaison amide ($\text{NHC}(\text{O})$) ou ester ($\text{OC}(\text{O})$).

Selon une variante intéressante de l'invention, les composés selon celle-ci présentent des substituants R_1 et R_2 identiques et égaux à OR_3 , R_3 étant un β -lactosyle.

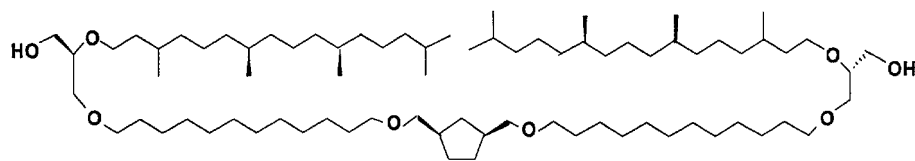
- Selon une autre variante intéressante de l'invention, les composés selon
 20 celle-ci présentent des substituants R_1 et R_2 identiques et égaux à $\text{OP}(\text{O})\text{O}^- - \text{O}(\text{CH}_2)_2 - \text{N}^+(\text{CH}_3)_3$.

Selon encore une autre variante intéressante de l'invention, les composés selon celle-ci présentent des substituants R_1 et R_2 identiques et égaux à $\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2 - \text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, X^- , X représentant un halogène.

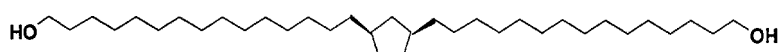
- 25 La présente invention couvre notamment les diols de formules (1) et (2)



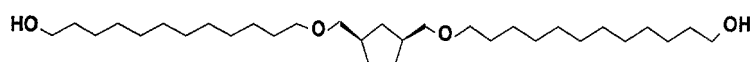
1

2

5 La présente invention couvre aussi les espaceurs de formules (3) et (4) utilisables pour la synthèse des composés décrits ci-dessus.

3

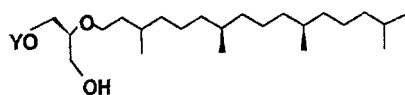
10

4

15

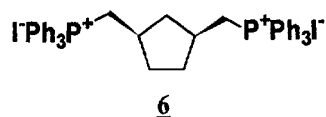
Cette synthèse pourra être effectuée par différentes voies connues de l'homme de l'art.

20 En ce qui concerne les composés dans lesquels Z est égal à CH₂ ou à O cette synthèse peut comprendre une première étape consistant à coupler les espaceurs de formules (3) et (4) et le synthon chiral de formule (5)

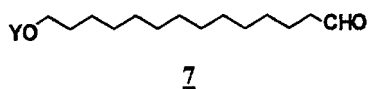
5

25 dans laquelle Y représente un groupe protecteur de type benzyle, allyle, tétrahydropyranyle ou trialkylsilyle.

L'espaceur de formule (3) peut être préparé selon un procédé qui consiste à créer deux doubles liaisons C=C simultanées par une double réaction de Wittig en un seul pot impliquant le diiodure de phosphonium de formule (6)



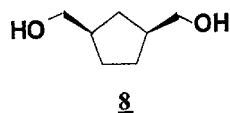
5 et l'aldéhyde de formule (7)



dans laquelle Y représente un groupe protecteur de type benzyle, allyle, 10 tétrahydropyranyle ou trialkylsilyle.

Le diiodure de phosphonium de formule (6) est préparé en deux étapes à partir du *cis*-1,3-bis(hydroxyméthyl)cyclopentane de formule (8)

15

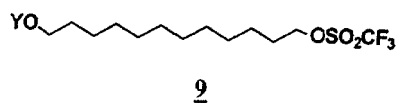


via une réaction de iodation suivie d'une substitution nucléophile par la triphénylphosphine.

Après l'étape de double réaction de Wittig, la déprotection des 20 groupements hydroxyles et la réduction des doubles liaisons formées permettent de conduire à l'espaceur de formule (3).

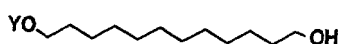
L'espaceur de formule (4) peut être préparé selon un procédé qui consiste à réaliser une double alkylation entre le triflate (ou le mésylate, le paratoluène sulfonate ou les halogénures correspondants) de formule (9) et le diol (8)

25



dans laquelle : Y représente un groupe protecteur de type benzyle, allyle, tétrahydropyranyle ou trialkylsilyle.

Le triflate de formule (9) est préparé par action de l'anhydride triflique en présence de 2,6-lutidine à partir de l'alcool de formule (10) dans laquelle Y
5 représente un groupe protecteur de type benzyle, allyle, tétrahydropyranyle ou trialkylsilyle.

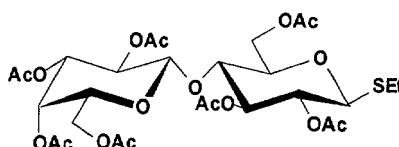
10

10 La réaction de di-*O*-alkylation entre le triflate (9) et le diol (8) s'effectue dans le dichlorométhane à reflux en présence de 1,8-bis-(diméthylamino)-naphthalène. Après la di-*O*-alkylation, l'élimination des groupements protecteurs Y permet d'obtenir l'espaceur de formule (3).

Après réaction des espaceurs (3) et (4) avec le synthon de formule (5), les
15 groupements protecteurs Y sont éliminés pour conduire aux diols (1) et (2).

La dernière étape consiste ensuite, le cas échéant, à greffer un ou deux groupements hydrophiles de façon simultanée ou séquentielle selon le caractère recherché symétrique ($R_1=R_2$) ou dissymétrique (R_1 différent de R_2) des composés de formule générale (I).

20 L'accès aux composés symétriques β -bislactosylé dans lesquels R_1 et R_2 sont identiques et égaux à OR_3 , R_3 étant un β -lactosyle repose sur une réaction de bisglycosylation des diols de formules (2) et (3) à partir du thiolactosyle peracétylé de formule (11) :

11

25 dans des conditions standard d'activation (*N*-iodosuccinimide (NIS), triflate de triéthylsilyle (Et_3SiOTf), dichlorométhane), suivie par une désacétylation des hydroxyles du disaccharide selon la procédure de Zemplén (CH_3ONa , CH_3OH).

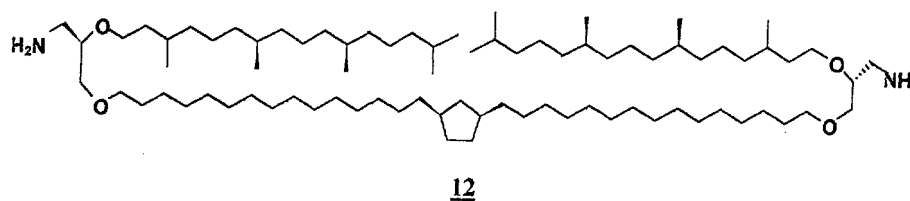
30

L'accès aux composés dans lesquels R1 et R2 sont identiques et égaux à OR₃, R₃ étant un substituant mannosyle ou galactosyle sont préparés selon des conditions similaires.

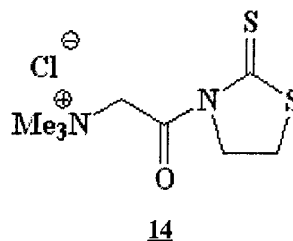
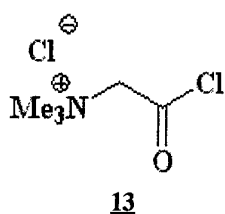
Les composés symétriques dans lesquels R1 et R2 sont des phosphatidylcholines (R₁=R₂= OP(O)O⁻-(CH₂)₂-N⁺(CH₃)₃) sont obtenus en deux
 5 étapes par réaction entre le bromoéthylidichlorophosphate Cl₂P(O)O-(CH₂)₂-Br et les diols de formules (2) et (3) en présence de triéthylamine, suivie de la réaction de la triméthylamine avec les dérivés bromophosphates ainsi obtenus (R₁=R₂= OP(O)O⁻-(CH₂)₂-Br).

10 Les composés de formule générale (I) symétriques dans lesquels R1 et R2 sont des bétaines (R₁=R₂= NHC(O)CH₂-N⁺(CH₃)₃, X⁻, X représentant un halogène), reliés au segment lipophile *via* préférentiellement des liaisons de type amide, sont obtenus par couplage entre la diamine (12) et la glycine bétaine sous
 15 forme activée (chlorure d'acyle (13) ou thiazolidine-2-thione (14)) en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane.

H²NOOONH²O₁₂

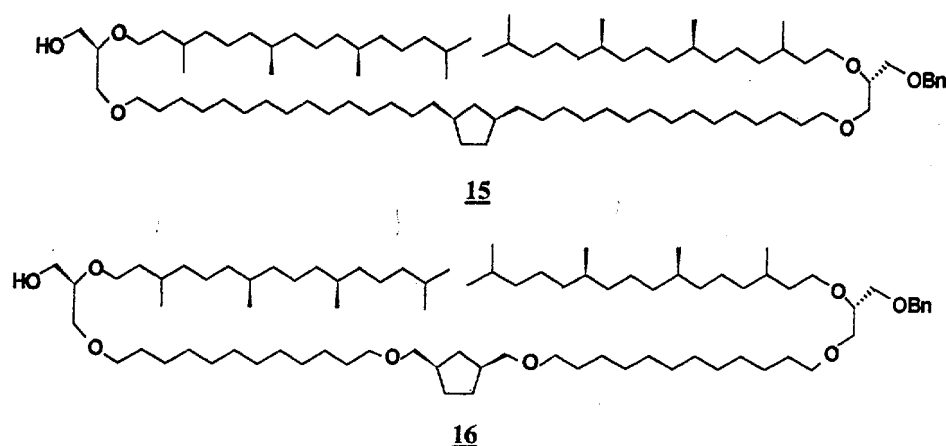


20



25

Les composés de formule générale (I) dissymétriques comportant deux têtes polaires R1 et R2 différentes sont préparés selon un procédé qui consiste à dissymétriser les diols de formules (1) et (2) par l'introduction d'un groupement benzylique (ou un autre groupement protecteur analogue) pour conduire aux alcools de formules (15) et (16) :



Cette mono-protection des diols de formules (1) et (2) est réalisée préférentiellement par action du bromure de benzyle (BnBr) en présence d'oxyde d'argent (Ag_2O) dans le dichlorométhane. A ce stade, une première tête polaire est introduite au niveau de l'hydroxyle libre, puis avec hydrogénolyse, la seconde tête est incorporée. L'élimination finale des groupes protecteurs présents au niveau des têtes polaires permet de conduire aux structures dissymétriques cibles.

L'invention concerne également des compositions liposomiales incorporant au moins un composé de formule générale (I) selon l'invention décrits ci-dessus seul(s) ou en mélange avec un ou plusieurs colipide(s) synthétique(s) ou naturel(s).

Les composés selon l'invention permettent de conférer à de telles compositions liposomiales, une plus grande stabilité, notamment en milieu acide et vis-à-vis des protéines et lipoprotéines du sang.

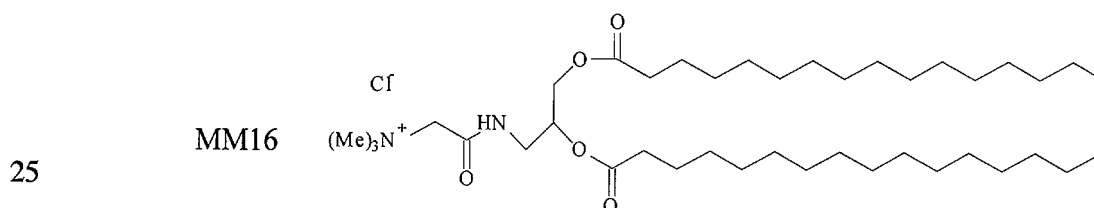
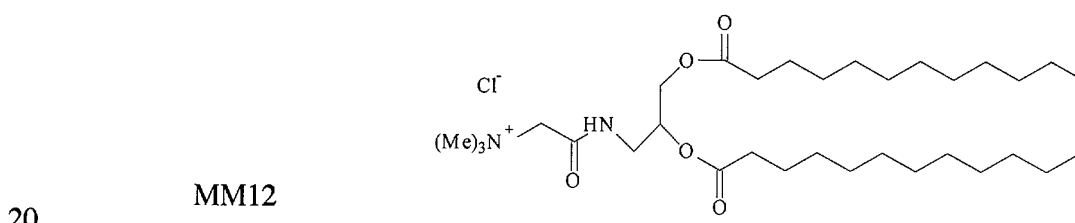
L'invention concerne notamment mais, non exclusivement, de telles compositions liposomiales dans lesquels le colipide est de la phosphatidylcholine de lécithine d'œuf.

L'invention concerne aussi de telles compositions liposomiales contenant au moins un composé de formule générale (I) dans laquelle R_1 et R_2 sont identiques ou différents et représentent l'un et/ou l'autre des motifs suivants :

5 . $A_1\text{-CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$, X^- , X représentant un halogène, A_1 représente une liaison amide (NHC(O)) ou ester (OC(O)) ;

10 . $A_2\text{-(PEG}_{X_1}\text{-A}_3)_n\text{-R}_4$, n étant égal à 0 ou 1, PEG_{X_1} étant un polyéthylèneglycol de poids moléculaire X_1 , X_1 étant inférieur ou égal à 5000 daltons, A_2 et A_3 pouvant être identiques ou différents et représentant une liaison éther (O), ester (OC(O)), amide (NHC(O)), urée (NHC(O)NH), thiourée (NHC(S)NH), ou thioéther (S), R_4 représentant un agent de ciblage ;
et au moins un co-lipide cationique
et au moins un co-lipide fusogène.

Le co-lipide cationique pourra par exemple être un lipide cationique bicaténaire de formule MM12 ou MM16 (*J.Gene Med* ; 2002 ; 4 ; 415-
15 427):



Le co-lipide fusogène pourra par exemple être la dioléylphosphatidyléthanolamine (DOPE) ou le cholestérol.

La présente invention concerne également l'utilisation des compositions
30 liposomiales décrites ci-dessus pour la vectorisation, c'est-à-dire le transfert

transmembranaire de molécules d'intérêt thérapeutique et/ou de molécules d'ADN ou d'ARN.

Notamment l'invention concerne l'utilisation de ces compositions liposomiales pour le transfert transmembranaire de gènes.

5 L'invention sera plus facilement comprise grâce à la description qui va suivre d'exemples non limitatifs de réalisation donnés en référence aux dessins dans lesquels les figures 1 et 2 représentent l'influence du plasmide (pCMVLuc) sur le potentiel zêta et la taille de différents complexes intégrant des compositions liposomiales selon l'invention.

10

Exemple 1 : espaceur de formule (4)

Le diol (8) (500 mg ; 3.85 mmol) est dissout dans 50 mL de CH_2Cl_2 anhydre et le proton sponge (1.7 g ; 2.3 éq) y est rajouté. Le milieu est agité pendant une heure à température ambiante. Ensuite le triflate (9) est ajouté
15 lentement (4.4 g ; 2.6 éq) et le mélange est porté à reflux pendant 2 jours. Après refroidissement, le brut réactionnel est filtré pour éliminer les sels de proton sponge. Le CH_2Cl_2 est concentré sous vide.

Le produit dibenzylé obtenu est purifié par colonne sur gel de silice (éluant : éther de pétrole/acétate d'éthyle 95/5 v/v) et 1.92 g de solide blanc sont
20 récupérés (rendement : 74%).

Ce produit dibenzylé ainsi préparé (2,6 g ; 4mmol) est solubilisé dans 100 mL de cyclohexane et le palladium acétate est ajouté (150 mg ; 5% en masse). Le milieu est placé sous atmosphère d'hydrogène et agité pendant 5 heures. Ensuite le milieu est chauffé jusqu'à dissolution totale du produit et filtré à chaud sur
25 célite et concentré sous vide. Le solide est solubilisé à chaud dans du cyclohexane ; après refroidissement le produit est récupéré par filtration sur Büchner. On récupère ainsi 1,7 g du composé (4) qui se présente sous la forme d'un solide blanc (rendement : 90%).

30

Exemple 2 : espaceur de formule (3)

A une suspension du sel de phosphonium (6) (300 mg ; 0,34 mmol) dans 6 mL de THF anhydre, on ajoute, à 0°C, le butyllithium en solution dans l'hexane (2M) (360 µL ; 0,72 mmol ; 2,1 éq) ; une coloration orangée apparaît. Le milieu réactionnel est agité pendant 15 minutes à 0°C, puis l'aldéhyde (7) (Y est un benzyl) (239 mg ; 0,69 mmol ; 2,0 éq) en solution dans 6 mL de THF anhydre est canulé. Une décoloration progressive est observée ainsi que la formation d'un précipité. Après quelques minutes, l'excès de butyllithium est détruit par de l'eau. Le mélange est extrait trois fois avec un mélange EP/AcOEt (6/4 v/v) puis les phases organiques sont lavées à l'eau, séchées, filtrées et concentrées. Une chromatographie sur colonne de gel de silice (25 éq, éluant : EP/AcOEt (99/1 v/v)) permet d'isoler 150 mg d'espaceur insaturé (0,21 mmol) se présentant sous la forme d'un solide blanc (rendement : 63%).

Le produit benzylé (1,93 g ; 2,8 mmol) est solubilisé dans l'éthanol (150 mL) puis additionné de Palladium sur charbon actif (500 mg). Le mélange réactionnel est placé sous atmosphère d'hydrogène pendant une nuit. Après avoir légèrement chauffé le milieu réactionnel, celui-ci est filtré à chaud sur célite, le solvant est évaporé. On obtient 1,34 g (2,6 mmol) de produit (3) qui se présente sous la forme d'un solide blanc (rendement : 93 %)

Exemple 3 : composé de formule (2)

Dans un ballon sec sont introduits de la 2,6-lutidine (425 µL ; 3,8 éq) puis 20 mL de dichlorométhane anhydre. A 0°C, l'anhydride triflique (600 µL ; 3,8 éq) est ajouté et le mélange est agité 15 minutes à température ambiante. Le diol (4) (500 mg ; 1 mmol) sous la forme solide est additionné en une seule fois. Après quelques minutes, de l'eau est ajoutée, la phase aqueuse est extraite 3 fois au dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse à 5% d'acide chlorhydrique, puis une solution aqueuse à 5% d'hydrogénocarbonate de sodium et enfin avec une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée, et concentrée. Le produit est purifié rapidement, car instable, par chromatographie sur colonne de

gel de silice (éluant : EP/AcOEt (8/2 v/v)). Le ditriflate ainsi obtenu (R_f 0,8 (EP/AcOEt 8/2 v/v)) est mis immédiatement en réaction.

A une suspension d'hydruure de potassium (568 mg ; 4 éq), en suspension dans 6 mL de THF anhydre on additionne, à 0°C, l'alcool (5) (Y est un benzyl)
5 (1,5 g ; 3 éq) dissous dans 6 mL de THF anhydre. Le mélange réactionnel est agité 30 minutes à température ambiante. Le triflate (800 mg ; 1.05 mmol ; 1 éq) dissous dans 8 mL de THF anhydre est ajouté goutte à goutte. Après 2 heures, l'excès d'hydruure de potassium est détruit par de l'eau. Une extraction à l'éther éthylique est réalisée. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium
10 puis filtrée et concentrée. Une purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (40 éq, éluant : EP/AcOEt (99/1 v/v)) permet d'isoler 23 mg (0,45 mmol) du composé benzylé qui se présente sous la forme d'une huile incolore (rendement 45% (sur les deux étapes)).

Le produit ainsi préparé (623 mg ; 0,45 mmol) est solubilisé dans 10 mL
15 d'acétate d'éthyle et le palladium acétate est ajouté (30 mg ; 5% en masse). Le milieu est placé sous atmosphère d'hydrogène et agité pendant 24 heures. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur célite et concentré sous vide. On récupère ainsi 463 mg du composé (2) qui se présente également sous la forme d'une huile incolore (Rendement : 85%).

20

Exemple 4: composé de formule (1)

Dans un ballon bien sec on introduit la 2,6-lutidine (423 μ L ; 3,60 mmol ; 3,8 éq), 20 mL de dichlorométhane anhydre et à 0°C, l'anhydride triflique (611 μ L ; 3,60 mmol ; 3,8 éq). Après 10 minutes d'agitation à 0°C, le diol (3) (500
25 mg ; 0,96 mmol) sous la forme solide est additionné en une seule fois. Le mélange réactionnel est remonté à température ambiante, puis chauffé à 30°C ; le diol se dissout. Après quelques minutes, après addition d'eau, la phase aqueuse est extraite 3 fois au dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse à 5% d'acide chlorhydrique, puis une solution
30 aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium 5% et enfin avec une solution saturée

de chlorure de sodium. La phase organique est séchée, filtrée, et concentrée. Le produit est purifié rapidement par chromatographie sur colonne de gel de silice (20 éq, éluant : EP/AcOEt (9/1 v/v)). Le triflate ainsi obtenu, qui se présente sous la forme d'un solide blanc, est mis immédiatement en réaction.

- 5 A 0°C, le triflate précédemment décrit (750 mg ; 0,96 mmol ; 1 éq) dans 6 mL de THF anhydre est ajouté goutte à goutte à une suspension d'hydruure de potassium (438 mg ; 3,8 mmol ; 4 éq) et d'alcool 5 (1,32 g ; 2,87 mmol ; 3 éq) dans 12 mL de THF anhydre. Le mélange réactionnel est agité 10 minutes à 0°C. Après quelques minutes, après addition d'eau, une extraction à l'éther diéthylique
- 10 est réalisée. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis filtrée et concentrée. Une purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (40 éq, éluant : EP/AcOEt (1/0 puis 95/5 v/v)) permet d'isoler le produit pseudo-macrocyclique benzylé (860 mg ; 0,61 mmol) qui se présente sous la forme d'une huile jaunâtre (rendement : 64 % (2 étapes)).
- 15 Le diol hémi-macrocyclique dibenzylé (1,77 g ; 1,2 mmol), solubilisé dans de l'acétate d'éthyle (50 mL), est mis sous atmosphère d'hydrogène pendant une nuit, en présence de palladium sur charbon actif (500 mg). Une filtration sur célite, à chaud est réalisée et le composé (1) (1,2 g ; 0,97 mmol), qui se présente sous la forme d'une huile, est isolé après concentration sous pression réduite
- 20 (rendement : 80 %).

Exemple 5 : Compositions liposomiales

- Différentes compositions liposomiales B, C, D, E, E1 ont été préparées par hydratation d'un film lipidique par une solution contenant de la
- 25 carboxyfluorescéine à 2,5%. Après hydratation des films lipidiques constitués d'un mélange de lipides ou de lipides synthétiques purs, puis agitation de la solution pendant quelques heures, les échantillons ont été extrudés à travers une membrane en polycarbonate (400nm puis 200nm). Une filtration sur gel Sephadex G75 a permis de recueillir les compositions liposomiales.

La stabilité de ces différentes compositions liposomiales selon l'invention a été testé à une température de 37°C :

5 en présence d'un composé tensio-actif (solution aqueuse de cholate de sodium à 0.4%) afin de modéliser le comportement de ces compositions en présence de sels biliaires (test n°1) ;

en présence de sérum de veau riche en lipoprotéines afin de modéliser le comportement de ces compositions dans le milieu sanguin (test n°3) ;

en milieu acide, à pH 2-3 (tampon 1XKRB), afin de mimer le comportement de ces compositions dans le compartiment stomacal (test n° 3).

10 Ces tests reposent sur la détermination par spectrofluorimétrie du taux de relargage d'une sonde fluorescente encapsulée. Dans les deux premiers cas, on mesure par spectrofluorimétrie le relargage de la sonde fluorescente. Pour l'étude en fonction du pH, après incubation, le pH est neutralisé et on effectue une dialyse de la carboxyfluorescéine libre. Les liposomes sont alors lysés et on dose la
15 carboxyfluorescéine qui était restée encapsulée.

Les résultats obtenus sont donnés dans les tableaux 1 à 3 ci-après en référence à une composition liposomiale A ne contenant que de la phosphatidylcholine de lécithine d'œuf (EPC).

Résultats du test n°1 (en présence du tensio actif).

20 Le tableau 1 ci-après donne des résultats obtenus dans le cadre du test n°1 avec différentes compositions liposomiales.

Composition liposomiale	Composé selon l'invention	teneur (massique)	Co-lipide	teneur (massique)	% de relargage
A	Aucun	0	EPC*	100	100
B	de formule 1	20	EPC	80	50
C	de formule 1	30	EPC	70	30
D	De formule 1 avec x=1 Z=CH ₂ et R1=R2=β-lactosyle	60	EPC	40	40

Tableau 1

Ces résultats montrent que les composés de la présente invention indiqués dans la deuxième colonne de ce tableau 1 apportent aux compositions liposomiales B, C, D un gain de stabilité en présence d'un composé tensio-actif, ce qui tend à prouver que les compositions selon l'invention présenteront une

5 stabilité accrue en présence des sels biliaires.

Il a par ailleurs été observé que ces composées synthétiques incorporés dans certaines formulations, induisent une meilleure stabilité que les diols macrocycliques naturels (diglycéroltétratéther -DGTE) obtenus après hydrolyse des têtes polaires.

10 Résultats du test n°2 (en présence de sérum de veau).

Le tableau 2 ci-après donne des résultats obtenus dans le cadre du test n°2 avec différentes compositions liposomiales.

Composition liposomiale	Composé selon l'invention	Teneur (massique)	Co-lipide*	Teneur (massique)	% de relargage
A	Aucun	0	EPC*	100	100
E	De formule I avec $x=1$ $Z=CH_2$ et $R1=R2$ =phosphatidyl choline	100	Aucun		30
E1	De formule I avec $x=1$ $Z=CH_2$ et $R1=R2$ =phosphatidyl choline	60	EPC	40	60
D	De formule I avec $x=1$ $Z=CH_2$ et $R1=R2$ = β -lactosyl	60	EPC	40	40

15

Tableau 2

Ces résultats montrent que les composés de la présente invention indiqués dans la deuxième colonne de ce tableau 2 apportent aux compositions liposomiales D, E, E1 un gain de stabilité en présence de sérum de veau, riche en

lipoprotéines, ce qui tend à prouver que les compositions selon l'invention présenteront une stabilité accrue en milieu sanguin.

Résultats du test n°3 (en milieu acide).

Le tableau 3 ci-après donne des résultats obtenus dans le cadre du test n°3
5 avec différentes compositions liposomiales.

Composition liposomiale	Composé selon l'invention	Teneur (massique)	Co-lipide*	Teneur (massique)	% de relargage **
A	Aucun	0	EPC*	100	95
E	De formule I avec $x=1$ $Z=CH_2$ et $R1=R2$ =phosphatidyl choline	100	aucun		30
E1	De formule I avec $x=1$ $Z=CH_2$ et $R1=R2$ =phosphatidyl choline	60	EPC	40	85

** après 10 minutes d'incubation.

Tableau 3

Ces résultats montrent que les composés de la présente invention indiqués
10 dans la deuxième colonne de ce tableau 3 apportent aux compositions liposomiales un gain de stabilité en pH acide, ce qui tend à prouver que les compositions selon l'invention présenteront une stabilité accrue dans le compartiment stomacal. Cette stabilité est comparable (20-30% de relargage) à celle obtenue avec des lipides naturels extraits de *Thermoplasma acidophilum*
15 (espèce thermoacidophile qui possède une double tolérance aux températures élevées et aux pH faibles)

Exemple 6 : Vectorisation

Différentes compositions liposomiales selon la présente invention ont
20 également été réalisées afin de tester leur aptitude à vectoriser le plasmide pCMVLuc.

Le composé de formule générale (I) utilisé dans ces compositions est celui dans lequel $x=0$ ou 1 $Z=O$ ou CH_2 et dans lequel $R_1=R_2=NHC(O)CH_2N^+Me_3,Cl$. Ce composé est ci-après dénommé GRcat.

5 Ce composé a été associé à un mélange de co-lipides constitués à parts égales de dioléylphosphatidyléthanolamine (DOPE) ou de cholestérol (Chol) d'une part et de lipide cationique bicaténaire MM16 d'autre part.

Le détail de ces compositions liposomiales est donné dans le tableau 4 ci-après.

Composition	Composé selon l'invention	Teneur (massique)	Co-lipides	Teneur (massique)
F1	GRcat	5%	DOPE +MM16	95 %
F2	GRcat	15%	DOPE +MM16	85 %
F3	GRcat	30%	DOPE +MM16	70 %
F4	GRcat	5%	Chol +MM16	95%
F5	GRcat	15%	Chol +MM16	85%
F6	GRcat	30%	Chol +MM16	70%

10

Tableau 4

Des mesures de diffusion dynamique de la lumière (détermination de la taille des objets) et de potentiel zêta (évaluation de la charge globale des objets) ont par ailleurs permis de déterminer la taille et le rapport de charge global de ces différentes compositions liposomiales avant et après ajout du plasmide pCMV

15 Luc .

Les résultats obtenus sont portés sur les figures 1 et 2 jointes.

Ces résultats mettent en évidence la formation d'agrégats supramoléculaires issus de l'interaction électrostatique entre les vésicules cationiques et le plasmide (pCMV Luc).

En effet, après ajout du plasmide, on observe une augmentation de la taille
5 des objets avec en parallèle une diminution du rapport de charge global qui reste néanmoins positif ; un potentiel zêta positif après complexation avec le plasmide étant nécessaire dans le cadre d'une vectorisation sans agent de ciblage car l'internalisation des agrégats se fait par interactions électrostatiques entre la membrane cellulaire (chargée négativement) et la vésicule (chargée positivement).

10 Il apparaît qu'une augmentation du taux d'incorporation du composé GRcat selon la présente invention entraîne une augmentation de la taille des liposomes et une augmentation (encore plus importante) de la taille des complexes liposomes-ADN.

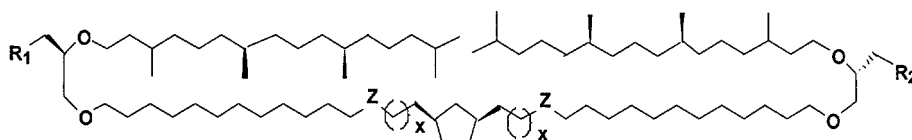
L'augmentation du taux d'incorporation n'entraîne pas d'effets importants
15 sur la valeur du potentiel zêta, mais en revanche, la formation des agrégats supramoléculaires avec l'ADN entraîne une diminution du potentiel zêta.

Les compositions liposomiales selon la présente invention, dont on peut contrôler la taille et le potentiel zêta, constituent donc des systèmes susceptibles d'être utilisés pour la vectorisation de molécules d'ADN et d'ARN et notamment
20 de gènes.

REVENDICATIONS

1. Composé de formule générale (I) :

5



I

10

dans laquelle :
 . x est égal à zéro ou un ;
 . Z représente un O, un S ou un CH₂ ;
 . R₁ et R₂ qui peuvent être identiques ou différents, représentent l'un ou l'autre des substituants suivants :

15

. OH

. OY avec Y qui représente un groupement protecteur ;

. OR₃, R₃ représentant un substituant monosaccharide ou disaccharide ;

20

. A₁-CH₂-N⁺(CH₃)₃, X⁻, X représentant un halogène, A₁ représente une liaison amide (NHC(O)) ou ester (OC(O)) ;

. OPO(OM)₂, M représentant un cation de métal alcalin ou alcalino-terreux ;

. OP(O)O⁻-O(CH₂)₂-N⁺(CH₃)₃.

25

. A₂-(PEG_{X₁}-A₃)_n-R₄, n étant égal à 0 ou 1, PEG_{X₁} étant un polyéthylèneglycol de poids moléculaire X₁, X₁ étant inférieur ou égal à 5000 daltons, A₂ et A₃ pouvant être identiques ou différents et représentant une liaison éther (O), ester (OC(O)), amide (NHC(O)), urée (NHC(O)NH), thiourée (NHC(S)NH), ou thioéther (S), R₄ représentant un agent de ciblage.

2. Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que ledit groupement protecteur est un groupement allyle ou benzyle ou tétrahydropyranyle ou trialkylsilyle.
- 5 3. Composé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que ledit agent de ciblage est choisi dans le groupe constitué par l'acide folique, les structures multiantennées comportant plusieurs motifs R_3 , les anticorps, les peptides.
4. Composé selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que R_3 est
10 un substituant choisi dans le groupe constitué par les substituants D-galactosyle, D-glucosyle, D-mannosyle, lactosyle, maltosyle.
5. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 4 répondant à la formule (I) dans laquelle :
- 15 . x est égal à zéro ou un ;
 . Z représente un O ou un CH_2 ;
 . R_1 et R_2 sont identiques ou différents et représentent l'un ou l'autre des substituants suivants :
- 20 . OH
 . OR_3 , R_3 représentant un lactosyle ;
 . $\text{OP}(\text{O})\text{O}^- - \text{O}(\text{CH}_2)_2 - \text{N}^+(\text{CH}_3)_3$;
 . $\text{OPO}(\text{OM})_2$, M représentant un cation de métal alcalin ou alcalino-terreux ;
 . $\text{A}_1 - \text{CH}_2 - \text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, X^- , X représentant un halogène,
- 25 A_1 représentant une liaison amide ($\text{NHC}(\text{O})$) ou ester ($\text{OC}(\text{O})$).
6. Composé selon la revendication 5 caractérisé en ce qu'il répond à la formule (I) dans laquelle $R_1 = R_2 = \text{OR}_3$, $R_3 = \beta$ -lactosyle

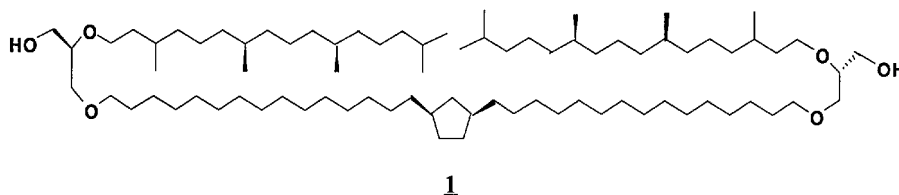
7. Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il répond à la formule (I) dans laquelle $R_1=R_2=OP(O)O^--O(CH_2)_2-N^+(CH_3)_3$

5 8. Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il répond à la formule (I) dans laquelle $R_1=R_2=NHC(O)CH_2-N^+(CH_3)_3$, X^- , X représentant un halogène.

9. Composé selon la revendication 8 caractérisé en ce que X est le chlore et le
10 brome.

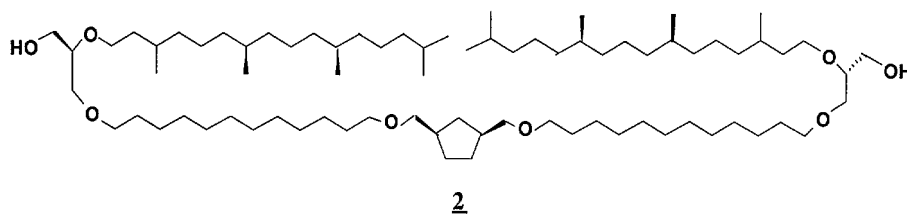
10. Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il répond à la formule (1) :

15



20 11. Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il répond à la formule (2) :

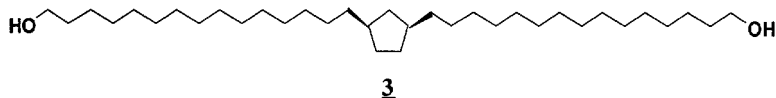
25



30

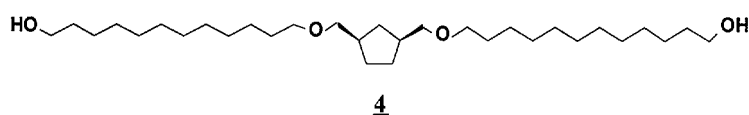
12. Composé pour la synthèse du composé selon la formule (1) caractérisé en ce qu'il répond à la formule (3)

5



13. Composé pour la synthèse du composé selon la formule (2) caractérisé en ce qu'il répond à la formule (4)

10



14. Composition liposomiale incorporant au moins un composé de formule générale (I) selon l'une des revendications 1 à 11.

15. Composition selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'elle inclut au moins un co-lipide.

16. Composition selon la revendication 15 caractérisé en ce que ledit colipide est la phosphatidylcholine de lécithine d'œuf.

17. Composition selon la revendication 15 ou 16 caractérisée en ce qu'elle comprend un composé de formule générale I dans laquelle R_1 et R_2 sont identiques ou différents et représentent l'un et/ou l'autre des motifs suivants :

. $A_1-CH_2-N^+(CH_3)_3$, X^- , X représentant un halogène, A_1 représente une liaison amide ($NHC(O)$) ou ester ($OC(O)$) ;

. $A_2-(PEG_{X_1}-A_3)_n-R_4$, n étant égal à 0 ou 1, PEG_{X_1} étant un polyéthylèneglycol de poids moléculaire X_1 , X_1 étant inférieur ou égal à 5000 daltons, A_2 et A_3 pouvant être identiques ou différents et représentant une liaison

éther (O), ester (OC(O)), amide (NHC(O)), urée (NHC(O)NH), thiourée (NHC(S)NH), ou thioéther (S), R_4 représentant un agent de ciblage ;
et au moins un co-lipide cationique
et au moins un co-lipide fusogène.

5

18. Composition selon la revendication 17 caractérisé en ce que ledit co-lipide cationique est un lipide cationique bicaténaire MM12 ou MM16.

19. Composition selon la revendication 17 ou la revendication 18 caractérisé
10 en ce que ledit co-lipide fusogène est la dioléylphosphatidyléthanolamine ou le cholestérol.

20. Utilisation d'une composition liposomiale selon l'une quelconque des revendications 14 à 19 pour la vectorisation de molécules d'intérêt thérapeutique.

15

21. Utilisation d'une composition liposomiale selon l'une quelconque des revendications 14 à 19 pour la vectorisation de molécules d'ADN ou d'ARN.

20

1/1

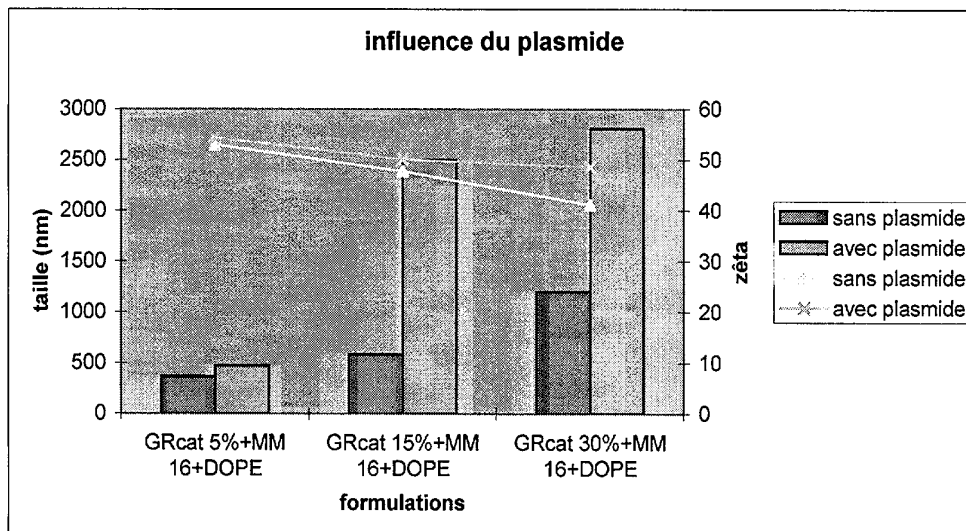


Figure 1

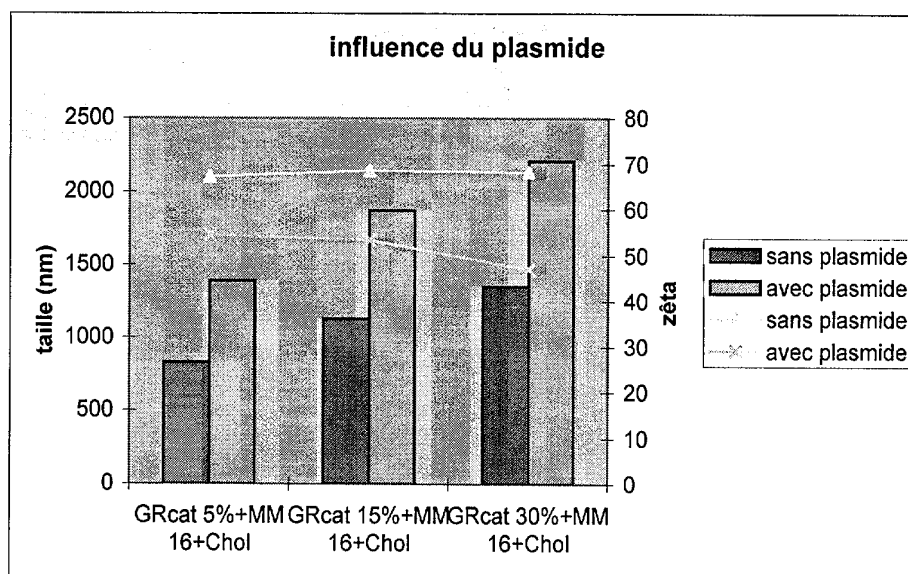


Figure 2



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 660131
FR 0413028

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	DE ROSA M: "Archaeal lipids: Structural features and supramolecular organization" THIN SOLID FILMS, ELSEVIER-SEQUOIA S.A. LAUSANNE, CH, vol. 284-285, 15 septembre 1996 (1996-09-15), pages 13-17, XP004078130 ISSN: 0040-6090 * page 13 - page 15, colonne de gauche * * figure 1 * * page 16, colonne de droite * -----	1-19	C07C43/115 C07C31/27 A61K31/09 A61K31/047 A61K9/127
A	WO 97/22333 A (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA; SPROTT, G., DENNIS; PATEL, GIRISH) 26 juin 1997 (1997-06-26) * page 2 - page 3 * * page 5, ligne 23 - page 6, ligne 11 * * page 9, ligne 17 - page 10, ligne 2 * * page 13, ligne 4 - page 16, ligne 13 * * page 30, ligne 11 - page 31, ligne 4; revendications 2,29; tableau 6A * -----	1-21	
A	WO 00/64858 A (CELLTECH THERAPEUTICS LIMITED; BLAGBROUGH, IAN; GEALL, ANDREW, JOHN; E) 2 novembre 2000 (2000-11-02) * page 2, ligne 31 - page 3, ligne 2 * * page 39 - page 44; revendications 1,31,45,48 * -----	20,21	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C12N C07C C07H C07F A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
16 septembre 2005		Seelmann, M	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0413028 FA 660131**

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

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **16-09-2005**

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9722333 A	26-06-1997	CA 2241247 A1	26-06-1997
		DE 69631970 D1	29-04-2004
		DE 69631970 T2	14-04-2005
		EP 0869773 A1	14-10-1998
		JP 2000502087 T	22-02-2000

WO 0064858 A	02-11-2000	AU 4421200 A	10-11-2000
		EP 1187807 A1	20-03-2002
