

(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
28 juin 2001 (28.06.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/46127 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷:
C07C 237/22, 323/60, C07F
9/09, A61K 39/39, 31/66, A61P 37/02

(74) Mandataire: BURTIN, Jean-François; Cabinet Gefib,
82, rue Baudin, F-92300 Levallois-Perret (FR).

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/IB99/02038

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

(22) Date de dépôt international:
22 décembre 1999 (22.12.1999)

(25) Langue de dépôt: français

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

(26) Langue de publication: français

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): OM
PHARMA [CH/CH]; 22, rue du Bois-du-Lan, P.O. Box
84, CH-1217 Meyrin 2 (CH).

(72) Inventeurs; et

Publiée:

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): BAUER,
Jacques [CH/CH]; 31, chemin de la Moraine, CH-1162
Saint-Prex (CH). MARTIN, Olivier, Richard [CH/FR];
62 bis, avenue Dauphine, F-45100 Orléans (FR). RO-
DRIGUEZ, Sylvain [CH/CH]; 10 B, rue du Borgeaud,
CH-1196 Gland (CH).

— Avec rapport de recherche internationale.

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

(54) Title: ACYL PSEUDOPEPTIDES BEARING A FUNCTIONALISED AUXILIARY SPACER

(54) Titre: PSEUDODIPEPTIDES ACYLES PORTEURS D'UN BRAS AUXILIAIRE FONCTIONNALISE

(57) Abstract: The invention specifically concerns pseudopeptides derived from functionalised amino acids, comprising fatty acid chains fixed in the form of amide on the amine functions of the pseudopeptide and whereof one of the ends bears a functionalised auxiliary spacer, the other end being an acid group in neutral or charged form. The inventive compounds have immunomodulatory properties per se as adjuvants, by acting as activators of cells presenting antigens such as macrophages and dendritic cells and as inducers of differentiation of dendritic cells. The inventive compounds can further be grafted on an antigen to modulate immune response or also grafted on pharmaceutical substance to improve its therapeutic activity or its targeting. The inventive compounds are therefore applicable in the field of human and veterinary medicine as immunising agents and as diagnostic tool.

(57) Abrégé: L'objet de l'invention concerne spécifiquement des pseudodipeptides qui dérivent d'acides aminés fonctionnalisés, comportant des chaînes d'acides gras fixées sous forme d'amide sur les fonctions amine du pseudodipeptide et dont l'une des extrémités est porteuse d'un bras auxiliaire fonctionnalisé, l'autre extrémité étant un groupement acide sous forme neutre ou chargée. Les composés de la présente invention possèdent des propriétés immunomodulatrices per se comme adjuvants, en agissant comme activateurs des cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages et les cellules dendritiques et comme inducteurs de la différenciation des cellules dendritiques. Les composés de l'invention peuvent en outre être greffés sur un antigène pour moduler la réponse immunitaire ou être également greffés sur un pharmacophore pour améliorer son action thérapeutique ou son ciblage. Les composés de l'invention trouvent de ce fait une utilisation en médecine humaine et vétérinaire comme agents immunisants et comme outil diagnostique.

WO 01/46127 A1

PSEUDODIPEPTIDES ACYLES PORTEURS D'UN BRAS AUXILIAIRE FONCTIONNALISE

5

INTRODUCTION

La présente invention se rapporte au domaine de la chimie, et plus particulièrement
10 à celui de la chimie des peptides. Elle a plus précisément pour objet des
bioconjugués de dérivés peptidiques avec un bras auxiliaire fonctionnalisé.

La bioconjugaison implique le couplage de deux ou plusieurs entités chimiques pour
former un nouveau complexe moléculaire possédant des propriétés différentes de
celles de ses composants individuels. Des produits naturels ou synthétiques, dotés
15 de propriétés pharmacologiques propres, peuvent ainsi être combinés entre eux
pour créer de nouvelles entités aux propriétés physicochimiques et
pharmacologiques originales ou améliorées par rapport aux composés de départ.
Les applications de la bioconjugaison touchent tous les domaines de la médecine
humaine, vétérinaire et les méthodes de diagnostic.

20

De nombreux agents de couplage de type homo- ou hétérobifonctionnels ont déjà
été décrits et peuvent être appliqués à la conjugaison de molécules aussi diverses
que des acides aminés, des peptides, des protéines, des sucres, des
oligosaccharides, des polysaccharides, des acides nucléiques, des oligonucléotides,
25 des polynucléotides, des lipides, et à pratiquement toute molécule porteuse d'un
groupe fonctionnel susceptible de former une liaison. Un effort considérable a été
consacré ces dernières années à la synthèse de constructions antigéniques
composées de deux molécules porteuses de messages différents. Good *et al.*
[(1987), *Science* 235, 1059-1062], ont par exemple synthétisé un peptide contenant
30 des épitopes reconnus à la fois par les lymphocytes T auxiliaires et par les
lymphocytes B. Bessler et Jung [(1992) *Res. Immunol.* 5, 548-553] ont décrit des
conjugués composés d'un peptide et d'un immunostimulant. Hoffmann *et al.* [(1997)
FEMS Immunol. Med. Microbiol. Microbiology 17, 225-234] ont décrit des conjugués

entre un lipopeptide et un peptide synthétique de la melittine. Ulrich et Myers [(1995) Vaccine Design, Plenum Press, New York, 495-524], ont observé que la réponse immunitaire n'était efficace que si l'haptène et l'adjuvant MPL (*Monophosphoryl Lipid A*) se trouvaient dans le même liposome. Ils ont discuté de la possibilité d'une liaison covalente entre l'adjuvant MPL et l'haptène. En effet un conjugué haptène-adjuvant pourrait s'avérer être très efficace comme adjuvant de vaccination. Ikeda et al. [(1999) Chem. Pharm. Bull., 47(4), 563-568] ont présenté une synthèse entre un analogue structurel du *Lipid A* et un antigène tumoral de nature peptidique et démontré *in vitro* une activité mitogénique.

10

Ce concept de conjugaison pourrait être valable aussi pour des protéines ou même des couples protéines-polysaccharides. En effet, il est connu que des polysaccharides utilisés seuls comme vaccin, n'induisent qu'une réponse immunologique faible chez les enfants de moins de 5 ans, parce que la réponse ne dépend pas des cellules T [Gotschlich *et al.*, (1977) ; Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Peltola *et al.*, (1977), Pediatrics 60, 730-737]. Au contraire, des polysaccharides liés aux protéines vecteurs (*carrier*) donnent une réponse immunologique beaucoup plus forte. Ce phénomène a été découvert en 1931 par Avery et Goebel [(1931), J. Exp. Med. 54, 437-447]. Divers vaccins développés ces dernières années témoignent du progrès dans ce domaine. On mentionnera en particulier les vaccins contre *Haemophilus influenzae* et divers sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* [Powell et Newman, (1995), Vaccine Design Plenum Press, New York]. Pour ces derniers, un vaccin multivalent a été développé [Sood et Fattom, (1998), Exp. Opin. Invest. Drugs 7 (3), 333-347].

25

Des perspectives nouvelles s'ouvrent avec un complexe composé d'un adjuvant lié à l'unité polysaccharide-protéine. La technologie de synthèse chimique de bioconjugués est bien développée et permet aujourd'hui de réaliser une multitude de projets inconcevables il y a quelques années, en utilisant les nombreux réactifs homo- ou hétérobifonctionnels disponibles et les procédures de conjugaison décrites dans une vaste littérature [Hermanson, (1996), Bioconjugate Techniques, Academic Press, New York].

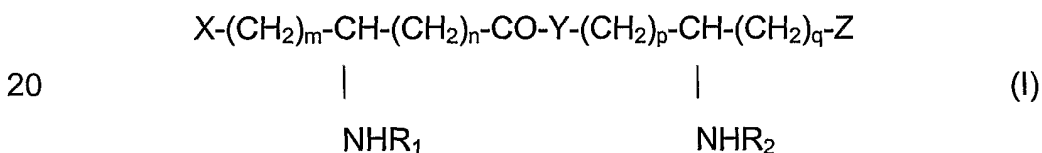
30

C'est ainsi que par exemple on pourrait citer la méthode de l'amination réductrice [Roy *et al.*, (1984), *Canad. J. Biochem. Cell. Biol.* 62, 270-279; Hermanson, (1995), p.472] permettant la conjugaison d'une molécule porteuse d'une fonction aldéhyde, avec une amine primaire présente sur un peptide ou une protéine, avec un conjugué protéine-polysaccharide ou avec un pharmacophore. Cette réaction conduit à la formation d'une dialkylamine très stable.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

L'invention a plus précisément pour objet des pseudodipeptides dérivés d'acides aminés fonctionnalisés, dont les fonctions amine libres sont amidifiées par des acides gras et dont l'une des extrémités est porteuse d'un bras auxiliaire fonctionnalisé.

Elle a spécifiquement pour objet des pseudodipeptides N-acylés porteurs d'un groupement acide sous forme neutre ou chargée à l'une des extrémités du pseudodipeptide et porteurs à l'autre extrémité d'un bras auxiliaire fonctionnalisé, répondant à la formule générale I.



dans laquelle R_1 et R_2 représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou des substituants choisis parmi les groupes hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyle en $C_1 - C_{24}$) thio

les descripteurs m , n pouvant prendre une valeur variant de 0 à 10

les descripteurs p , q pouvant prendre une valeur variant de 1 à 10

X et Z représentent un groupe acide sous forme neutre ou chargée ou un bras auxiliaire fonctionnalisé,

avec la limitation que l'un au moins des substituants X ou Z représente un bras auxiliaire fonctionnalisé,

Y représente O ou NH,

Le groupe acide X ou Z sera choisi de préférence parmi les groupements :

- carboxyle
- carboxy [(C₁-C₅)alkoxy]
- 5 -carboxy [(C₁-C₅)alkylthio]
- phosphono [(C₁-C₅)alkoxy]
- phosphono [(C₁-C₅)alkylthio]
- dihydroxyphosphoryloxy [(C₁-C₅)alkoxy]
- dihydroxyphosphoryloxy
- 10 -hydroxysulfonyloxy
- hydroxysulfonyl [(C₁-C₅)alkoxy]
- hydroxysulfonyl [(C₁-C₅)alkylthio]
- hydroxysulfonyloxy [(C₁-C₅)alkoxy]
- hydroxysulfonyloxy [(C₁-C₅)alkylthio]

15

Le groupe auxiliaire en X ou Z sera de formule générale (II)



20 A pouvant être O, S ou NH

le descripteur r pouvant prendre une valeur de 0 ou de 1

le descripteur s pouvant prendre une valeur variant de 1 à 10

W pouvant être choisi de préférence parmi les groupements :

- formyle
- 25 -acétyle
- cyano
- halogéno -amino
- bromo ou iodo-acétamido
- acylamido
- 30 -diacylimido
- sulfhydryle
- alkylthio
- hydroxyle

- acyloxy
- vinyle
- éthynyle
- carboxyle libre ou sous forme d'ester, d'anhydride mixte, d'amide ou d'hydrazide
- 5 -azido
- thiocyano

Lorsque les substituants X ou Z représentent un groupe acide sous forme neutre, il s'agit de la forme carboxylique, sulfonique, phosphonique ou phosphorique libre.

- 10 Lorsqu'il s'agit d'un groupe acide sous forme chargée il s'agit de la forme carboxylique, sulfonique, phosphonique ou phosphorique salifiée, notamment par addition d'une base minérale ou organique, de préférence thérapeutiquement compatible. Lorsque les bases ne sont pas thérapeutiquement compatibles, elles peuvent servir de moyen d'identification, de purification ou de dédoublement.

15

- Parmi les bases salifiantes thérapeutiquement compatibles on citera notamment les bases alcalines comme les hydroxydes de sodium, de potassium, de lithium, les sels d'ammonium ; les bases alcalino-terreuses comme les hydroxydes de calcium ou de strontium, les sels de magnésium, les sels de métaux ferreux et similaires, les bases
20 organiques comme celles dérivées d'amines primaires, secondaires ou tertiaires des aminoacides à réaction basique comme la lysine ou l'ornithine ou des sucres aminés.

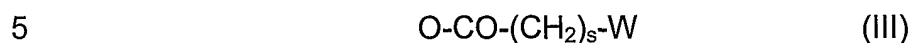
- Des bases non utilisables thérapeutiquement sont par exemple la brucine, la
25 strychnine, la N-méthylglucosamine ou la N-méthylmorpholine. Comme indiqué ci-dessus les sels en découlant serviront comme moyen de séparation ou d'identification.

- Lorsque m est égal à 1 et n est égal à 0, la molécule peut dériver de la sérine ou de
30 l'acide aspartique. Lorsque m est égal à 2 et n est égal à 0, la molécule peut dériver de l'homosérine ou de l'acide glutamique

Lorsque Y = NH, p est égal à 3 et q est égal à 1, il peut s'agir d'un dérivé de la citrulline ou de l'ornithine ou de l'arginine.

Lorsque p est égal à 4 et q est égal à 1, il peut s'agir d'un dérivé de l'homoarginine ou de la lysine

Lorsque le substituant X ou Z représente le groupe auxiliaire de formule générale (III)

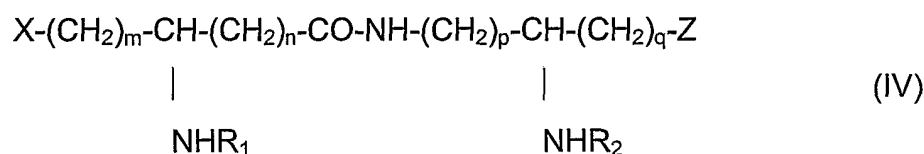


le descripteur s pouvant prendre une valeur variant de 1 à 10, mais plus particulièrement 4, 5 ou 6

W sera choisi de préférence parmi les groupements :

- 10 - formyle
 - amino
 - hydroxyle

Parmi les pseudodipeptides objet de l'invention, on retiendra particulièrement
 15 comme composés actuellement préférés les composés de formule générale IV:



20

dans laquelle R₁ et R₂ représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe

25 - C₂₄) thio

les descripteurs m, n pouvant prendre une valeur variant de 0 à 10

les descripteurs p, q pouvant prendre une valeur variant de 1 à 10

et dans laquelle X est un carboxyle ou un radical dihydroxyphosphoryloxy ou un groupe carboxy [(C₁-C₅)alkoxy] ou carboxy [(C₁-C₅)alkylthio] et dans laquelle Z est

30 un radical 6-aminohexanoyloxy, un radical 6-oxohexanoyloxy, un radical 6-hydroxyhexanoyloxy ou un radical 6,7-dihydroxyheptanoyloxy

L'invention concerne en particulier à titre de composés actuellement préférés :

- l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétra-decanoylamino] pentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 5
- le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétra-décanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-(6-oxohexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 10
- l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétra-decanoylamino] pentyl]amide 5-O-(6-oxohexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 15
- le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétra-décanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogéné-phosphate (6-aminohexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 20
- le 2-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-(dihydroxyphosphoryloxy)butanoate de {2-[(R)-3-hydroxyoxytétradécanoylamino]-5-(6-oxohexyl)amino}pentyle et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 25
- La définition de R₁ et R₂ englobe des dérivés acyles à chaîne de longueur variable allant de 2 à 24 atomes de carbone, identiques ou différents, ramifiés ou en chaîne droite, saturés ou insaturés, pouvant porter un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé par un alkyle, amino, acylamino, hydroxyle, alkoxy, acyloxy, acylthio et alkylthio.
- 30
- Parmi les groupements acyle concernés, ceux dérivés de l'acide laurique, de l'acide 3-hydroxymyristique, de l'acide 3-lauryloxy-myristique, de l'acide

3-myristyloxymyristique et de l'acide 3-palmitoyloxymyristique sont ceux actuellement préférés.

Les composés suivants de formule générale I sont porteurs d'un bras auxiliaire et sont désignés sous le nom de code suivant:

- OM-197-FV7: X = dihydroxyphosphoryloxy, Y = NH, Z = auxiliaire 6-oxohexanoyloxy, R1 = 3-lauryloxy-myristyle, R2 = 3-hydroxymyristyle, m = 2, n = 0, p = 3, q = 1
- 10 OM-287-AC5: X = dihydroxyphosphoryloxy, Y = NH, Z = auxiliaire 6-amino-hexanoyloxy, R1 = 3-lauryloxymyristyle, R2 = 3-hydroxymyristyle, m = 2, n = 0, p = 3, q = 1
- OM-197-MC-FV6: X = carboxyle, Y = NH, Z = auxiliaire 6-oxohexanoyloxy, R1 = 3-lauryloxymyristyle, R2 = 3-hydroxymyristyle, m = 1, n = 0, p = 3, q = 1
- 15 OM-197-FV8: X = dihydroxyphosphoryloxy, Y = NH, Z = auxiliaire 6-hydroxyhexanoyloxy, R1 = 3-lauryloxymyristyle, R2 = 3-hydroxymyristyle, m = 2, n = 0, p = 3, q = 1
- 20 OM-144-FP9: X = dihydroxyphosphoryloxy, Y = O, Z = auxiliaire (6-oxohexyl)amino, R1 = 3-lauryloxymyristyle, R2 = 3-hydroxymyristyle, m = 2, n = 0, p = 1, q = 3
- OM-112-FV7: X = carboxyméthoxy, Y = NH, Z = auxiliaire 6-oxohexanoyloxy, R1 = 3-lauryloxymyristyle, R2 = 3-hydroxymyristyle, m = 1, n = 0, p = 3, q = 1
- 25 OM-212-AH1: X = carboxyméthylthio, Y = NH, Z = auxiliaire 7-aminoheptanoyloxy, R1 = 3-myristoyloxymyristyle, R2 = 3-hydroxymyristyle, m = 1, n = 0, p = 3, q = 1
- 30 OM-312-FV7: X = -O-CH₂-CH(COOH)₂, Y = NH, Z = auxiliaire 6-oxohexanoyloxy, R1 = 3-lauryloxymyristyle, R2 = 3-hydroxymyristyle, m = 1, n = 0, p = 3, q = 1

OM-412-BA7: X = dihydroxyphosphoryloxy, Y = NH, Z = auxiliaire
6-(bromoacétamido)hexanoyloxy, R1 = 3-lauryloxy-myristyle, R2 =
3-hydroxy-myristyle, m = 2, n = 0, p = 3, q = 1

- 5 OM-512-FV7: X = dihydroxyphosphoryloxy, Y = NH, Z = auxiliaire 6-oxohexanoyloxy,
R1 = 3-hydroxy-myristyle, R2 = 3-lauryloxy-myristyle, m = 2, n = 0, p = 3, q = 1

Ces composés, se distinguent par des propriétés pharmacologiques intéressantes,
notamment immunomodulatrices. Ils trouvent un intérêt particulier dans la
10 préparation de compositions vaccinales en tant que conjugués de manière covalente
avec des antigènes de nature polypeptidique ou polysaccharidique ou sur des
composés constitués de polypeptides conjugués à des polysaccharides. Ils peuvent
être utilisés notamment dans la prévention des infections d'origine virale,
microbienne et protozoaires ou dans la thérapie de certaines maladies
15 autoimmunes.

Ils trouvent également une utilisation comme vecteur de molécule d'intérêt
thérapeutique par leurs propriétés d'association non-covalente selon le caractère
plus ou moins hydrophile ou hydrophobe de leur bras auxiliaire. Leur propriétés
chimiques qui permettent de les coupler chimiquement avec des molécules d'intérêt
20 thérapeutique, de même que leur caractère amphiphile favorise les formulations et le
transport des molécules qui leur sont associées vers les récepteurs membranaires,
ainsi que vers les parois et le cytoplasme cellulaires.

Ils peuvent être utilisés également seuls ou en association covalente ou non avec
une molécule d'intérêt thérapeutique par voie orale, parentérale, rectale, topique,
25 percutanée ou permuqueuse.

Ils peuvent être utilisés seuls ou en association covalente ou non avec une molécule
d'intérêt thérapeutique par incubation extratemporanément *ex vivo* avec des cellules
sanguines afin de rendre les cellules immunocompétentes avant de les réinoculer
in vivo par voie parentérale.

30 Les molécules montrent des propriétés semblables, en tant qu'adjuvants du système
immunitaire utilisés par exemple pour la vaccination, en association covalente ou
non avec les antigènes appropriés, contre des maladies d'origine virale, parasitaire,

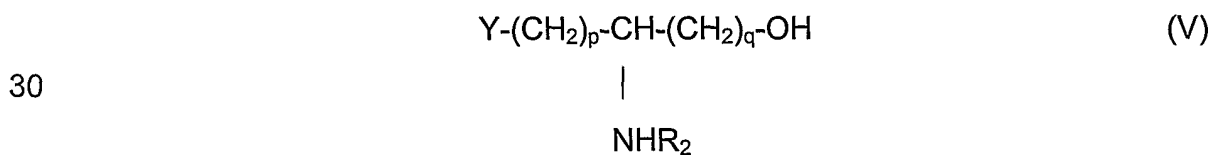
microbienne et fongique. Ces molécule conjuguées ou non peuvent être en outre utilisées dans la thérapie de certaines maladies autoimmunes.

Par contre, certains des composés selon l'invention montrent des propriétés différentes dans leur capacité à induire la production de cytokines ou la maturation
5 des cellules souches immunocompétentes provenant des organes hématopoiétiques et lymphoïdes.

Certains des composés selon l'invention favorisent la maturation et la différenciation des monocytes en cellules dendritiques fonctionnelles, en présence ou en absence de l'antigène approprié et contribuent ainsi à renforcer l'immunité humorale et
10 cellulaire.

Les composés selon l'invention sont particulièrement intéressants du fait de leur faible toxicité. Ils sont utilisés en association covalente ou non avec des antigènes dans la prévention ou la thérapie de maladies infectieuses chez l'homme et chez
15 l'animal à des doses qui varient de 0.005 mg à 100 mg par prise unitaire et de 0.005 à 200 mg par jour selon les indications.

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention des pseudodipeptides N-acylés porteurs d'un groupement acide sous forme neutre ou chargée à l'une des extrémités du pseudodipeptide et porteurs à l'autre extrémité
20 d'un auxiliaire fonctionnalisé, répondant à la formule générale I, qui consiste en ce qu'on bloque les fonctions amine en position (q+1) et YH en position ω d'un acide aminé ω -fonctionnalisé par des réactifs de blocage orthogonaux, on soumet la fonction carboxylique restée libre à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool correspondant, on libère la fonction amine en position (q+1) que l'on acyle à l'aide
25 d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule R_2OH dans laquelle R_2 est défini comme précédemment, puis libère la fonction terminale pour obtenir l'amino alcool fonctionnalisé de formule générale V

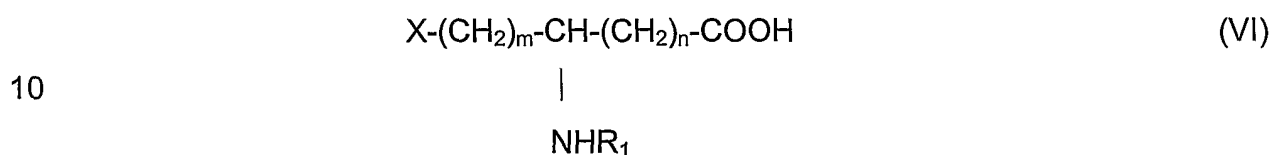


dans laquelle Y représente HO ou préférablement NH_2 ,

R₂ représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus,

p et q représentent chacun un nombre entier variant de 1 à 10

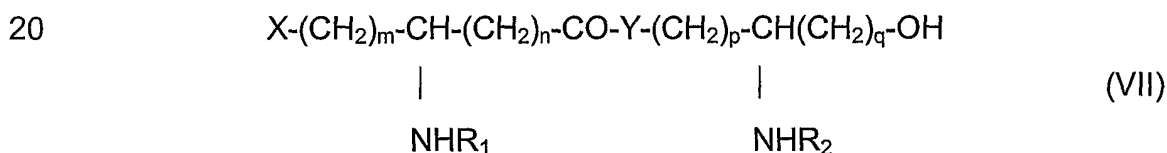
5 que l'on condense en présence d'un agent de condensation peptidique dans un solvant inerte, avec un dérivé d'un acide aminé ω-fonctionnalisé de formule générale VI



dans laquelle R₁ est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme précédemment,

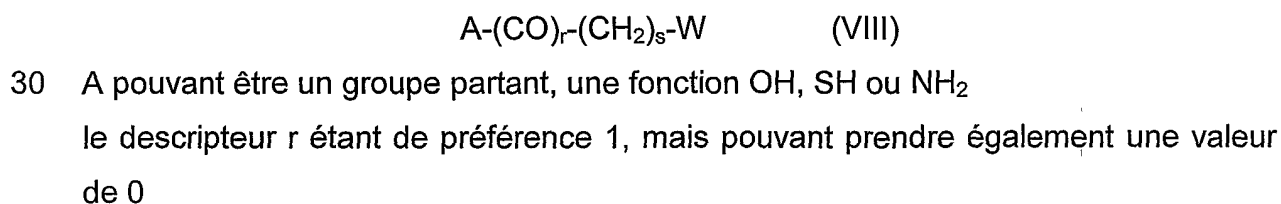
15 m et n est un nombre entier variant de 0 à 10

et X est un groupe acide défini comme précédemment qui peut être sous forme estérifiée pour former le pseudodipeptide de formule générale VII



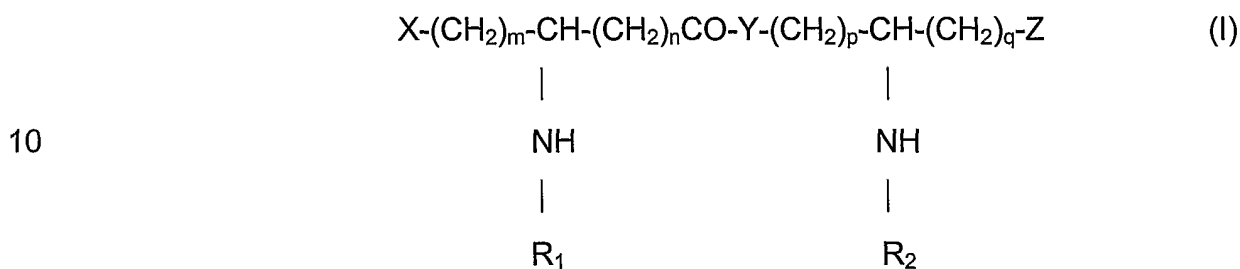
dans laquelle les substituants R₁, R₂, et les descripteurs m, n, p et q sont définis comme précédemment,

25 dont on peut -si désiré- substituer, alkyliser ou acyler la fonction alcool terminal libre par un réactif de substitution, d'alkylation ou d'acylation de formule générale VIII,



le descripteur s étant compris de préférence entre 2 et 6, mais pouvant prendre une valeur variant de 1 à 10

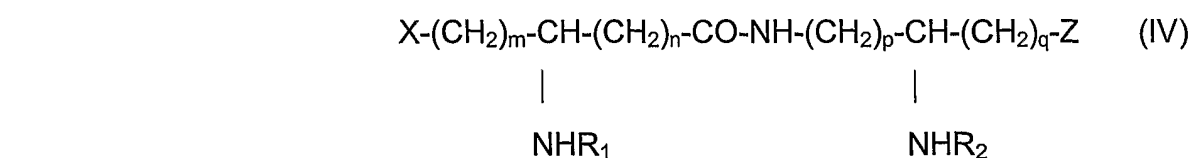
W étant choisi de préférence parmi les groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -amino, -bromo ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -sulfhydryle, -alkylthio, -hydroxyle, -acyloxy, -vinyle, -ethynyle, -carboxyle libre ou présent sous forme d'ester, d'anhydride mixte, d'amide ou d'hydrazide, -azido, -thiocyano ou leurs précurseurs.



dans laquelle et les substituants X, Y, Z, R₁, R₂, n, m, p et q ont les significations fournies antérieurement,

si nécessaire en présence d'un agent de couplage, et de le soumettre à une hydrogénation catalytique ou à un autre processus de déprotection de façon à obtenir le dérivé de formule générale I

L'invention concerne aussi un procédé d'obtention des phosphopseudodipeptides de formule générale IV



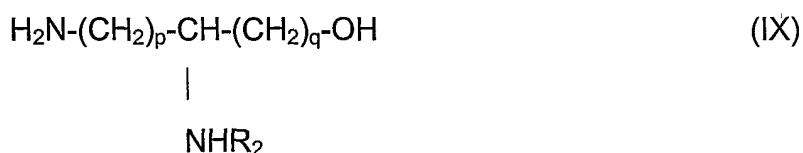
dans laquelle R₁ et R₂ représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyl en C₁-C₂₄) thio

les descripteurs m, p et q pouvant prendre une valeur allant de 1 à 10

le descripteur n pouvant prendre une valeur allant de 0 à 10

dans laquelle X et Z représentent chacun un groupement acide ou un auxiliaire fonctionnalisé,

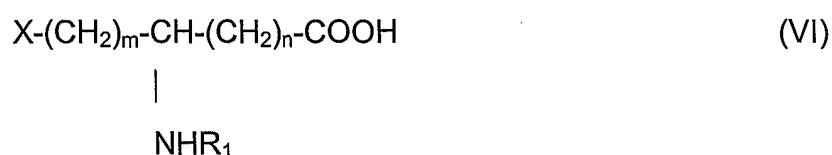
caractérisé en ce qu'on bloque les fonctions amine en position (q+1) et en ω d'un acide diaminé de formule $H_2N(CH_2)_pCHNH_2(CH_2)_{q-1}COOH$ par des réactifs de blocage labiles par acidolyse et hydrogénéolyse, respectivement, soumet la fonction carboxylique restée libre à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool correspondant, libère la fonction amine en (q+1) que l'on acyle à l'aide d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule R_2OH dans laquelle R_2 est défini comme précédemment, puis libère la fonction amine terminale par hydrogénéolyse pour obtenir l'amino alcool de formule générale IX



dans laquelle R_2 représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus,

p et q représentent un nombre entier variant de 1 à 10

que l'on condense en présence d'un agent de condensation peptidique dans un solvant inerte avec un dérivé d'acide aminé ω -hydroxylé de formule générale VI



25

dans laquelle R_1 est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants

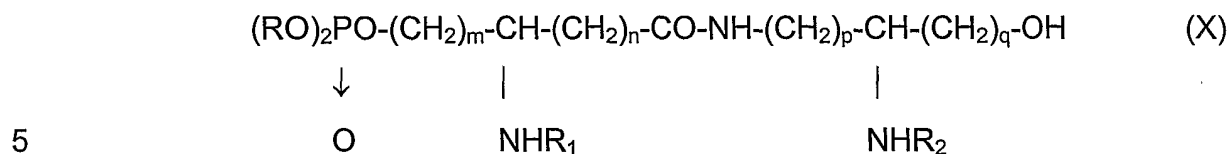
m est un nombre entier variant de 1 à 10

30 n est un nombre entier variant de 0 à 10

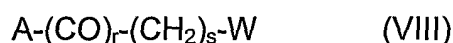
et X est un groupe dialkyloxy- ou diaryloxy-phosphoryloxy de formule $(RO)_2 P-O$



pour former le pseudodipeptide de formule générale X



dans laquelle les substituants R_1 , R_2 et les descripteurs m , n , p et q sont définis comme précédemment, et R est un radical labile par hydrogénéolyse, dont on peut -si désiré- substituer, alkyler ou acyler la fonction alcool terminal libre par un réactif de substitution, d'alkylation ou d'acylation de formule générale VIII,

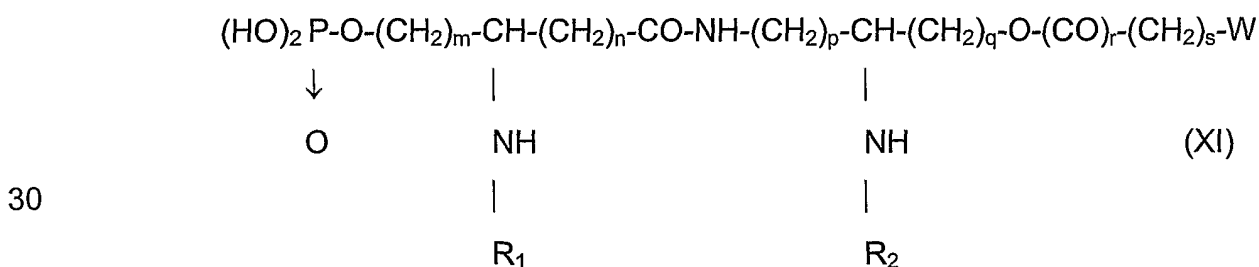


A pouvant être un groupe partant, une fonction OH, SH ou NH_2 le descripteur r étant de préférence 1, mais pouvant prendre également une valeur de 0

le descripteur s étant compris de préférence entre 2 et 6, mais pouvant prendre une valeur variant de 1 à 10

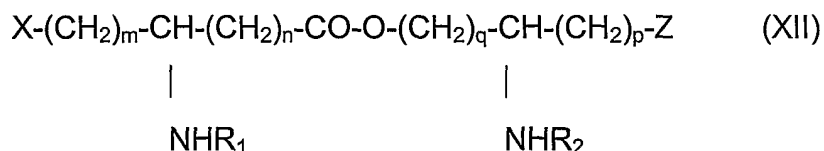
W étant choisi de préférence parmi les groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -amino, -bromo ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -sulfhydryle, -alkylthio,, -hydroxyle, -acyloxy, -vinyle, -ethynyle, -carboxyle libre ou sous forme d'ester, d'anhydride mixte, d'amide ou d'hydrazide, -azido, -thiocyano ou leurs précurseurs,

si nécessaire en présence d'un agent de couplage, et de le soumettre à une hydrogénation catalytique ou à un autre processus de déprotection de façon à obtenir le dérivé de formule générale XI



dans laquelle les substituants W, R₁, R₂, m, n, p, q, r, s ont les significations fournies antérieurement.

L'invention concerne aussi un procédé d'obtention des phosphopseudodipeptides de
5 formule générale XII



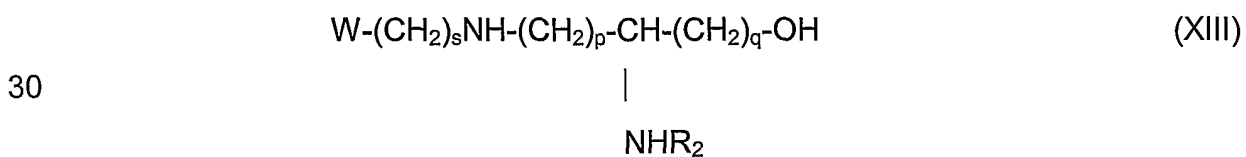
10 dans laquelle R₁ et R₂ représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyl en C₁ - C₂₄) thio

15 les descripteurs m, p et q pouvant prendre une valeur allant de 1 à 10

le descripteur n pouvant prendre une valeur allant de 0 à 10

dans laquelle X et Z représentent chacun un groupement acide ou un auxiliaire fonctionnalisé

qui consiste en ce qu'on bloque les fonctions amine en position (q+1) et en ω d'un
20 acide diaminé de formule H₂N(CH₂)_pCHNH₂(CH₂)_{q-1}COOH par des réactifs de blocage labiles par acidolyse et hydrogénolyse, respectivement, soumet la fonction carboxylique restée libre à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool correspondant, libère la fonction amine en (q+1) que l'on acyle à l'aide d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule R₂OH dans laquelle R₂ est défini
25 comme précédemment, libère la fonction amine terminale par hydrogénolyse puis alkyle la fonction amine avec un triflate d'alkyle ω-fonctionnalisé pour obtenir l' amino alcool de formule générale XIII

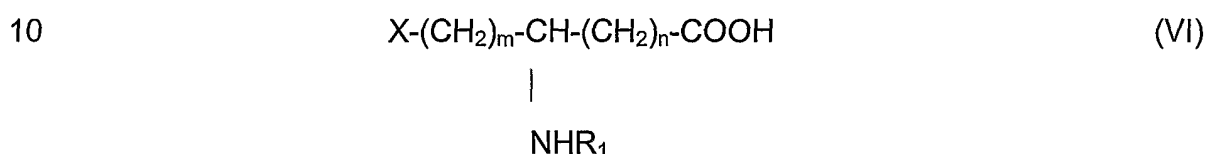


dans laquelle R_2 représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus,

p et q représentent un nombre entier variant de 1 à 10

5 le descripteur s étant compris de préférence entre 2 et 7, mais pouvant prendre une valeur variant de 1 à 10

que l'on condense en présence d'un agent de condensation dans un solvant inerte avec un dérivé d'acide aminé ω -hydroxylé de formule générale VI



dans laquelle R_1 est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24
15 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants

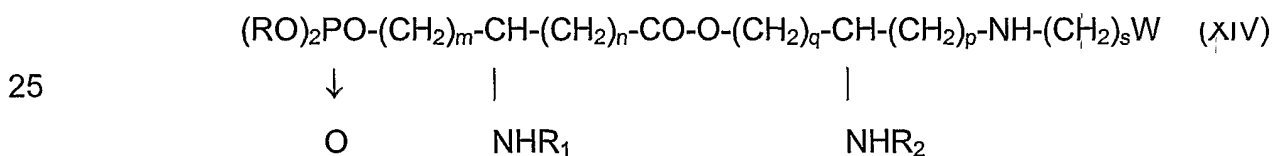
m est un nombre entier variant de 1 à 10

n est un nombre entier variant de 0 à 10

et X est un groupe dialkyloxy- ou diaryloxy-phosphoryloxy de formule $(RO)_2 P-O$



pour former le pseudodipeptide de formule générale XIV



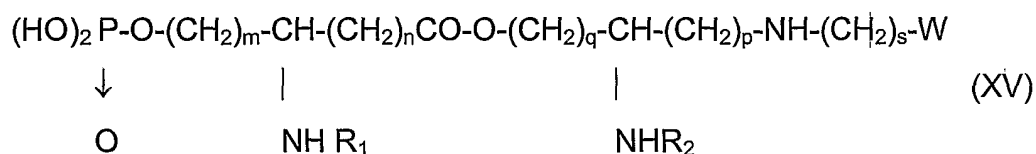
dans laquelle les substituants R_1 , R_2 et les descripteurs m, n, p, q et s sont définis
comme précédemment, et R est un radical labile par hydrogénéolyse,

30

puis le soumettre à une hydrogénation catalytique ou à un autre processus de déprotection de façon à obtenir le dérivé de formule générale XV

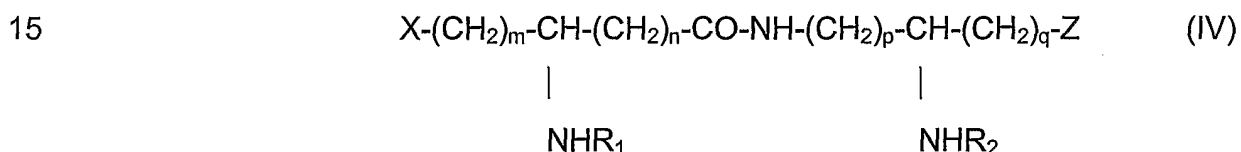
W étant choisi de préférence parmi les groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -bromo ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -acyloxy, -vinyle, -ethynyle, -carboxyle libre ou sous forme d'ester, d'anhydride mixte, d'amide ou d'hydrazide, -azido, -thiocyano ou leurs précurseurs.

5



10 dans laquelle les substituants W, R₁, R₂, m, n, p, q, r, et s ont les significations fournies antérieurement.

L'invention concerne aussi un procédé d'obtention des carboxypseudodipeptides de formule générale IV



20 dans laquelle R₁ et R₂ représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyl en C₁-C₂₄) thio

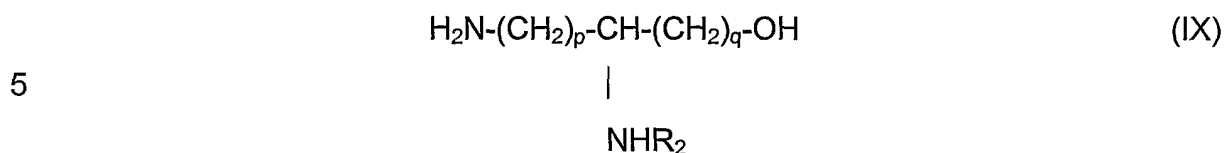
les descripteurs m, p et q pouvant prendre une valeur allant de 1 à 10

25 le descripteur n pouvant prendre une valeur allant de 0 à 10

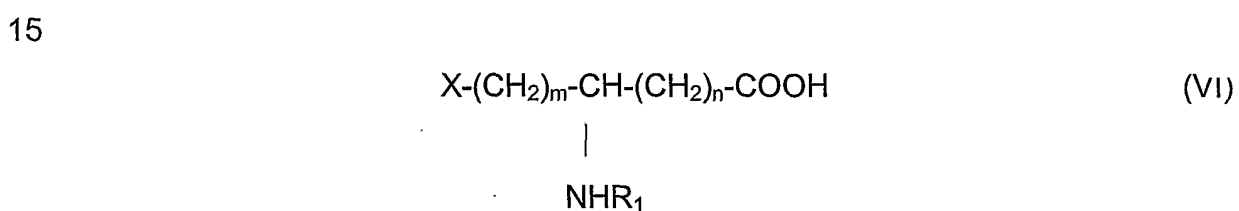
dans laquelle X et Z représentent chacun un groupement acide ou un auxiliaire fonctionnalisé

30 qui consiste en ce qu'on bloque les fonctions amine en position (q+1) et en ω d'un acide diaminé de formule H₂N(CH₂)_pCHNH₂(CH₂)_{q-1}COOH par des réactifs de blocage labiles par acidolyse et hydrogénéolyse, respectivement, soumet la fonction carboxylique restée libre à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool correspondant, libère la fonction amine en (q+1) que l'on acyle à l'aide d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule R₂OH dans laquelle R₂ est défini

comme précédemment, puis libère la fonction amine terminale par hydrogénolyse pour obtenir l'amino alcool de formule générale IX



dans laquelle R_2 représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus,
 p et q représentent un nombre entier variant de 1 à 10
 que l'on condense en présence d'un agent de condensation peptidique dans un solvant inerte avec un dérivé fonctionnel d' ω -carboxy amino acide de formule générale VI



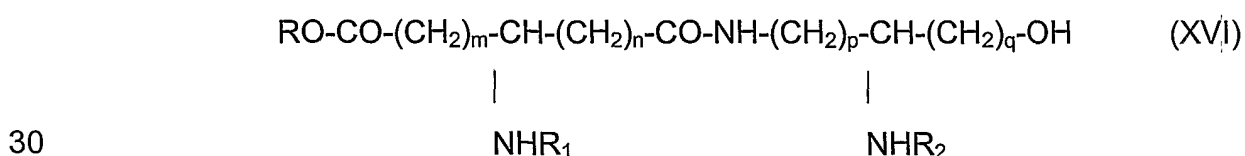
dans laquelle R_1 est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants

m est un nombre entier variant de 1 à 10

n est un nombre entier variant de 0 à 10

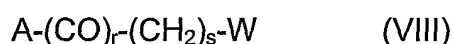
et X est un radical RO-CO-

pour former le pseudodipeptide de formule générale XVI



dans laquelle les substituants R_1 , R_2 et les descripteurs m , n , p et q sont définis comme précédemment, et R est un groupe labile par hydrogénolyse comme par exemple le groupe benzyle,

5 dont on peut -si désiré- substituer, alkyler ou acyler la fonction alcool terminal libre par un réactif de substitution, d'alkylation ou d'acylation de formule générale VIII,



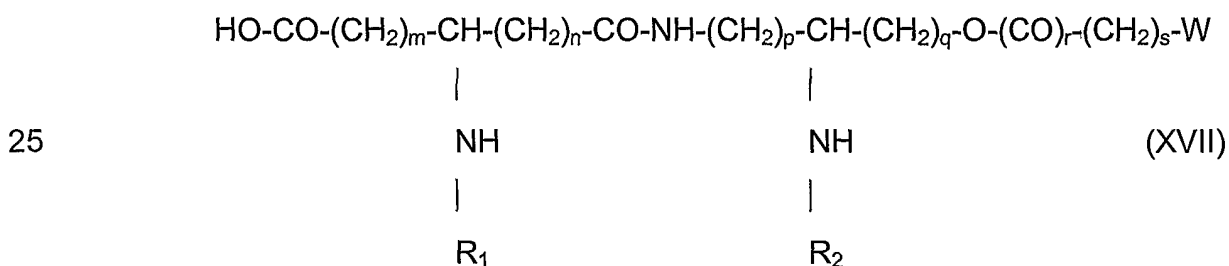
A être un groupe partant, une fonction OH, SH ou NH_2

10 le descripteur r étant de préférence 1, mais pouvant prendre également une valeur de 0

le descripteur s étant compris de préférence entre 2 et 6, mais pouvant prendre une valeur variant de 1 à 10

15 W étant choisi de préférence parmi les groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -amino, -bromo ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -sulfhydryle, -alkylthio, -hydroxyle, -acyloxy, -vinyle, -ethynyle, -carboxyle libre ou sous forme d'ester, d'anhydride mixte, d'amide ou d'hydrazide, -azido, -thiocyano ou leurs précurseurs,

20 si nécessaire en présence d'un agent de couplage, et de le soumettre à une hydrogénation catalytique ou à un autre processus de déprotection de façon à obtenir le dérivé de formule générale XVII



30 dans laquelle les substituants W , R_1 , R_2 , m , n , p , q , r , s ont les significations fournies antérieurement.

La stéréochimie des centres porteurs de groupes acylamino est déterminée par la configuration des acides aminés de départ et celle des groupes acylamino par la

configuration des acides gras de départ. On peut partir d'un diamino acide de configuration L ou D ou racémique. On peut partir d'un acide aminé hydroxylé de configuration L, D ou racémique. Tous ces stéréoisomères ou diastéréoisomères des composés de formule générale I ou IV ou XII, font partie de l'invention.

5

De façon générale, les composés de l'invention sont préparés par le couplage entre la fonction acide d'un acide aminé N-acylé ω -fonctionnalisé et la fonction amine d'un amino alcool résultant de la réduction du carboxyle d'un acide diaminé mono-N-acylé, puis de la O-acylation ou -alkylation de la fonction alcool restée libre afin
10 d'introduire un auxiliaire fonctionnalisé, qui peut être éventuellement modifié après accrochage afin d'exposer une fonction réactive. La déprotection du produit final libère une fonction acide.

Dans une méthode actuellement préférée pour préparer les composés de l'invention
15 (Figure 1), l'acide aminé ω -fonctionnalisé est un acide α -aminé ω -hydroxylé tel que la serine ou l'homoserine, qui est soumis à une séquence de réactions de N-protection (par exemple sous la forme de dérivé t-butoxycarbonyle), formation d'un ester benzylique par O-alkylation du carboxylate et phosphorylation de la fonction OH afin
20 d'introduire un groupe phosphate protégé. Les groupes protecteurs typiques des phosphates peuvent être des groupes phényle, benzyle ou o-xyle. Le phényle est le groupe actuellement préféré. La fonction amine est ensuite libérée par élimination du groupe protecteur (par exemple par traitement du dérivé t-butoxycarbonyle avec de l'acide trifluoroacétique), puis acylée avec un dérivé activé d'un acide gras, de préférence un dérivé de l'acide 3-hydroxytétradécanoïque tel que l'acide 3-
25 dodécanoyloxytétradécanoïque. La forme activée peut être un chlorure d'acyle, un ester activé, un anhydride mixte ou tout autre espèce permettant la formation de la liaison amide. L'ester benzylique est ensuite éliminé par hydrogénolyse sélective pour donner un acide carboxylique portant un groupe acylamido en position α et un groupe $(RO)_2P(O)O-$ en position ω .

30

Le partenaire de la réaction de couplage peptidique est obtenu de préférence à partir d'un α,ω -diaminoacide tel que l'ornithine ou la lysine par une séquence de réactions de protection sélective de la fonction amine en position ω , par exemple sous la forme

de dérivé benzyloxycarbonyle, par l'intermédiaire d'un complexe de cuivre selon une méthode décrite dans [Organic Preparations and Procedures International (1992), 23, 191-194], élimination du complexe de cuivre et protection de la fonction amine en position α , par exemple sous forme de dérivé t-butoxycarbonyle. D'autres
5 groupes protecteurs peuvent être utilisés. La fonction carboxylique libre est réduite en alcool primaire en utilisant par exemple le complexe borane-dimethylsulfure ou par le traitement d'un anhydride mixte préformé par le borohydrure de sodium, selon une méthode décrite dans [Tetrahedron Letters (1991), 32, 923-92]. La fonction amine en position α est libérée (par exemple par traitement avec l'acide
10 trifluoroacétique), puis N-acylée avec un dérivé activé d'un acide gras, de préférence un dérivé de l'acide 3-hydroxytétradécanoïque tel que l'acide 3-benzyloxytétradécanoïque. Si nécessaire, la fonction OH libre est protégée à ce stade, par exemple sous forme d'éther de benzyloxyméthyle. La fonction ω -amino est libérée par traitement avec un réactif compatible avec les autres groupes
15 protecteurs présents, par exemple par hydrogénolyse sélective dans un solvant hydroxylique contenant de la triéthylamine si le groupe protecteur est un benzyloxycarbonyle.

Dans la méthode de synthèse actuellement préférée, l'amine ainsi obtenue est
20 couplée avec l'acide carboxylique α -acylaminé ω -phosphorylé préparé comme décrit plus haut en présence de IIDQ ou d'un autre réactif de couplage peptidique, pour donner un pseudodipeptide phosphorylé protégé. Ce produit est O-acylé sur la fonction hydroxyle restée libre avec un acide ω -fonctionnalisés tel que l'acide 6-hepténoïque en présence de EDCI ou d'un autre agent d'esterification. (Figure 4). La
25 fonction alcényle de cet ester est soumis à une réaction de dihydroxylation en présence de tétroxyde d'osmium en quantité catalytique ou stoechiométrique, puis les groupes protecteurs du phosphate et de la fonction hydroxyle éventuellement présente sous forme d'éther de benzyle, sont éliminés par hydrogénolyse en présence d'un catalyseur approprié. Dans la dernière étape, le diol vicinal est soumis
30 à une oxydation périodique pour exposer une fonction aldéhyde.

Alternativement, le produit de couplage peptidique est O-acylé avec un dérivé d'un acide ω -aminoalkanoïque, tel que l'acide 6-benzyloxycarbonylaminohexanoïque

(Figure 10). Le produit ainsi obtenu est soumis à une réaction de déprotection complète par hydrogénolyse en présence de catalyseurs appropriés ce qui fournit un pseudodipeptide portant un auxiliaire aminoalkanoyle.

- 5 Dans une seconde méthode préférée, le partenaire acide de la réaction de couplage peptidique est dérivé de l'acide aspartique ou éventuellement de l'acide glutamique (Figure 2). Le dérivé de l'acide aspartique est obtenu par N-acylation de la fonction amine du β -benzyl ester de cet acide aminé avec un acide gras, préférablement un dérivé d'un acide gras 3-hydroxylé tel que l'acide 3-dodécanoyloxytétradécanoïque,
- 10 en présence d'un agent d'acylation. Ce produit est couplé avec l'amino alcool du type décrit ci-dessus, puis le pseudodipeptide ainsi obtenu est soumis à une réaction d'hydrogénolyse en présence de charbon palladié ou un autre catalyseur pour donner le pseudodipeptide portant une fonction acide carboxylique.
- 15 Alternativement, la fonction hydroxyle du pseudodipeptide obtenu dans le paragraphe précédent est acylée avec un acide ω -fonctionnalisé. Préférablement, cet acide est un acide ω -alcénoïque ou un acide ω -aminoalkanoïque. Avec l'acide hepténoïque (Figure 7), le pseudodipeptide conduit au dérivé O-hepténoyle qui est soumis successivement aux réactions de dihydroxylation en présence de tétr oxyde
- 20 d'osmium, puis de déprotection et d'oxydation périodique.

Dans une troisième méthode préférée, l'amino alcool obtenu à partir de l'ornithine ou de la lysine comme décrit plus haut, est alkylé avec un triflate d' ω -alcényle, préférablement le triflate de hept-6-ényle (Figure 14). Le couplage de cette amino

25 alcool portant une amine secondaire avec l'acide α -acylaminé ω -phosphorylé décrit plus haut en présence de EDCI ou d'un autre agent d'acylation fournit un ester. Le groupe alcényle est ensuite soumis à une réaction de dihydroxylation en présence de tétr oxyde d'osmium, puis les groupes protecteurs sont éliminés par hydrogénolyse en présence de catalyseurs appropriés, et la fonction diol vicinal

30 oxydée par le periodate de sodium pour exposer une fonction aldéhyde réactive.

Dans une quatrième méthode préférée (Figure 16), un dérivé N-protégé de la serine, par exemple le dérivé p-methoxybenzyloxycarbonyle préparé selon une méthode

décrite dans [Synthesis (1989), 36-37], est O-alkylé avec le bromoacétate de benzyle. Le groupe protecteur de la fonction amine est éliminé, par exemple par traitement avec de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane, et la fonction amine est N-acylée, préférablement avec un dérivé d'un acide gras 3-hydroxylé tel que l'acide 3-dodécanoyloxytétradécanoïque, en présence d'un agent d'acylation ou en utilisant le chlorure d'acide ou toute autre forme activée de l'acide gras. Le dérivé N-acylé O-alkylé de la serine ainsi obtenu est couplé avec l'amino alcool décrit plus haut (Figure 1) en présence d'un agent de couplage peptidique tel que le IIDQ, puis la fonction OH libre est acylée avec un acide alcanoïque ω -fonctionnalisé en présence d'un réactif comme un carbodiimide. Préférablement, cet acide fonctionnalisé est un acide ω -alcénoïque ou un dérivé d'un acide ω -aminoalkanoïque. Par exemple, avec l'acide hept-6-énoïque, le pseudodipeptide conduit au dérivé O-(6-hepténoyle) qui est soumis successivement aux réactions de dihydroxylation en présence de tétraoxyde d'osmium, puis de déprotection par hydrogénolyse et d'oxydation périodique.

Dans une cinquième méthode actuellement préférée, l'acide aminé de départ est la cystéine ou l'homocystéine (Figure 17). Par exemple, la cystéine est S-alkylée avec le bromoacétate de p-méthoxybenzyle, puis N-acylée, préférablement avec un dérivé d'un acide gras 3-hydroxylé tel que l'acide 3-tétradécanoyloxytétradécanoïque, en présence d'un agent d'acylation ou en utilisant le chlorure d'acide ou toute autre forme activée de l'acide gras. Le dérivé S-alkylé et N-acylé de la cystéine ainsi obtenu est couplé avec le 5-amino-2-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentan-1-ol en présence de IIDQ ou d'un autre agent de couplage peptidique. La fonction libre OH primaire est ensuite O-acylée avec un acide alcanoïque ω -fonctionnalisé, utilisé sous la forme d'un ester activé comme un ester O-benzotriazolyle. Préférablement, cet acide est un acide ω -aminoalkanoïque tel que l'acide 7-(p-méthoxybenzyloxycarbonylamino)heptanoïque. Le produit ainsi obtenu est soumis à une réaction de déprotection complète en milieu acide aqueux ce qui fournit un pseudodipeptide portant un auxiliaire 7-aminoheptanyle.

Dans un autre méthode préférée (Figure 18), le dérivé N-p-méthoxybenzyloxycarbonyle de la serine est O-alkylé avec le méthylènemalonate de dibenzyle en milieu alcalin. Le groupe protecteur de l'amine est éliminé par traitement avec un acide, puis la fonction amine ainsi libérée est N-acylée,

préférentiellement avec un dérivé d'un acide gras 3-hydroxylé tel que l'acide 3-dodécanoyloxytétradécanoïque, en présence d'un agent d'acylation ou en utilisant le chlorure d'acide ou toute autre forme activée de l'acide gras. Le dérivé N-acylé O-alkylé de la serine ainsi obtenu est couplé avec l'amino alcool décrit plus haut (Figure 1) en présence de IIDQ ou de tout autre agent de couplage peptidique. Le pseudodipeptide est ensuite O-acylé sur la fonction OH libre avec un acide alkanoïque ω -fonctionnalisé. Préférentiellement, cet acide est un acide ω -alcénoïque ou un dérivé d'un acide ω -aminoalkanoïque. Par exemple, avec l'acide hept-6-énoïque, le pseudodipeptide conduit au dérivé O-(6-hepténoyle) qui est soumis successivement aux réactions de dihydroxylation en présence de tétraoxyde d'osmium, puis de déprotection par hydrogénéolyse et d'oxydation périodique, pour conduire au dérivé portant un auxiliaire 6-oxohexanoyle et un groupe malonyle.

Dans une méthode alternative également préférée (Figure 19), le dérivé 6-aminohexanoyle décrit plus haut (Figure 10) est N-acylé avec un groupe bromoacétamido en utilisant par exemple l'ester O-succinimidyl de l'acide bromoacétique comme agent d'acylation. Cette réaction fournit un dérivé portant un auxiliaire 6-(bromoacétamido)hexanoyle.

Dans une huitième méthode préférée (Figure 20), l'ester benzylique de l'homoserine O-phosphorylée (voir Figure 1) est N-acylé avec l'acide 3-benzyloxytétradécanoïque, préférentiellement en utilisant l'anhydride mixte préparé à partir de l'acide 3-benzyloxytétradécanoïque et du chloroformiate d'isobutyle. L'ester de benzyle est ensuite hydrogénéolysé de façon sélective comme décrit plus haut. Le dérivé ω -N-benzyloxy-carbonyle du diamino alcool dérivé de l'ornithine (voir Figure 1) est N_{α} -acylé avec l'acide 3-dodécanoyloxytétradécanoïque, en présence d'un agent de couplage ou en utilisant un ester activé ou une autre forme activée de l'acide gras, et la fonction ω -amino est libérée par hydrogénéolyse sélective. Cette amine est couplée avec le dérivé N-(3-benzyloxytétradécanoyl) O-(diphényl-oxyphosphoryl) de l'homosérine en présence de IIDQ ou d'un autre agent de couplage peptidique. Le pseudodipeptide ainsi obtenu est O-acylé avec un acide alkanoïque ω -fonctionnalisé par exemple en présence d'un carbodiimide. Préférentiellement, cet acide est un acide ω -alcénoïque ou un dérivé d'un acide ω -aminoalkanoïque. Par exemple, avec l'acide hept-6-énoïque, le pseudodipeptide conduit au dérivé O-(6-hepténoyle) qui est soumis successivement aux réactions de dihydroxylation en présence de tétraoxyde

d'osmium, puis de déprotection par hydrogénolyse en présence de catalyseurs appropriés et d'oxydation periodique, pour conduire au dérivé portant un auxiliaire 6-oxohexanoyle.

- 5 L'invention concerne encore les produits intermédiaires de formule générale V, VI, IX, XIII, sous forme énantiomériquement pure ou sous forme de mélange de stéréoisomères.

10 L'invention concerne encore les compositions pharmaceutiques renfermant à titre de principe actif au moins un composé de formule générale I, sous forme neutre ou chargée, en association ou en mélange avec un excipient ou un véhicule inerte, non toxique, pharmaceutiquement acceptable.

15 L'invention concerne plus particulièrement les compositions pharmaceutiques renfermant à titre de principe actif au moins un sel d'un composé de formule générale I, avec une base minérale ou organique thérapeutiquement compatible.

20 L'invention concerne encore les compositions pharmaceutiques à base d'un composé de formule générale I, sous forme énantiomériquement pure ou sous forme de mélange de stéréoisomères, en association ou en mélange avec un excipient ou un véhicule pharmaceutique.

25 Parmi les formes pharmaceutiques envisagées on pourra citer celles qui conviennent pour la voie digestive, parentérale, par inhalation, topique, transdermique ou permuqueuse comme par exemple les comprimés, les dragées, les gélules, les solutés ou suspensions injectables, les aérosols, les gels, les emplâtres ou les solutés pénétrants.

30 De préférence les composés selon l'invention peuvent être greffés sur un antigène pour moduler la réponse immunitaire ou être également greffés sur un pharmacophore pour améliorer son action thérapeutique ou son ciblage et être utilisés par la voie injectable sous forme de conjugués sous forme de solutions ou de

suspensions aqueuses, éventuellement neutralisées par une amine ou une hydroxyalkylamine.

Les exemples suivants, présentés dans les Figures 1 à 56, illustrent l'invention sans
5 toutefois la limiter.

EXEMPLE 1**PREPARATION DES INTERMEDIAIRES DE SYNTHÈSE**

1.1. **1-(Diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétra-**
décanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-
5 **décan-10-ol (Figure 1).**

1.1.1. Acide 4-(diphényloxyphosphoryloxy)-2-[(R)-3-dodécanoyloxytétra-
décanoylamino] butanoïque

a. N - Terbutyloxycarbonyl-DL-homosérine

10 A une solution de bromohydrate d'homosérine (2 g ; 16.78 mmol) dans H₂O (20 ml) sont additionnés une solution de NaOH 1M (16.78 ml) puis du carbonate de césium (3.01 mg ; 9.23 mmol). Après 5 minutes d'agitation, la solution est refroidie dans un bain d'eau et de glace. Sont alors ajoutés du dioxane (60 ml) et du pyrocarbonate de
15 terbutyle. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation dans un bain d'eau glacée pendant 1 heure puis à température ambiante pendant 5 heures. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu sec est employé directement pour l'étape suivante.

b. N - Terbutyloxycarbonyl-DL-homosérinate de benzyle

20 Au résidu obtenu ci-dessus est ajouté diméthylformamide (20 ml) et on effectue une évaporation à siccité. Sont ensuite ajoutés au mélange réactionnel du diméthylformamide (60 ml) et du bromure de benzyle (4.5 ml ; 20.13 mmol). Il se forme alors un précipité blanc. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 16
25 heures. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu est épuisé avec de l'acétate d'éthyle (2x20 ml). La phase organique est lavée avec H₂O (20 ml) puis avec une solution saline (20 ml). Après séchage sur MgSO₄, le solvant est évaporé et le résidu est utilisé tel quel pour l'étape suivante.

c. N - Terbutyloxycarbonyl-O-(diphényloxyphosphoryl)-DL-homosérinate de benzyle

A une solution du résidu sec de l'étape précédente dans CH₂Cl₂ (60 ml) est ajouté le 4-(N,N-Diméthylamino)pyridine (DMAP) (4.11 g ; 33.56 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 10 minutes. Sont alors ajoutés la pyridine (12 ml) et le chlorophosphate de diphényle (6.95 ml ; 33.56 mmol). La solution est agitée à température ambiante pendant 18 heures puis lavée avec HCl 1N (5 X 20 ml), H₂O (30 ml) puis avec une solution saline (30 ml). La phase organique est séchée sur MgSO₄, le solvant est évaporé sous vide. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution hexane/acétate d'éthyle 4/1) permet de recueillir le produit phosphorylé (7.49 g ; 82.4%) sous forme d'un solide cristallin. PF: 63.5-64.0 °C.

d. O-(Diphényloxyphosphoryl)-DL-homosérinate de benzyle, sel trifluoroacétique.

Une solution du produit phosphorylé de l'étape précédente (7.88 g ; 15.4 mmol) dans l'acide trifluoroacétique (15 ml) est agitée à température ambiante pendant 2.5 heures. Le solvant est évaporé sous vide poussé et une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution MeOH/CH₂Cl₂ 10/1) permet de recueillir le sel trifluoroacétique de l'amine déprotégée (7.17 g ; 88.9%) sous forme d'un solide cristallin. PF = 73.0-73.5°C.

e. 2-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-(diphényloxyphosphoryloxy)-butanoate de benzyle

Une solution de l'acide (R)-3-dodécanoyloxytétradécanoïque (4.284 g ; 10.07 mmol ; 1éq) obtenu selon la méthode décrite dans [Bull. Chem. Soc. Jpn 60 (1987), 2205-2214], dans du THF (30 ml) est préparée et est refroidie jusqu'à -15°C . Sont alors ajoutés la N-méthylmorpholine (1.108 ml ; 10.07 mmol ; 1éq) et le chloroformiate d'isobutyle (1.31 ml ; 10.07 mmol ; 1éq). Le mélange réactionnel est agité pendant 30 minutes à -15°C. Est ensuite ajoutée une solution de O-(diphényloxyphosphoryl)-DL-homosérinate de benzyle (5.724 g, 10.07 mmol ; 1éq) dans un mélange THF/Et₃N (30 ml/5 ml). Après agitation pendant 18 heures à température ambiante, le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est dilué avec H₂O (20 ml) et est extrait avec de l'acétate d'éthyle (2 x 30 ml). Les phases organiques sont combinées, lavées successivement avec de l'eau (20 ml) et avec de la saumure (20 ml), puis

séchées sur $MgSO_4$ avant d'être évaporées. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution hexane/acétate d'éthyle 2/1) permet de recueillir l'ester benzylique attendu (7.455 g ; 87%) sous forme d'un solide cristallin. PF = 31.0° - 32.1°C. 1H -RMN ($CDCl_3$, 250 MHz), δ en ppm : 7.4-7.1 (m, 15H) ; 6.90 (2d, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, NH) ; 5.3-5.1 (m, 3H) ; 4.7 (m, 1H) ; 4.35 (m, 2H) ; 2.45 (m, 2H) ; 2.4-2.1 (m, 4H) ; 1.6 (m, 4H) ; 1.4-1.1 (m, 34H) ; 0.9 (t, 6H). ^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 63 MHz), δ en ppm : 173.01 ; 171.08 ; 169.66 ; 150.18 (d, $^2J_{P,C}=7.1$ Hz) ; 135.01 ; 129.60 ; 128.33 ; 128.14 ; 127.96 ; 125.21 ; 119.80 (d, $^3J_{P,C}=5.0$ Hz) ; 70.69 ; 67.05 ; 65.19 (d, $^2J_{P,C}=5.6$ Hz) ; 49.13 ; 40.97 ; 40.77 (2 diast.) ; 34.20 ; 33.98 ; 33.82 ; 31.70 ; 29.42 ; 29.34 ; 29.14 ; 28.94 ; 25.01 ; 24.77 ; 22.47 ; 13.91.

f. Acide 4-(diphényloxyphosphoryloxy)-2-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]butanoïque

Une solution de l'ester benzylique obtenu précédemment (2.23 g ; 2.6 mmol) dans du MeOH qualité HPLC (300 ml), dans un ballon à trois tubulures, est hydrogénée en présence de 10% Pd sur charbon (1 g) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 1 heure. Le catalyseur est éliminé par filtration, et le filtrat est évaporé pour fournir un sirop incolore. Celui-ci est homogène en chromatographie sur couche mince et en RMN, et a été utilisé directement sans purification supplémentaire pour l'étape de couplage; $R_f = 0.75$ ($CH_2Cl_2/MeOH/Et_3N$ 10/1/0.5). 1H -RMN ($CDCl_3$, 250 MHz), δ en ppm : 7.4-7.1 (m, 10H) ; 6.85 (d, 1H, NH) ; 5.15 (m, 1H) ; 4.6 (m, 1H) ; 4.35 (m, 2H) ; 2.45 (m, 2H) ; 2.4-2.15 (m, 4H) ; 1.6 (m, 4H) ; 1.4-1.1 (m, 34H) ; 0.9 (t, 6H). ^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 63 MHz), δ en ppm: 173.35 ; 173.30 (2 diast.) ; 172.75 ; 170.37 ; 150.0 (d, $^2J_{P,C}=7.5$ Hz) ; 129.55 ; 125.28 ; 119.71 (d, $^3J_{P,C}=4.4$ Hz) ; 70.78 ; 65.65 (d, $^2J_{P,C}=5.9$ Hz) ; 49.00 ; 40.77 ; 40.63 (2 diast.) ; 34.13 ; 33.86 ; 33.76 ; 31.59 ; 29.31 ; 29.25 ; 29.03 ; 28.82 ; 24.88 ; 24.68 ; 22.36 ; 13.76.

1.1.2. (2R)-5-Amino-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-pentan-1-ol

30

a. Sel de cuivre de la D-ornithine

A une solution de D-ornithine (5,25 g ; 30 mmol) dans du NaOH 1N (30 ml), est ajoutée une solution de sulfate cuivrique pentahydraté (3.814 g ; 15.3 mmol) dans

H₂O (50 ml). Après 2 heures d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé à siccité. Du méthanol (60 ml) est alors additionné au résidu pour former un solide de couleur pourpre qui est séparé, puis lavé successivement au dioxane et au méthanol pour être utilisé directement dans l'étape suivante

5

b. (2R)-2-Amino-5-(benzyloxycarbonylamino)-pentanoate de cuivre

Le solide pourpre est dissout dans un mélange de NaOH 1N (40 ml) et de dioxane (70 ml). Le mélange réactionnel est refroidie dans un bain d'eau glacée et on ajoute ensuite le chloroformiate de benzyle (5.14 ml ; 36 mmol). Après 3 heures d'agitation dans un bain d'eau glacée, puis 15 heures à température ambiante, le précipité pourpre est récupéré par filtration puis lavé successivement avec EtOH à 95 % (40 ml), H₂O (50 ml) et EtOH (60 ml). Le précipité est séché à l'étuve (T < 45° C, sous vide); le rendement en deux étapes est de 8.27 g, soit 93 % par rapport à la théorie (Référence : Organic Preparations and procedures international 23 (1992) 191-194).

15

c. Acide (2R)-5-(benzyloxycarbonylamino)-2-(terbutyloxycarbonylamino)pentanoïque

Le sel de cuivre obtenu précédemment est dissout dans une solution de HCl 2N (400 ml), puis est ajouté l'acide éthylènediaminotétraacétique (EDTA) (8.15 g ; 27.8 mmol). Après 2.5 heures d'agitation, le pH est neutralisé à 7 en ajoutant du NaOH 5N (environ 160 ml). Il se forme un précipité blanc. Le mélange est alors agité pendant 2 heures 30 dans un bain d'eau glacée. Le précipité est filtré, lavé à l'eau froide jusqu'à ce que l'effluent soit incolore, puis séché à l'étuve en dessous de 60°. Ce solide est dissout dans du NaOH 1N (156 ml) et la solution refroidie au bain d'eau glacée. Est ensuite ajouté à cette solution du pyrocarbonate de terbutyle (7.7g ; 35.2 mmol) dans le dioxane (160 ml). Le mélange réactionnel est agité à 0° C pendant 45 minutes puis pendant 16 heures à température ambiante. Le solvant organique est évaporé et le résidu est dissout dans de l'acétate d'éthyle (70 ml). La phase aqueuse est ensuite acidifiée par addition d'HCl 2N jusqu'à pH ~3, lavée avec AcOEt (100 ml). Les phases organiques sont combinées et lavées avec H₂O (30 ml) et avec une solution saline (30 ml), puis évaporées sous vide. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH₂Cl₂/MeOH 20/1) permet de recueillir le produit attendu sous forme d'une huile incolore (Rdt : 8.42g en deux étapes soit 76.7 % de la théorie) (R_f = 0.19 CH₂Cl₂/MeOH 20/1).

30

d. (2R)-5-(Benzyloxycarbonylamino)-2-(terbutyloxycarbonylamino)pentan-1-ol

A une solution froide (-15° C) du dérivé de l'acide diamino pentanoïque obtenu ci-dessus, (5.45 g ; 14.8 mmol) dans du THF (60 ml), sont ajoutés la N-méthylmorpholine (1.65 ml ; 14.8 mmol) et le chloroformiate d'isobutyle (9.6ml ; 14.8 mmol). Le mélange réactionnel est agité à -15°C pendant 1 minute puis est ajoutée une solution de borohydrure de sodium (5.1 g ; 44.6 mmol) dans 10 ml d'eau. Après une agitation à -15° C pendant 10 minutes H₂O (400 ml) est additionnée au mélange pour arrêter la réaction. La solution est ensuite lavée avec AcOEt (100 ml X 2). Les phases organiques sont combinées et lavées avec H₂O (50 ml), une solution saline (60 ml), puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé et le résidu est cristallisé dans un mélange AcOEt/hexane pour conduire au produit cristallin attendu (4.94 g ; 94.9 %). PF = 47.5 - 48° C.

15 e. (2R)-5-(Benzyloxycarbonylamino)-2-amino-pentan-1-ol, sel trifluoroacétique

Une solution du (2R)-5-(benzyloxycarbonylamino)-2-(terbutyloxycarbonylamino)-pentan-1-ol obtenu ci-dessus (6.32 g ; 18 mmol) dans l'acide trifluoroacétique (25 ml) est préparée puis agitée pendant 2.5 heures à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé et une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution MeOH/CH₂Cl₂ 10/1) permet de recueillir le sel trifluoroacétique sous forme d'une huile (5.45 g ; 82.7 %). Le chlorhydrate fond à 133.0 - 134.3° C (recristallisation du méthanol).

25 f. (2R)-5-(Benzyloxycarbonylamino)-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol

A une solution refroidie à -15° C d'acide (R)-3-benzyloxytétradécanoïque (5.27 g ; 15.8 mmol) [Bull. Chem. Soc. Jpn, 60 (1987), 2197-2204] dans le THF (30 ml), sont ajoutés la N-méthylmorpholine (1.89 ml ; 15.8 mmol) et le chloroformiate d'isobutyle (2.21 ml ; 15.8 mmol). Après agitation à -15° C pendant 30 minutes, est additionnée une solution du sel trifluoroacétique obtenu précédemment (15.25 g ; 14.4 mmol) dans un mélange THF/Et₃N (30 ml/1.44 ml). L'agitation est poursuivie à température ambiante pendant 16 heures puis le mélange réactionnel est dilué avec H₂O (30 ml) et AcOEt (60 ml). La phase organique est séparée et la phase aqueuse lavée avec

AcOEt (60 ml). Les phases organiques sont combinées et lavées avec H₂O (30 ml) et avec une solution saline (30 ml) puis séchées sur MgSO₄ avant d'être évaporées sous vide. Le résidu est recristallisé dans un mélange AcOEt/hexane pour fournir le produit attendu sous forme cristalline (5.8 g ; 71.2 %). PF = 117.5° - 118° C. Rf = 0.32, AcOEt/éther de pétrole 3/1. ¹H-RMN (CDCl₃, 250 MHz), δ en ppm : 7.4-7.2 (m, 10H) ; 6.5 (d, 1H, NH) ; 5.1 (s, 2H) ; 4.9 (m, 1H, NH) ; 4.5 (2d, AB, 2H) ; 3.8 (m, 2H) ; 3.5 (m, 2H) ; 3.1 (m, 2H) ; 2.4 (m, 2H) ; 1.6-1.4 (m, 6H) ; 1.4-1.2 (m, 18H) ; 0.9 (t, 3H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz), δ en ppm : 172.24 ; 156.49 ; 138.06 ; 136.53 ; 128.46 ; 128.04 ; 127.87 ; 76.76 ; 71.39 ; 66.60 ; 65.44 ; 51.54 ; 41.43 ; 40.65 ; 33.76 ; 31.87 ; 29.61 ; 29.30 ; 28.01 ; 26.47 ; 25.05 ; 22.65 ; 14.09.

g. (2R)-5-Amino-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol

Dans un ballon à trois tubulures, le catalyseur (Pd/C 20 %, 150 mg) est ajouté à la solution de (2R)-5-(benzyloxycarbonylamino)-2-[(R)-3-benzyloxy-tétradécanoylamino] pentan-1-ol (3.0 g ; 5.27 mmol) dans un mélange EtOH qualité HPLC/Et₃N (300 ml/6 ml). On a chassé l'air par mise sous vide puis le ballon a été chargé d'hydrogène. Le mélange réactionnel est ainsi hydrogéné pendant 2 heures à température ambiante. Le catalyseur est éliminé par filtration et le filtrat est concentré pour fournir le produit attendu sous forme d'un solide blanc. Rf = 0.2 ; CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N 5/1/0.5. PF = 47 - 48°C.

¹H-RMN (CDCl₃, 250 MHz), δ en ppm: 7.4-7.2 (m, 5H) ; 6.75 (d, 1H, NH) ; 4.5 (2d, AB, 2H) ; 3.9 (m, 2H) ; 3.5 (m, 2H) ; 2.3 - 2.6 (m, 7H) ; 1.7-1.2 (m, 24H) ; 0.9 (t, 3H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz), δ en ppm: 171.86 ; 138.13 ; 128.37 ; 127.87 ; 127.75 ; 76.81 ; 71.50 ; 64.57 ; 51.38 ; 41.51 ; 41.17 ; 33.89 ; 31.82 ; 29.26 ; 28.57 ; 28.03 ; 25.07 ; 22.60 ; 14.04.

1.1.3. 1-(Diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétra-décanoylamino]-décan-10-ol

IIDQ (2-isobutoxy-1-isobutoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoléine) (364 mg ; 1.2 mmol ; 1.2éq) est additionné à une solution d'acide (2RS)-4-(diphényloxyphosphoryloxy)-2-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]butanoïque (850 mg ; 1.0 mmol ; 1 éq) dans du CH₂Cl₂ anhydre (20 ml) à température ambiante et sous argon. Le mélange

réactionnel est agité 15 minutes puis une solution de (2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxy-tétradécanoylamino]pentan-1-ol (757 mg ; 1.0 mmol, 1éq) dans du CH₂Cl₂ anhydre (10 ml) est additionnée. Après 4 heures d'agitation, la solution est évaporée à sec. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH₂Cl₂/Acétone 5/2) permet de recueillir le pseudopeptide phosphorylé (620 mg ; 53%) sous forme d'un solide amorphe (R_f = 0.49, dans CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N 10/1/0.5). ¹H-RMN (CDCl₃, 250 MHz), δ en ppm: 7.40-7.15 (m, 15H), 7.00 (m, 1H), 6.90 et 6.80 (2d, 2 diast, 1H), 6.65 (d, 1H) (3 x NH), 5.15 (m, 1H), 4.50 (m, 3H), 4.30 (m, 2H), 3.85 (m, 2H), 3.45 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 2.41-2.14 (m, 8H), 1.6-1.4 (m, 8H), 1.4-1.1 (m, 54H), 0.9 (t, 9H, 3CH₃). ¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz), δ en ppm : 173.11, 171.68, 170.52 (2 diast.), 169.94 (2 diast.), 150.0 (d, ²J_{P,C}=7.2 Hz), 138.20 (2diast.), 129.58, 127.99, 127.49, 127.26, 125.24, 119.73 (t, ³J_{P,C}: 5.0 Hz), 76.48, 71.12, 70.71, 65.86 (élargi), 64.22, 50.96, 49.71 (élargi), 41.46, 41.05, 39.07, 34.13, 34.00, 32.70, 31.61, 29.34, 29.06, 28.87, 27.98, 25.25 24.92, 24.72, 22.38, 13.80.

1.2 Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétra-decanoylamino] pentyl]amide (=OM-197-MC) (Figure 2)

5 1.2.1. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, β -benzyl ester

A une solution d'acide (R)-3-dodécanoyloxytétradécanoïque (3.35 g ; 7.85 mmol) dans du THF anhydre (25 ml) à -15°C et sous argon sont ajoutés successivement la
10 N-méthylmorpholine (0.86 ml ; 7.85 mmol ; 1éq) et l'isobutyl chloroformate (1.02 ml ; 7.85 mmol ; 1éq). On observe rapidement un précipité de chlorhydrate de N-méthylmorpholine. Après 30 minutes d'agitation à -15°C, une solution de H-D-Asp(OBn)-OH commercial (Senn Chemicals AG, CH-Dielsdorf) (1.75g ; 7.85 mmol ; 1éq) dans un mélange CH₃CN/H₂O 3.5/1 (85 ml) contenant Et₃N (3.7 ml) est alors
15 ajoutée. Le mélange réactionnel est ensuite agité une nuit à température ambiante. Le solvant organique est ensuite évaporé puis la phase aqueuse refroidie à 0°C, acidifiée avec une solution aqueuse d'acide citrique à 10% jusqu'à pH=3 et extraite avec AcOEt (2x). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution éther de
20 pétrole/AcOEt 2/1 contenant 2% d'acide acétique) suivi d'une coévaporation au toluène permet de recueillir le β -benzyl ester de l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, (4.00g ; 81%) sous forme d'un solide cristallin blanc (R_f=0.42 dans éther de pétrole/EtOAc 1/1 contenant 2% d'acide acétique ; révélateurs U.V. et phosphomolybdique). PF= 67-69°C.

25

1.2.2. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino] pentyl]amide β -benzyl ester

30 IIDQ (2-isobutoxy-1-isobutoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline) (1.5 g ; 4.99 mmol ; 1.2 éq) est additionné à une solution du β -benzyl ester obtenu ci-dessus (2.63 g ; 4.16 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (200 ml) à température ambiante et sous argon. Le mélange réactionnel est agité 15 minutes puis une solution de (2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxy-tétradécanoylamino]pentan-1-ol (Figure 1) (2.0 g ; 4.58 mmol ; 1.1 éq)

dans du CH₂Cl₂ anhydre (85 ml) est additionnée. Après 3 heures d'agitation, la solution est évaporée à sec. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH₂Cl₂/ Acétone 4/1 puis CH₂Cl₂/ Acétone 2/1) permet de recueillir le produit de couplage (3.75g ; 86%) sous forme d'un solide cristallin blanc (Rf=0.27 dans CH₂Cl₂/ Acétone 5/1 ; révélateurs U.V. et phosphomolybdique). PF = 106-108°C ; [α]_D +5° (c = 1.14 ; CHCl₃) ; ¹³C-RMN (62.89 MHz, CDCl₃), δ en ppm : 173.66 ; 172.09 ; 171.73 ; 170.33 ; 170.12 ; 138.23 ; 135.28 ; 128.53 ; 128.37 ; 128.13 ; 127.81 ; 127.71 ; 125.81 ; 76.71 ; 71.40 ; 71.16 ; 66.77 ; 65.01 ; 51.36 ; 49.39 ; 41.66 ; 39.25 ; 34.40 ; 33.98 ; 31.85 ; 29.58 ; 29.47 ; 29.29 ; 29.11 ; 28.00 ; 25.57 ; 25.17 ; 25.08 ; 24.94 ; 22.62 ; 14.05.

1.2.3. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide (=OM-197-MC)

15

Une solution du β-benzyl ester de l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino] pentyl]amide (417 mg ; 0.40 mmol) dans un mélange MeOH/EtOAc 1/1 (36 ml) est hydrogénée en présence de 10% Pd sur charbon (20 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 3 heures. Le catalyseur est éliminé par filtration, lavé avec un mélange CH₂Cl₂/MeOH 4/1 (50 ml) et le filtrat évaporé à sec puis séché à la pompe à palettes pour donner l'acide libre (345 mg ; 100%) sous forme d'un solide cristallin blanc (Rf=0.30 dans CH₂Cl₂/ MeOH 9/1 contenant 0.5% d'acide acétique; révélateur phosphomolybdique). PF = 135-137°C. ES/MS: m/z 868.7 [M+H]⁺, 890.7 [M+Na]⁺, 868.7 [M+K]⁺, 912.7 [M-H+2Na]⁺ (Figure 3).

30

EXEMPLE 2**PREPARATION DES PSEUDODIPEPTIDES PORTEURS D'UN BRAS AUXILIAIRE FONCTIONNALISE**

2.1. **3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-
5 hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogéné-
phosphate 10-(6-oxohexanoate) (=OM-197-FV7) (Figure 4)**

2.1.1. 1-(Diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétra-
10 décanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-
décan-10-ol (6-hepténoate)

A une solution de 1-(diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétra-
décanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-10-ol (Figure 1)
(875 mg ; 0.74 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (25 ml), est ajouté l'acide 6-
15 hepténoïque (141 µl ; 1.04 mmol ; 1.4éq). La solution est refroidie à 0°C. Sont
ensuite ajoutés le EDCI (64 mg ; 0.33 mmol ; 1.4éq) et la DMAP (41 mg ; 0.33
mmol ; 0.14 éq). Le mélange réactionnel est agité 30 minutes à 0°C, puis 3 heures à
température ambiante. Après une dilution au CH₂Cl₂, la phase organique est lavée
successivement avec H₂O, une solution de HCl 1N et H₂O. La phase organique est
20 ensuite séchée sur MgSO₄, puis évaporée à 40°C sous vide. Une purification par
chromatographie Flash sur gel de silice (élution éther de pétrole/AcOEt 1/1) permet
de recueillir le 1-(diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl-
amino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-10-ol 6-hepténoate (820
mg, 85%) sous forme d'une mousse blanche (Rf= 0.18 dans éther de pétrole/AcOEt
25 1/1; révélateur phosphomolybdique). ¹³C-RMN (62.89 MHz, CDCl₃), δ en ppm:
173.30 ; 171.18 ; 170.42 ; 169.91 ; 169.73 ; 150.10 ; 138.21 ; 138.14 ; 129.77 ;
128.25 ; 127.49 ; 125.44 ; 119.88 ; 114.56 ; 76.48 ; 71.11 ; 70.90 ; 66.01 ; 65.52 ;
49.90 ; 47.80 ; 41.34 ; 39.07 ; 33.92 ; 33.76 ; 33.69 ; 33.61 ; 33.17 ; 31.75 ; 29.47 ;
29.19 ; 29.00 ; 28.46 ; 28.11 ; 25.34 ; 25.05 ; 24.85 ; 22.52 ; 13.96.

2.1.2. 1-(Diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétra-
décanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-10-ol
(6,7-dihydroxyheptanoate)

5 A une solution contenant $K_3Fe(CN)_6$ (373 mg ; 1.13 mmol ; 3 éq), K_2CO_3 (157 mg ; 1.13 mmol ; 3 éq), et 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) (10.7 mg ; 0.095 mmol ; 0.25 éq) dans un mélange t-butanol/eau (5 ml/5 ml) est ajoutée le composé obtenu ci-dessus (486 mg, 0.38 mmol), puis le tétroxyde d'osmium en solution dans le t-butanol à 2.5% (48 μ l ; 4.75 μ mol ; 0.0125 éq). Le milieu réactionnel est
10 vigoureusement agité pendant 16 heures à température ambiante (27°C). Du $Na_2S_2O_5$ (60 mg) est additionné et l'agitation est poursuivie pendant environ 1 heure jusqu'à ce que le milieu devienne brun puis vert ou bleuâtre. Le mélange réactionnel est dilué à l'éther et la phase organique est séparée. La phase aqueuse est abondamment lavée à l'éther et les phases organiques sont rassemblées, séchées
15 sur $MgSO_4$, puis évaporées à 40°C sous vide. Le diol attendu brut est ainsi obtenu sous forme d'une huile verte. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH_2Cl_2 /Acétone 5/2) permet de recueillir le 1-(diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-10-ol 6,7- dihydroxyheptanoate pur (198 mg ; 40%)
20 sous forme d'un solide amorphe (R_f = 0.24 dans CH_2Cl_2 /Acétone 5/2 ; révélateur phosphomolybdique). ^{13}C -RMN (62.89 MHz, $CDCl_3$), δ en ppm : 173.46 ; 173.33 ; 171.34 ; 170.58 ; 170.02 ; 150.13 ; 138.23 ; 129.80 ; 128.26 ; 127.87 ; 127.54 ; 125.50 ; 120.01 ; 119.80 ; 71.79 ; 71.23 ; 70.97 ; 66.63 ; 66.03 ; 65.54 ; 49.93 ; 47.90 ; 41.46 ; 39.17 ; 33.98 ; 33.79 ; 32.86 ; 32.45 ; 31.77 ; 29.49 ; 29.21 ; 29.03 ;
25 28.51 ; 25.50 ; 25.07 ; 24.87 ; 24.77 ; 24.66 ; 22.54 ; 13.99. HPLC (210 nm) : T_R = 32.535 min. ES/MS: m/z 1343.0 ($M+Na^+$) ; 1321.0 ($M+H^+$) ; 1071.0 ($M+H^+$ monophenyl phosphate).

2.1.3. 1-(Diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétra-
30 décanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-10-ol
(6,7-dihydroxyheptanoate)

Une solution du diol obtenu ci-dessus (198 mg ; 0.15 mmol) dans un mélange EtOH qualité HPLC (20 ml) / AcOEt (1.4 ml) est hydrogénée en présence de 10% Pd sur charbon (70 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 2.5 heures. Le catalyseur est éliminé par filtration. Le filtrat est évaporé à sec puis le résidu est séché à la pompe à palettes pour obtenir le produit débenzylé brut (168 mg ; 91%) sous forme d'un solide amorphe. ¹³C-RMN (62.89 MHz, CDCl₃), δ en ppm : 173.15 ; 173.51 ; 172.82 ; 171.04 ; 170.49 ; 170.35 ; 150.05 ; 129.79 ; 129.42 ; 125.53 ; 119.91 ; 119.83 ; 119.72 ; 71.80 ; 70.93 ; 68.58 ; 66.47 ; 65.94 ; 65.52 ; 50.02 ; 48.12 ; 42.59 ; 41.26 ; 39.13 ; 36.92 ; 34.29 ; 33.85 ; 32.32 ; 31.74 ; 29.50 ; 29.18 ; 29.00 ; 28.15 ; 25.47 ; 25.07 ; 24.85 ; 24.73 ; 24.56 ; 22.51 ; 13.99. HPLC (210 nm) : T_R = 30.7 min. ES/MS: *m/z* 1253.0 [M+Na]⁺ ; 1231.0 [M+H]⁺.

2.1.4. 3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol-1-dihydrogénophosphate 10-(6,7-dihydroxyheptanoate) (=OM-197-FV6)

A une suspension d'oxyde de platine PtO₂ (91 mg) dans l'éthanol (qualité HPLC) (1 ml) (préalablement activé en noir de platine sous atmosphère d'hydrogène pendant 10 minutes) est additionnée une solution du triol obtenu ci-dessus (168 mg ; 0,14 mmol) dans un mélange EtOH qualité HPLC (8 ml) / AcOEt (8 ml). La solution est hydrogénée à température ambiante (27°C), sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 24 heures. Le catalyseur est éliminé par filtration. Le filtrat est évaporé à sec puis le résidu est séché à la pompe à palettes pour obtenir le phosphate brut (130 mg, 88%). HPLC (210 nm): T_R = 23.6 min. ES/MS: *m/z* 1078.9 [M+H]⁺, 1100.8 [M+Na]⁺, 1116.8 [M+K]⁺ (Figure 5).

2.1.5. 3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-(6-oxohexanoate) (=OM-197-FV7)

Une réaction d'oxydation periodique est réalisée avec en ajoutant 1.86 ml NaIO₄ 0.1M (39.62 mg , 20 éq.) à 10 mg (9.28 μmol, 1 éq.) du triol déprotégé préparé ci-

dessus dans un mélange isopropanol-eau (1:1). La réaction est suivie par LC/UV et montre une conversion quantitative de la fonction diol en aldéhyde, après deux heures. L'ion moléculaire m/z 1046.8 observé sur le spectre ES/MS après l'étape d'oxydation périodique (Figure 6) atteste de la réaction attendue. Sur ce spectre, des adducts de sodium à m/z 1068.8 ($[M+Na]^+$) et de potassium à m/z 1084.8 ($[M+K]^+$) sont visibles, ainsi qu'un fragment correspondant à la perte du groupe phosphoryle à m/z 948.8. La réaction est stoppée par l'adjonction de 1-2 gouttes d'éthylène glycol.

10 **2.2. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétra-decanoylamino]pentyl]amide 5-O-(6-oxohexanoate) (=OM-197-MC-FV6) (Figure 7)**

15 2.2.1. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide- β -benzyl ester, 5-O-(6-hepténoate)

A une solution de l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide β -benzyl ester (Figure 2) (122 mg ; 0.116 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (5ml), est ajouté l'acide 6-hepténoïque (22 μ l ; 0.160 mmol ; 1.4 éq). La solution est refroidie à 0°C. Sont ensuite ajoutés le EDCI (49.3 mg ; 0.25 mmol ; 2.1 éq) et la DMAP (5.6 mg ; 0.046 mmol ; 0.4 éq). Le mélange réactionnel est agité 30 minutes à 0°C, puis 6 heures à température ambiante. Après une dilution au CH₂Cl₂, la phase organique est lavée successivement avec H₂O, HCl 1N (2x), NaHCO₃ (2x) et H₂O (2x). L'ester hepténoïque attendu est ainsi obtenu pur (119 mg ; 89%) sous forme d'un solide blanc (R_f = 0.62 dans CH₂Cl₂/Acétone 5/1 ; révélateur phosphomolybdique). ¹³C-RMN (62.89 MHz, CDCl₃), δ en ppm : 173.63 ; 173.38 ; 171.72 ; 171.11 ; 170.08 ; 138.14 ; 135.28 ; 128.46 ; 128.34 ; 128.24 ; 128.05 ; 127.64 ; 127.53 ; 114.62 ; 76.49 ; 71.14 ; 71.02 ; 66.66 ; 65.49 ; 49.17 ; 47.79 ; 41.69 ; 41.35 ; 39.09 ; 35.46 ; 34.33 ; 33.80 ; 33.65 ; 33.21 ; 31.79 ; 29.52 ; 29.23 ; 29.06 ; 28.46 ; 28.16 ; 22.56 ;

14.00. HPLC (210 nm): $T_R = 36.9$ min. ES/MS: m/z 1159.0 $[M+H]^+$; 1176.0 $[M+NH_4]^+$. PF = 81.5 - 84°C. $[\alpha]_D^{20} = +7.3$ (CHCl₃).

2.2.2. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α -N-
5 {(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl}amide β -
benzyl ester, 5-O-(6,7-dihydroxyheptanoate)

A une solution de l'ester hepténoïque obtenu ci-dessus (60 mg ; 0.052 mmol) dans un mélange H₂O/Acétone (5/3 ml) sont ajoutés l'oxide de N-méthylmorpholine (9
10 mg ; 0.076 mmol ; 1.5 éq), puis la solution d'OsO₄ dans le t-butanol à 2.5% (123 μ l ; 0.012 mmol ; 0.23 éq) goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité pendant 24 heures à température ambiante. Du Na₂S₂O₅ (20 mg) est ajouté à la réaction qui est alors agitée pendant 1h à 2h à température ambiante. La solution est alors extraite à l'éther plusieurs fois, puis les phases organiques sont rassemblées, séchées sur
15 MgSO₄ et concentrées. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH₂Cl₂/Acétone 5/2) permet de recueillir le diol attendu pur (35 mg ; 57%) sous forme d'un solide blanc ($R_f = 0.15$ dans CH₂Cl₂/Acétone 5/1 ; révélateur phosphomolybdique). ¹³C-RMN (62.89 MHz, CDCl₃), δ en ppm : 173.67 ; 173.39 ; 171.81 ; 171.34 ; 170.27 ; 170.01 ; 138.18 ; 135.27 ; 128.56 ; 128.42 ; 128.18 ;
20 127.50 ; 127.68 ; 76.68 ; 71.82 ; 71.37 ; 71.17 ; 66.85 ; 66.74 ; 65.66 ; 49.27 ; 47.99 ; 41.88 ; 41.51 ; 39.31 ; 35.60 ; 34.42 ; 33.95 ; 33.51 ; 31.80 ; 29.60 ; 29.49 ; 29.30 ; 28.55 ; 25.65 ; 25.60 ; 25.19 ; 25.12 ; 24.97 ; 24.77 ; 24.14 ; 22.65 ; 14.08. HPLC (210 nm) : $T_R = 34.16$ min. ES/MS: m/z 1193.0 $[M+H]^+$; 1212.0 $[M+NH_4]^+$.

25 2.2.3. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α -N-
{(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl}amide- β -
benzyl ester, 5-O-(6, 7-dihydroxyheptanoate) (=OM-197-MC-FV5)

Une solution du diol obtenu ci-dessus (35 mg ; 0,029 mmol) dans un mélange MeOH
30 qualité HPLC (2 ml) / AcOEt (2 ml) est hydrogénée en présence de 10% Pd sur charbon (10 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 2,5 heures. Le catalyseur est éliminé par filtration. Le filtrat est évaporé à sec puis le résidu est séché à la pompe à palettes pour obtenir l'acide N-

[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide 5-O-(6,7-dihydroxyheptanoate) brut (26 mg ; 88%) sous forme d'un solide blanc. HPLC (210 nm) : $T_R = 26.90$ min PF = 94-97°C. $[\alpha]_D^{20} = +11.1$ (CHCl₃/MeOH = 1:0.1). ES/MS: m/z 1012.7 [M+H]⁺ ; 1034.7 [M+Na]⁺, 1050.7 [M+K]⁺ (Figure 8).

2.2.4. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide 5-O-(6-oxohexanoate) (=OM-197-MC-FV6)

1.98 ml NaIO₄ 0.1M (42.25 mg , 20 éq.) sont ajoutés à 10 mg (9.88 μ mol, 1 éq.) du triol déprotégé préparé ci-dessus dans un mélange isopropanol-eau (1:1). La solution est agitée pendant deux heures à température ambiante. La réaction est stoppée par l'adjonction de 1-2 gouttes d'éthylène glycol. Après cette étape d'oxydation periodique, un ion moléculaire [M+H]⁺ à m/z 980.6 est observé sur le spectre ES/MS (Figure 9), attestant de la présence d'une fonction aldéhyde. Les pics correspondants aux adducts de sodium à m/z 1002.8 ([M+Na]⁺) et de potassium à m/z 1018.6 ([M+K]⁺) sont également visibles.

2.3. ***3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétra-décanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogéné-phosphate (6-aminohexanoate) (=OM-287-AC5) (Figure 10)***

2.3.1. 1-(Diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-décan-10-ol (6-benzyloxycarbonylaminohexanoate)

A une solution de 1-(diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-10-décan-10-ol (Figure 1) (230 mg ; 0.20 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (8 ml), est ajouté l'acide 6-

benzyloxycarbonylaminohexanoïque (88 mg ; 0.33 mmol ; 1.65 éq). La solution est refroidie à 0°C. Sont ensuite ajoutés le EDCI (200 mg, 1.04 mmol, 5.2 éq) et la DMAP (13 mg ; 0.10 mmol ; 0.5 éq). Le mélange réactionnel est agité 30 minutes à 0°C, puis 4 heures à température ambiante. Après une dilution au CH₂Cl₂, la phase organique est séparée et lavée successivement avec H₂O, HCl 1N, H₂O. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄, puis évaporée à 40°C sous vide. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH₂Cl₂/Acétone 7/1.2 permet de recueillir l'ester pur (115 mg ; 41%) sous forme d'un solide amorphe (R_f = 0.77 dans CH₂Cl₂/Acétone 5/2 ; révélateur phosphomolybdique). ¹³C-RMN (62.89 MHz, CDCl₃), δ en ppm : 173.27 ; 171.20 ; 170.34 ; 169.88 ; 156.36 ; 150.16 ; 150.13 ; 138.28 ; 136.56 ; 129.80 ; 128.35 ; 128.26 ; 127.90 ; 127.51 ; 125.45 ; 119.97 ; 119.83 ; 71.05 ; 66.37 ; 65.97 ; 65.61 ; 49.94 ; 47.81 ; 41.39 ; 40.66 ; 39.09 ; 34.32 ; 34.25 ; 33.95 ; 33.65 ; 31.78 ; 29.50 ; 29.38 ; 29.22 ; 29.03 ; 28.55 ; 28.44 ; 25.95 ; 25.06 ; 24.87 ; 24.26 ; 22.55 ; 14.00. HPLC (210 nm) : T_R = 33.497 min. ES/MS : m/z 1424.0 [M+H]⁺ ; 1174.0 [M+H-(PhO)₂OPOH]⁺.

2.3.2. 1-(Diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décane-10-ol 10-(6-aminohexanoate)

Une solution du produit obtenu ci-dessus (115 mg ; 81 μmol) dans un mélange EtOH qualité HPLC (15 ml)/acide acétique glacial (0,4 ml) est hydrogénée en présence de palladium (10% sur charbon) (80 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 4 heures. Le catalyseur est éliminé par filtration. Le filtrat est évaporé à sec puis le résidu est séché à la pompe à palettes pour obtenir le produit débenzylé (90 mg ; 97%) sous forme d'un solide amorphe. HPLC (210 nm) : T_R = 29.185 min. ES/MS : m/z 1200.0 [M+H]⁺ ; 952.0 [M+H-(PhO)₂OPOH]⁺.

2.3.3. 3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-1,10-diol-1-dihydrogénophosphate 10-(6-aminohexanoate). (=OM-287-AC5)

5 A une solution d'oxyde de platine PtO₂ (30 mg) dans l'éthanol (qualité HPLC) (1 ml) (préalablement activé en noir de platine sous atmosphère d'hydrogène pendant 10 minutes) est additionnée une solution de l'amino-alcool obtenu ci-dessus (90 mg, 75 μmol) dans un mélange mélange EtOH qualité HPLC (5 ml)/HCl 1N (0.1 ml). La solution est hydrogénée à température ambiante, sous pression atmosphérique
10 d'hydrogène pendant 24 heures. Le catalyseur est éliminé par filtration. Le filtrat est évaporé à sec puis le résidu est séché à la pompe à palettes pour obtenir l'amino phosphate attendu (60 mg ; 79%). HPLC (210 nm): T_R = 28.51 min. ES/MS: m/z 1047.5 [M+H]⁺; 1069.6 (M+Na⁺), 949.6 [M+H-(HO)₂OPOH]⁺ (Figure 11).

15

2.4. 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-(6-hydroxyhexanoate) (=OM-197-FV8) (Figure 12)

20 2.4.1. (2R)-5-(Amino)-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-pentan-1-ol benzyloxymethyl ether

A une solution de (2R)-5-(benzyloxycarbonylamino)-2-[(R)-3-benzyloxy-tétradécanoylamino]pentan-1-ol (Figure 1)) (2.05 g ; 3.60 mmol) dans du CH₂Cl₂
25 anhydre (40 ml) à température ambiante et sous argon sont ajoutés successivement BOMCl (benzyl chlorométhyl éther) (qualité technique 60%, 1.25 ml ; 5.41 mmol ; 1.5éq) et la diisopropyléthylamine (942 μl ; 5.41 mmol ; 1.5 éq). Le mélange réactionnel est ensuite agité une nuit à température ambiante puis évaporé à sec. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution éther de pétrole/
30 EtOAc 2/1) permet de recueillir le dérivé O-benzyloxyméthyl (2.28 g ; 92%) sous forme d'un solide cristallin blanc. (R_f=0.70 dans éther de pétrole/EtOAc 1/3; révélateur U.V. et phosphomolybdique). PF= 97-100°C. Une solution de ce produit (2.00 g ; 2.90 mmol) dans EtOH de qualité HPLC (220 ml) contenant Et₃N (4 ml) est

hydrogénée en présence de 20% Pd(OH)₂ sur charbon (200 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 3 heures. Le catalyseur est éliminé par filtration. Le filtrat est évaporé à sec puis le résidu est séché à la pompe à palettes pour obtenir l'amine libre (1.58 g ; 98%) sous forme

5 d'un solide amorphe. $[\alpha]_D^{-1}$ (C=1.20 ; CHCl₃) ; ¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃), δ en ppm : 7.45-7.21 (m, 10H, Ar), 6.52 (d, 1H, NH), 4.80-4.45 (m, 6H, 2 x CH₂-ph, O-CH₂-O), 4.10 (m, 1H, H-3'), 3.83 (m, 1H, H-2), 3.62 (dd, 1H, H-1), 3.47 (dd, 1H, H-1), 2.65 (t, 2H, 2 x H-5), 2.40 (m, 2H, 2 x H-2'), 1.80-1.40 (m, 8H, 2 x H-4, 2 x H-3, 2 x H-4', NH₂), 1.40-1.20 (m, 18H, 9 x CH₂), 0.88 (t, 3H, CH₃) ; ¹³C-RMN (62.89 MHz, CDCl₃), δ en ppm : 170.78 ; 138.24 ; 137.63 ; 128.38 ; 128.32 ; 127.66 ; 127.62 ; 94.82 ; 76.70 ; 71.26 ; 69.63 ; 69.44 ; 48.48 ; 41.82 ; 41.47 ; 33.83 ; 31.84 ; 29.88 ; 29.58 ; 29.56 ; 29.51 ; 29.27 ; 29.04 ; 25.11 ; 22.62 ; 14.06.

15 2.4.2. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-L-aspartique, α -N-[(4R)-5-(benzyloxymethoxy)-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-pentyl]amide β -benzyl ester

L'amine préparée comme décrit ci-dessus est couplée avec le β -benzyl ester de

20 l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-L-aspartique (préparé à partir du β -benzyl ester de l'acide L-aspartique, voir section 1.2.1) en présence de IIDQ dans les mêmes conditions que celles décrites dans la section 1.2.2. La purification du produit sur gel de silice (éther de pétrole/EtOAc 2:1 puis 1:1) permet de recueillir l'amide correspondante avec un rendement de 65%. ES/SM: m/z 1169.7 ([M+H]⁺).

25

2.4.3 (3S, 9R)-3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-décane-1,10-diol 1-dibenzylophosphate

30 Une solution du produit de couplage obtenu ci-dessus (1.05 g ; 0.90 mmol) dans un mélange EtOH/EtOAc 1/1 (65 ml) contenant Et₃N (1.5 ml) est hydrogénée en présence de 10% Pd sur charbon (50 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 1 heure. Le catalyseur est éliminé par filtration

et le filtrat évaporé à sec puis séché à la pompe à palettes. Le résidu est ensuite mis en solution dans un mélange *i*-PrOH/CH₂Cl₂ 1/1 (50 ml) et agité pendant 10 minutes à température ambiante avec une résine Amberlite IR-120 (H⁺) (3 ml). La résine est éliminée par filtration et le filtrat évaporé à sec pour donner l'acide libre (956 mg ; 5 99%) sous forme d'un solide cristallin blanc.

A une solution de l'acide obtenu ci-dessus (855 mg ; 0.79 mmol) dans du THF anhydre (5 ml) à 0°C et sous argon sont additionnés la *N*-méthylmorpholine (87 µl ; 0.79 mmol ; 1 éq) puis l'isobutyl chloroformate (103 µl ; 0.79 mmol ; 1 éq). On observe rapidement un précipité de chlorhydrate de *N*-méthylmorpholine. Après 30 10 minutes d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est porté à 0°C puis une solution de NaBH₄ (60 mg ; 1.58 mmol ; 2 éq) dans H₂O (2 ml) est rapidement additionnée. Dès la fin du dégagement gazeux (5 minutes), la solution est diluée avec H₂O (2 ml) et THF (2 ml) puis agitée 5 minutes à température ambiante. La solution est concentrée, diluée avec du CH₂Cl₂ et H₂O, neutralisée 15 avec une solution de HCl 1M puis les phases séparées. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH₂Cl₂/ Acétone 4/1) permet de recueillir le produit de réduction (387 mg ; 46%) sous forme d'un solide cristallin blanc.

A une solution de cet alcool (313 mg ; 0.29 mmol) et de 1*H*-tétrazole (62 mg ; 0.88 20 mmol ; 3 éq) dans du THF anhydre (12 ml) à température ambiante et sous argon est additionné le dibenzyl-diéthyl phosphoramidite à 85% (267 µl ; 0.67 mmol ; 2.3 éq). On observe rapidement la formation de cristaux blancs dans le milieu réactionnel. Après 30 minutes d'agitation, le mélange réactionnel est porté à -20°C puis une solution de *m*CPBA (57-86% ; 187 mg ; 1,08 mmol ; 3.7 éq) dans du CH₂Cl₂ 25 (8 ml) est additionnée. On observe la disparition des cristaux. Après 45 minutes d'agitation à température ambiante, une solution de Na₂S₂O₃ saturée (5 ml) est ajoutée puis le mélange réactionnel est agité 10 minutes. La solution est ensuite diluée à l'éther, puis la phase organique est séparée et lavée avec une solution de Na₂S₂O₃ saturée (5x), une solution de NaHCO₃ saturée (2x) et une solution de HCl 30 1M (1x). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH₂Cl₂/ acétone 8/1 puis 5/1) permet de recueillir le phosphotriester (361 mg ; 93%) sous forme d'un solide amorphe.

Ce produit est soumis à une réaction d'hydrolyse de l'acétal benzyloxyméthyl en milieu THF-HCl aqueux ce qui fournit le (3S, 9R)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-décane-1,10-diol 1-dibenzylphosphate.

5

2.4.4 (3S,9R)-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décane-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-(6,7-dihydroxyheptanoate)

10 Le produit obtenu ci-dessus est O-acylé en position 10 avec de l'acide hept-6-énoïque en présence de EDCI dans le dichlorométhane à 0°C en présence de DMAP (voir section 2.2.1). Cet ester hepténoïque est ensuite soumis à une réaction d'hydroxylation en présence de tétraoxyde d'osmium (catalytique) et d'oxyde de N-méthylmorpholine (voir section 2.2.2), ce qui fournit le diol correspondant (ester 6,7-
15 dihydroxyheptanoïque). Ce produit est déprotégé par hydrogénolyse dans l'éthanol sous pression atmosphérique d'hydrogène en présence de charbon palladié (voir section 2.2.3).

2.4.5. (3S,9R)-3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décane-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-(6-oxohexanoate)

20

Le diol déprotégé obtenu ci-dessus est soumis à une réaction d'oxydation périodique dans un mélange isopropanol-eau (voir section 2.2.4).

25

2.4.6 (3S,9R)-3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décane-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-(6-hydroxyhexanoate) (=OM-197-FV8)

30 Le dérivé 6-oxohexanoïque obtenu ci-dessus est soumis à un bref traitement avec NaBH₄ dans un mélange isopropanol-eau à 0°C, pour donner le dérivé 6-hydroxyhexanoïque. ES/MS: *m/z* 1048.5 [M+H]⁺; 950.5 [M+H-(HO)₂OPOH]⁺ (Figure 13).

2.5. 2-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-(diphényloxy-phosphoryloxy)butanoate de {2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-5-(6-oxohexyl)amino}pentyle (=OM-144-FP9) (Figure 14)

5

2.5.1. Trifluorométhanesulfonate de hept-6-ényle

L'anhydride triflique Tf_2O ($(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{O}$, 11 ml ; 6.76 mmol) est ajouté goutte à goutte à -15°C à une solution de hept-6-èn-1-ol (515 mg ; 4.51 mmol) et de Et_3N (627 μl ; 4.51 mmol) dans le CH_2Cl_2 (10 ml) et le mélange est agité 30-45 minutes à -15°C jusqu'à disparition de l'alcool. Après retour à température ambiante, le milieu est dilué au CH_2Cl_2 et lavé successivement avec H_2O , avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 , une solution aqueuse saturée de NaCl . La phase organique ainsi obtenue est séchée sur MgSO_4 et concentrée sous vide pour conduire à un résidu qui est repris dans un mélange ethyl acetate/ether de pétrole (1/2) et filtré sur gel de silice (élimination des sels de triéthylamine formés lors de la réaction). Après évaporation du filtrat, le triflate attendu est obtenu avec un rendement de 87% (956 mg) et est utilisé dans l'étape suivante sans autre purification. Rf: 0.8 dans acetate d'éthyle/ether de pétrole, 1/2. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 250 MHz); δ en ppm: 5.7 ; 5.0 ; 4.45 ; 2.0 ; 1.8 ; 1.4. $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 62.89 MHz); δ en ppm : 138.21 ; 114.95 ; 77.68 ; 33.40 ; 29.13 ; 28.10 ; 24.53.

15

20

2.5.2. 2(2R)-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-5-(hept-6-ényl)amino-pentan-1-ol

25

30

Une solution du triflate fraîchement préparé ci-dessus (956 mg, 3.88 mmol), dans du CH_2Cl_2 (10 ml) est additionnée goutte à goutte à une solution de (2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol (Figure 1) (1.69 g ; 3.88 mmol) dans du CH_2Cl_2 (10 ml) et le mélange est agité 4 heures à température ambiante sous argon. Après dilution au CH_2Cl_2 , le milieu réactionnel est lavé avec une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 puis avec H_2O . La phase organique ainsi obtenue est séchée sur MgSO_4 et concentrée sous vide. Une purification par chromatographie

Flash sur gel de silice (élution avec CH₂Cl₂/MeOH 15/1) permet de recueillir l'amine secondaire attendue (862 mg ; 43%). R_f : 0,3 (CH₂Cl₂/MeOH 8/1). ES/MS : *m/z* 532.0 [M+H]⁺. RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz); δ en ppm : 7.2-7.4 ; 7.1 ; 5.8 ; 5.0 ; 4.6 ; 3.95 ; 3.5 ; 2.9 ; 2.5 ; 2.1 ; 1.9-1.5 ; 1.5-1.2 ; 0.9. RMN ¹³C (CDCl₃, 62.89 MHz); δ en ppm : 172.17 ; 138.28 ; 138.21 ; 128.39 ; 127.96 ; 127.71 ; 114.82 ; 76.80 ; 71.40 ; 63.81 ; 50.87 ; 48.30 ; 47.75 ; 41.57 ; 34.10 ; 33.39 ; 31.89 ; 29.66 ; 29.62 ; 29.33 ; 28.19 ; 28.03 ; 25.21 ; 26.11 ; 25.78 ; 22.82 ; 22.66 ; 14.10. RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz); δ en ppm : 7.2-7.4 ; 6.75 ; 5.8 ; 5.0 ; 4.5 ; 3.9 ; 3.5 ; 2.5 ; 2.0 ; 2.1 ; 1.7-1.2 ; 0.9. RMN ¹³C (CDCl₃, 62.89 MHz); δ en ppm : 171.77 ; 138.68 ; 138.14 ; 128.23 ; 127.72 ; 127.56 ; 114.22 ; 76.64 ; 71.37 ; 64.58 ; 51.45 ; 49.79 ; 49.37 ; 41.53 ; 33.90 ; 33.53 ; 31.77 ; 29.65 ; 29.20 ; 28.64 ; 28.57 ; 25.00 ; 26.68 ; 25.93 ; 22.53 ; 13.98 (spectres du sel d'ammonium et de la base libre, respectivement).

2.5.3. 2-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-(diphényloxyphosphoryloxy)butanoate de {2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-5-(hept-6-ényl)amino}pentyle

A une solution de l'amine secondaire obtenue ci-dessus (163 mg ; 0.307 mmol ; 1 éq) et d'acide 4-(diphényloxyphosphoryloxy)-2-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]butanoïque (Figure 1) (278 mg ; 0.368 mmol ; 1.2 éq) dans du CH₂Cl₂ (25 ml) est ajouté la N,N-diisopropyléthylamine (DIEA) (54 µl ; 1 éq). Le milieu est refroidi à 0°C et on ajoute ensuite de l'EDCI (71 mg ; 1.2 éq) et du 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) (41 mg ; 1 éq). Le mélange réactionnel est agité 2 heures à 0°C puis 90 heures à température ambiante. La solution est alors lavée avec H₂O et la phase organique est séchée sur MgSO₄ puis évaporée sous vide à 40°C. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH₂Cl₂/MeOH 15/1) permet de recueillir le produit de O-acylation (126 mg ; 32%).

2.5.4. 2-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-(diphényloxyphosphoryloxy)butanoate de {2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-5-(6,7-dihydroxyheptyl)amino}pentyle

5 Une solution fraîchement préparée d'OsO₄ à 2.5% dans la pyridine (1.1 ml ; 1.9 éq) est ajoutée goutte à goutte à 25°C à une solution du produit de O-acylation obtenu ci-dessus (70 mg ; 0.055 mmol) dans de la pyridine anhydre (5 ml). Le mélange est agité de 24 à 48 heures à température ambiante puis est traité par addition de Na₂S₂O₅ et enfin dilué au CH₂Cl₂, lavé successivement avec H₂O, avec une solution
10 aqueuse HCl 1N et à nouveau avec H₂O. La phase organique résultante est séchée sur MgSO₄, filtrée, évaporée et le résidu obtenu est soumis à une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH₂Cl₂/MeOH 15/1 à 10/1) qui permet de recueillir le diol attendu (27 mg ; 38%). HPLC (210 nm) : T_R = 37.25 min. ES/MS : m/z 1307.0 [M+H]⁺.

15

2.5.5. 2-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-(dihydroxyphosphoryloxy)butanoate de {2-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-5-(6,7-dihydroxyheptyl)amino}pentyle (=OM-144-FP8)

20 a. Débenzylation

A une solution du diol obtenu ci-dessus (50 mg, 0.038 mmol) dans un mélange MeOH qualité HPLC/AcOH (5/0.2 ml) est ajouté le catalyseur (Pd/C 10%) (10 mg). Le mélange réactionnel est agité 4 heures sous H₂ (pression atmosphérique) à température ambiante. Le catalyseur est éliminé par filtration sur filtre millipores et le
25 filtrat évaporé pour conduire, sans autre purification, au produit débenzylé (46 mg ; 99%). HPLC (210 nm) : T_R = 35.13 et 35.51 min (observation des deux diastéréoisomères). ES/MS : m/z 1217.0 [M+H]⁺.

b. Déphénylation :

30 Le catalyseur (PtO₂) (25 mg ; 3.8 éq) en suspension dans EtOH qualité HPLC (0.5 ml) est préactivé sous H₂ pendant 10 minutes. Une solution, préalablement dégazée sous argon, du produit débenzylé obtenu ci-dessus (35 mg, 0.029 mmol) dans EtOH qualité HPLC (2 ml) est ajoutée à la suspension de catalyseur. Le mélange

réactionnel est alors agité pendant 2 heures sous H₂ à température ambiante. Le catalyseur est filtré sur filtre millipores et le filtrat évaporé pour conduire, sans autre purification, à l'ester phosphate attendu (26 mg, 87%). HPLC (210 nm) : T_R = 29.3 et 30.9 min (observation des deux diastéréoisomères). ES/MS : *m/z* 1064.8 [M+H]⁺,
5 1086.8 [M+Na]⁺, 1108.8 [M-H+2Na]⁺ (Figure 15).

2.5.6. 2-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-(dihydroxy-phosphoryloxy) butanoate de {2-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-5-(6-oxohexyl)amino} pentyle (=OM-144-FP9)

10

1.87 ml NaIO₄ 0.1M (40.17 mg , 20 éq.) sont ajoutés à 10 mg (9.39 μmol, 1 éq.) du produit déprotégé préparé ci-dessus dans un mélange isopropanol-eau (1:1). La solution est agitée pendant deux heures à température ambiante. La réaction est stoppée par l'adjonction de 1-2 gouttes d'éthylène glycol. T_R = 30.0 et 31.5 min
15 (observation de deux diastéréoisomères). ES/MS : *m/z* 1032.8 [M+H]⁺, 1054.8 [M+Na]⁺.

2.6. ***(2R, 8R)-2-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-nonane-1,9-diol 1-O-carboxyméthyl éther 9-O-(6-oxohexanoate) (=OM-112-FV7) (Figure 16)***

20

La D-serine est protégée sous forme de dérivé N-(p-methoxybenzyloxycarbonyl) [Ref: Chen et Wang, Synthesis (1989), 36-37], puis la fonction OH alkylée avec le bromoacétate de benzyle en présence de NaH (2 equiv.). La fonction amine est
25 libérée par traitement avec de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane, puis acylée avec le chlorure de l'acide (R)-3-dodécanoyloxytétradécanoïque en présence de triéthylamine. Le dérivé de la serine ainsi obtenu est couplé avec l'amine (2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol (voir 4.1.1) en présence de IIDQ pour donner le (2R, 8R)-2-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-3-oxo-4-
30 aza-8-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]nonane-1,9-diol 1-O-benzyloxycarbonylméthyl éther. Ce produit est ensuite O-acylé avec l'acide hept-6-énoïque en présence de EDCI. La double liaison de l'ester auxiliaire est hydroxylée avec le

tétraoxyde d'osmium (catalytique, en présence de N-méthylmorpholine N-oxyde), puis le diol déprotégé par hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon dans l'éthanol. Le produit OM-112-FV-7 est obtenu par traitement avec du periodate de sodium dans un mélange isopropanol-eau. $C_{65}H_{103}N_3O_{12}$. MM: 1010.45.

5

2.7. (2S,8R)-1-(Carboxyméthyl)thio-2-[(R)-3-tétradécanoyloxytétra-décanoylamino]-3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-nonan-9-ol 9-O-(7-amino-heptanoate) (=OM-212-AH1) (Figure 17)

10

La D-cystéine est S-alkylée avec le bromoacétate de p-méthoxybenzyle en présence de carbonate de sodium en milieu THF-eau. La S-benzyloxycarbonylméthyl cystéine ainsi obtenue est N-acylée avec le chlorure de l'acide (R)-3-tétradécanoyloxy-tétradécanoïque, puis le dérivé S-alkylé N-acylé de la D-cystéine est couplé avec l'amine (2R)-5-amino-2-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentan-1-ol {obtenue par hydrogénolyse de la (2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol, voir 4.1.1} en présence de IIDQ. Le produit ainsi obtenu est O-acylé sélectivement en position primaire avec l'ester dérivé de HOBt et de l'acide 7-(p-méthoxybenzyloxy-carbonylamino)heptanoïque. Les deux groupes p-méthoxybenzyle sont ensuite éliminés par traitement de l'ester avec de l'acide trifluoroacétique aqueux. $C_{59}H_{112}N_4O_{10}S$. MM :1069.64.

20

2.8. (2R, 8R)-2-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-nonane-1,9-diol 1-O-(2,2-dicarboxyéthyl) éther 9-O-(6-oxohexanoate) (=OM-312-FV7) (Figure 18)

25

Le dérivé N-(p-méthoxybenzyloxycarbonyl) de la D-serine est O-alkylé avec le méthylènemalonate de dibenzyle en présence de NaH. La fonction amine est libérée par traitement avec de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane, puis acylée avec le chlorure de l'acide (R)-3-dodécanoyloxytétradécanoïque en présence de triéthylamine. Le dérivé de la serine ainsi obtenu est couplé avec l'amine (2R)-5-

30

amino-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol (voir 4.1.1) en présence de IIDQ pour donner le (2R, 8R)-2-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]nonane-1,9-diol 1-O-[2,2-bis-(benzyloxy-carbonyl)ethyl] éther. Ce produit est O-acylé avec l'acide hept-6-énoïque en présence de EDCI, puis l'ester hepténoyle soumis à une hydroxylation avec le tétr oxyde d'osmium. Les groupes benzyles sont éliminés par hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon dans l'éthanol. Le produit OM-312-FV-7 est obtenu par traitement du produit débenzylé avec du periodate de sodium dans un mélange isopropanol-eau. $C_{58}H_{105}N_3O_{14}$. MM: 1068.49.

10

2.9. 3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-1,10-diol-1-dihydrogénophosphate 10-(6-bromoacetamidohexanoate) (=OM-412-BA7) (Figure 19)

15

Le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-1,10-diol-1-dihydrogénophosphate 10-(6-aminohexanoate) (voir 4.2.3.3) est soumis à une réaction de bromoacétylation avec l'ester succinimidyloxy de l'acide bromoacétique dans un milieu eau-DMF en présence de triéthylamine. Le produit final est purifié par HPLC. $C_{57}H_{108}BrN_4O_{13}P$. MM: 1168.4.

20

2.10. (3RS, 9R)-3-[(R)-3-Hydroxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-décane-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-O-(6-oxohexanoate) (OM-512-FV7) (Figure 20)

25

L'acide 2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-4-diphényloxyphosphoryloxy-butanoïque [obtenu par N-acylation du sel trifluoroacétique de l'O-(diphényloxyphosphoryl)-DL-homosérinate de benzyle avec le chlorure de l'acide (R)-3-benzyloxytétradécanoïque, puis coupure de l'ester de benzyle par hydrogénolyse dans l'éthanol en présence de triéthylamine et de charbon palladié] est couplé avec

30

le (2R)-5-amino-2-[(R)-3-dodécanoyl-oxytétradécanoylamino]pentan-1-ol [obtenu par N-acylation du sel trifluoro-acétique du (2R)-5-(benzyloxycarbonylamino)-2-aminopentan-1-ol avec le chlorure de l'acide (R)-3-dodécanoyloxytétradécanoïque, puis déprotection du groupe amino en C-5 par hydrogénolyse dans l'éthanol en présence de triéthylamine et de charbon palladié] en présence de IIDQ. L'amide ainsi formé est O-acylé sur la fonction OH libre avec l'acide 6-hepténoïque en présence de EDCI pour donner l'ester correspondant. La double liaison de l'ester auxiliaire est soumise à une réaction d'hydroxylation avec le tétr oxyde d'osmium ; le groupe benzyle est ensuite éliminé par hydrogénolyse sur charbon palladié et le phosphate libéré par hydrogénolyse sur noir de platine. Le fonction diol est soumise à une réaction d'oxydation periodique pour générer le dérivé 6-oxohexanoyle OM-512-FV7. $C_{55}H_{104}N_3O_{13}P$. MM: 1046.42.

2.11. Purification et analyse des composées selon l'invention

Les produits de synthèse et des pseudopeptidolipides portant un bras auxiliaire fonctionnalisé sont solubilisés dans un mélange eau - isopropanol (1:1 v/v). La quantité nécessaire de bicarbonate d'ammonium 2M est ensuite ajoutée pour atteindre une concentration de 50 mM.

2.11.1. Purification

La purification est effectuée par HPLC préparative en phase inverse dans les conditions suivantes :

Colonne: Bondapack C18 PrepPak, 40 x 200 mm, 15-20 μ m, 300 Å, Waters
Phase mobile: A: isopropanol - eau (9:1, v/v), 50mM bicarbonate d'ammonium
B: isopropanol - eau (2:8, v/v), 50mM bicarbonate d'ammonium
Débit: 40 ml/min

- Elution: Adsorption isocratique sur la colonne : 40% B (60% A), 10 minutes
Gradient A:B : 40 à 80% B en 10 minutes
Elution isocratique 80% B, 30 minutes
- 5 Lavage : 100% B, 10 minutes
- Détection: UV, 210 nm

Au cas où la présence de produits aromatiques serait observée (étape de déprotection incomplète), une purification plus fine doit être effectuée. Cette
10 purification supplémentaire est réalisée dans les conditions suivantes :

- Colonne: Kromasil C18, 21 x 250 mm, 5 μ m, 100 Å, Macherey-Nagel
- Phase mobile: A: isopropanol - eau (9:1, v/v), 50mM bicarbonate d'ammonium
B: isopropanol - eau (2:8, v/v), 50mM bicarbonate d'ammonium
- 15 Débit: 5 ml/min
- Elution: Adsorption isocratique sur la colonne: 40% B (60% A), 10 minutes
Elution isocratique : 84% B, 30 minutes
Lavage : 100% B, 10 minutes
- Détection: UV, 210
- 20 Système : Waters 2000

Les fractions contenant les composés d'intérêt sous forme de sel d'ammonium sont rassemblées et concentrées par adsorption sur phase C18 Bondapack, 15-20 μ m, 300 Å, Waters. Le contre ion peut ensuite être échangé par lavage au moyen d'une
25 solution aqueuse d'un sel de métal alcalin (tel que NaCl ou KCl, par exemple) à 10 g/L dans l'eau - isopropanol (9:1, v/v). Après élimination de l'excédent de sel par passage de 5 volumes d'un mélange eau - isopropanol (9:1, v/v) sur la colonne, le composé est élué avec de l'isopropanol pur.

2.11.2. Suivi de la purification

Après chaque étape, les fractions sont analysées par chromatographie analytique HPLC en phase inverse selon les conditions suivantes :

5

Colonne: Supelcosil C18, 3 μ m, 4.6 x 150mm, 100 Å, Supelco

Phase mobile: A: eau - acétonitrile (1:1, v/v), 5mM TBAP

B: eau - isopropanol (1:9, v/v), 5mM TBAP

TBAP : phosphate de tétrabutylammonium

10 Débit: 1 ml/min

Elution: Gradient A:B (75:25 à 0:100) en 37.5 minutes

Détection: UV, 210 et 254 nm

Chromatographe: Pour ces analyses, différents chromatographes HPLC ont été utilisés (HP1050 Ti series, HP1090 series M, LabChrom-

15

Shimadzu). Les temps de rétention selon le système utilisé peut varier d'environ une minute pour un composé donné.

2.11.3. Dosage et analyse de pureté des produits finaux

20 Le dosage et le contrôle de pureté des produits obtenus sont réalisés par HPLC/UV dans les conditions chromatographiques décrites ci-dessus. Selon ces analyses les puretés obtenues des produits varient entre 97 et 100%. Afin de mettre en évidence la présence d'impuretés inactives en UV, des analyses LC/ES-MS ont été réalisées (ionisation de type *electrospray*, mode positif). Pour satisfaire aux conditions

25 d'ionisation, les conditions chromatographiques suivantes ont été utilisées :

Colonne: Vydac C4, 5 μ m, 4.6 x 150mm, 300 Å

Phase mobile: A: eau - acétonitrile (1:1, v/v), 0.05% TFA

B: eau - isopropanol (1:9, v/v), 0.05% TFA

30 Débit: 1 ml/min

Elution: Gradient A:B (80:20 à 0:100) en 20 minutes

Température : 40°C

2.11.4. Analyses spectroscopiques

Spectrométrie de masse

5 Les spectres ES/MS (modes positif et négatif) ont été mesurés sur des spectromètres de masse de différents types (Finnigan LCQ, ion trap; Micromass Quattro II, triple stage quadrupole; Micromass Z-Bio-Q, triple stage quadrupole). Des analyses complémentaires de type MS/MS ont également été réalisées.

Résonance magnétique nucléaire

10 Les spectres ^1H -RMN et ^{13}C -RMN ont été mesurés sur des appareils de type Bruker DPX à 250.13 et 62.89 MHz.

2.11.5 Détermination de l'endotoxicité

15 L'endotoxicité des différents intermédiaires de synthèse et des pseudopeptidolipides portant un bras auxiliaire fonctionnalisé a été déterminée par le test *Limulus Amoebocyte Lysate* (LAL) chromogénique cinétique (Charles River Endosafe produit R1708K, lot EK2251E).

20 Ce test LAL a été utilisé pour démontrer la faible endotoxicité des produits présentés dans l'invention.

Les résultats sont exprimés en EU (unité d'endotoxine) par rapport à une solution étalon standard internationale (EC-6). Pour cette série de dosage, 1 EU représente environ 0.08 ng de LPS *E. coli* O55 :B5.

Tableau des valeurs LAL obtenues pour les intermédiaires de synthèse et les pseudo-peptidolipides portant un bras auxiliaire fonctionnalisé:

Composés testés	EU/mg	ng. équivalent LPS par mg de produit
OM-197-MC	5.8	0.6
OM-197-FV6	27.3	3.0
OM-197-FV7	33.8	3.8
OM-197-FV8	42.2	4.7
OM-197-MC-FV5	3.6	0.3
OM-287-AC5	34.2	3.8

- 5 Les composés testés présentent une endotoxicité faible (< 0.0005% de celle du LPS de référence). Le greffage de différents bras auxiliaires fonctionnalisés sur la structure des pseudo-peptidolipides ne modifie pas notablement l'endotoxicité de ces produits.

EXEMPLE 3

PREPARATION DES CONJUGUES

3.1. *Conjugués avec le peptide FGFG*

5 Comme le montrent les schémas de synthèses présentés dans les Figures 4, 7, 12, 14, 16, 18 et 20, une réaction de dihydroxylation vicinale est réalisée sur les pseudo-peptidolipides portant un bras auxiliaire de type oléfinique pour conduire à la formation d'une fonction diol stable. Une réaction d'oxydation périodique est ensuite effectuée pour créer une fonction aldéhyde sur le bras auxiliaire. Une réaction
10 d'amination réductrice peut ensuite être réalisée pour coupler, par exemple, un peptide de petite taille tel que FGFG (Phénylalanine-Glycine-Phénylalanine-Glycine, Sigma). Une étape de purification de l'aldéhyde est toutefois préférable.

3.1.1. Purification de l'aldéhyde

15

Afin d'éliminer les sels présents en solution, une purification de l'aldéhyde est réalisée sur phase Bondapack C18 (Waters), 15-20 μm , 300 Å, selon la procédure suivante :

- adsorption de l'échantillon après dissolution dans un mélange isopropanol-eau
20 (1:3)
- élution des sels avec un mélange isopropanol-eau (1:9)
- élution de l'aldéhyde avec un volume minimum d'isopropanol

3.1.2. Couplage par amination réductrice

25

La réaction de couplage par amination réductrice est réalisée en solution aqueuse en respectant une stœchiométrie égale entre les fonctions aldéhyde (bras auxiliaire du pseudo-peptidolipide) et les fonctions amines disponibles sur le peptide ou la protéine à coupler. Dans l'exemple du peptide FGFG, 2 mg d'OM-197-FV7 purifié
30 (1.86 μmol , 1 éq) ont été ajoutés à une solution de 0.8 mg de FGFG (1.86 μmol , 1 éq) dissous dans 1 ml H_2O -MeCN (1:1). La solution est agitée pendant 30 minutes à

température ambiante pour former l'imine. L'étape de réduction est ensuite effectuée par adjonction de 92 µl de NaBH₃CN 1M (5.77 mg, 50 éq) pour former une liaison carbone-azote particulièrement stable (Figure 21). Le conjugué a été purifié dans un premier temps sur colonne Vydac C₄ pour éliminer le peptide n'ayant pas réagi, puis sur phase Bondapack C18 (Waters) pour obtenir le sel de sodium (voir paragraphe : purification et analyse des composés selon l'invention). Le conjugué a ensuite été resolubilisé dans H₂O stérile 0.01% triéthanolamine (TEoA) pour satisfaire aux conditions des tests d'activités biologiques. Le spectre de masse ES/MS enregistré après purification est présenté en Figure 23 et met en évidence un ion moléculaire [M+H]⁺ à *m/z* 1457.4, indiquant le couplage attendu. Les ions visibles entre *m/z* 400 et 900 ont été identifiés par des analyses MS/MS comme étant des fragments provenant du pic moléculaire du peptide conjugué. Les ions correspondant au peptide FGFG initial (*m/z* 427.1 [M+H]⁺, *m/z* 853.0 [2M+H]⁺, Figure 22) n'ont pas été détectés.

15

3.2. Conjugués avec le peptide (NANP)₆P₂P₃₀

Le composé OM-197-FV7 obtenu par le schéma de synthèse présenté en Figure 4 peut être couplé, par exemple, à un peptide d'intérêt pharmaceutique tel que (NANP)₆P₂P₃₀ [Valmori *et al.*, 1992, J. immunol. 149, 717-721], dont la séquence est la suivante :

25

(NANP)₆QYIKANSKFIGITEFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

Le peptide (NANP)₆P₂P₃₀ présente quatre sites de conjugaison possibles (amine terminale + trois lysines). 5 mg d'OM-197-FV7 purifié (4.64 µmol, 4 éq) ont été ajoutés à une solution de 7.49 mg de (NANP)₆P₂P₃₀ (1.16 µmol, 1 éq) dissous dans 1 ml H₂O-isopropanol (1:1) La solution est agitée pendant 30 minutes à température ambiante, puis l'étape de réduction est effectuée en ajoutant 230 µl de NaBH₃CN 1M (14.43 mg, 50 éq).) La solution est agitée pendant deux heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite dialysé contre H₂O pendant 24 heures. (cassette de dialyse 3.5Kd, Slide-A-Lyzer, Pierce). L'analyse LC/ES-MS du

30

mélange réactionnel montre la présence de trois types de molécules, comme le montrent les chromatogrammes présentés en Figure 24: Les pics correspondant au peptide libre (pic A), au peptide monoconjugué (pic B) et au peptide biconjugué (pic C) sont clairement visibles. Les enveloppes ioniques enregistrées pour chacun d'eux
5 sont présentées aux Figures 25, 26 et 27 et attestent d'une conjugaison covalente à une ou deux molécules de OM-197-FV pour le monoconjugué et le biconjugué, respectivement.

Figure 25 : **Peptide (NANP)₆P₂P₃₀ (peptide libre)**. PM: 6451
10 Ions à m/z 1076.2 (A6), 1291.2 (A5), 1613.7 (A4).

Figure 26 : **Monoconjugué OM-197-FV-(NANP)₆P₂P₃₀**. PM: 7481
Ions à m/z 1247.8 (B6), 1497.4 (B5), 1871.2 (B4).

Figure 27 : **Biconjugué (OM-197-FV)₂-(NANP)₆P₂P₃₀**. PM: 8511
15 Ions à m/z 1419.6 (C6), 1703.3 (C5), 2129.1 (C4).

Les transformations de chacun de ces spectres ES/MS, présentées aux Figure 28, 29 et 30 permettent de mieux visualiser la conjugaison réalisée sur le peptide. L'analyse par SDS-PAGE des conjugués OM-197-FV-(NANP)₆P₂P₃₀ a permis de mettre en évidence différentes bandes distinctes correspondant au peptide n'ayant
20 pas réagi, au monoconjugué et au biconjugué. Dans les conditions électrophorétiques utilisées (gradient 10-20% polyacrylamide, tampon tris-tricine, Bio Rad, #161-1108), les standards en présence ont permis d'évaluer à environ mille uma la différence entre les bandes d'intérêts, confirmant le couplage de une ou deux molécules d'OM-197-FV sur le peptide.

25

3.3. **Conjugués avec le peptide P₂P₃₀**

D'autres peptides peuvent également être couplés par amination réductrice aux
30 composés portant un bras auxiliaire de type aldéhyde. On présentera par exemple le couplage d'OM-197-FV7 au peptide P₂P₃₀. Ce dernier correspond à la partie épitope T de la toxine tenanus toxoid et présente la séquence suivante:

KQYIKANSKFIGITEFNNFTVSWFLRVPKVSASHLE

Le peptide P₂P₃₀ présente cinq sites de conjugaison possibles (amine terminale +
5 quatre lysines) et une masse de 4200 uma (spectres ES/MS en Figures 31 et 34).
Cinq équivalents de OM-197-FV7 ont donc été engagés. Les conditions
réactionnelles décrites ci-dessus ont été appliquées. Après dialyse contre H₂O
(cassette de dialyse 3.5Kd, Slide-A-Lyzer, Pierce), les spectres de masse des
conjugés obtenus ont été mesurés par LC/ES-MS et comparés à ceux enregistrés
10 pour le peptide libre. Le spectre ES/MS du monoconjugé OM-197-FV-P₂P₃₀ est
présenté en Figure 32. Les ions multiples chargés m/z 872.8 (A6), 1047.1 (A5),
1308.6 (A4) et 1744.4 (A3) constituent l'enveloppe ionique d'un conjugé de masse
moléculaire de 5230 uma, correspondant au greffage d'une molécule de OM-197-
FV sur une molécule de peptide P₂P₃₀ par amination réductrice. Le spectre de
15 masse transformé met particulièrement bien en évidence la masse attendue pour le
monoconjugé OM-197-FV-P₂P₃₀ (Figure 35).

De même, le spectre de masse obtenu pour le biconjugé (OM-197-FV)₂-P₂P₃₀ ne
laisse aucun doute quant à la présence de deux molécules de OM-197-FV par unité
20 de peptide. L'enveloppe ionique constituée par les ions m/z 1044.5 (A6), 1253.1
(A5), 1566.3 (A4) et 2088.4 (A3) (Figure 33), ainsi que le spectre transformé (Figure
36) attestent de la masse moléculaire attendue pour le biconjugé (6261 uma).

25

3.4. Conjugés avec le peptide (NANP)₃CS.T3

Un couplage similaire peut être réalisé sur le peptide (NANP)₃CS.T3 (TNO, PM:
3527uma, Figures 37 et 40), dont la séquence est la suivante :

30

NANPNANPNANPDIEK~~K~~IAKMEKASSVFNVVNS

Après dialyse contre H₂O, les ions observés sur les spectres ES/MS indiquent des masses moléculaires de 4557 et 5587 uma, correspondant aux valeurs attendues pour les composés mono- et biconjugués, respectivement (Figures 38-39 et 41-42).

5

3.5. Conjugués avec ovalbumine

Les protéines, comme l'ovalbumine par exemple, se prêtent particulièrement bien au couplage par amination réductrice. Les nombreuses lysines présentes dans la séquence (20 lysines pour l'ovalbumine) sont autant de sites de conjugaison possibles pour les pseupectidolipides portant un bras auxiliaire fonctionnalisé avec un groupe aldéhyde. En variant la stœchiométrie de la réaction d'amination réductrice (ratio pseudopeptidolipide / protéine), différents degrés de conjugaison peuvent être obtenus.

15

1 mg d'OM-197-FV7 purifié (0.928 µmol, 10 éq) a été ajouté à une solution de 4 mg d'ovalbumine (0.09 µmol, 1 éq) dissous dans 5 ml H₂O. La solution est agitée pendant 30 minutes à température ambiante, puis l'étape de réduction est effectuée en ajoutant 46 µl de NaBH₃CN 1M (2.89 mg, 50 éq).) La solution est agitée pendant deux heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite dialysé contre H₂O pendant 24 heures. (cassette de dialyse 3.5Kd, Slide-A-Lyzer, Pierce).

De par sa taille et une hétérogénéité propre, l'ovalbumine pose de nombreux problèmes analytiques. Par conséquent, la caractérisation d'un conjugué OM-197-FV-ovalbumine par spectrométrie de masse s'avère particulièrement délicate. Afin de mettre en évidence la réaction de conjugaison, des analyses SDS-PAGE ont été réalisées sur les différents lots de conjugués OM-197-FV-ovalbumine. Comme le montre le gel présenté en Figure 43(B) (gradient 4-20% polyacrylamide), une masse supérieure d'environ 3000 uma à l'ovalbumine initiale (ligne 2) est observée pour les conjugués OM-197-FV-ovalbumine (lignes 3, 4 et 5). Cette différence de masse suggère ainsi la présence de plusieurs molécules de OM-197-FV par molécule d'ovalbumine. Les analyses LC/UV réalisées sur phase C₄ confirment ce résultat. En

effet, dans ces conditions, l'ovalbumine initiale apparaît clairement à $R_t=11.3$ min, alors qu'après la réaction de conjugaison, le pic correspondant à l'ovalbumine initiale a complètement disparu démontrant une réaction quantitative de l'ovalbumine. Le conjugué OM-197-FV-ovalbumine n'est par contre pas élué. Ce comportement chromatographique indique également la présence de plusieurs molécules d'OM-197-FV sur l'ovalbumine, empêchant ainsi l'élution du conjugué dans ces conditions.

3.6. *Conjugués avec hémagglutinine H1N1*

10

La protéine d'hémagglutinine H1N1 constitue également un exemple de choix pour illustrer le couplage entre les molécules de type OM-197 et un antigène de type protéinique.

15 1 mg d'OM-197-FV7 purifié ($0.928 \mu\text{mol}$, 15 éq) a été ajouté à une solution de 5 mg de H1N1 (hémagglutinine A / Beijing 262/95, Solvay Duphar, Weesp, NL) ($0.06 \mu\text{mol}$, 1 éq) dissous dans 8 ml H_2O . La solution est agitée pendant 30 minutes à température ambiante, puis l'étape de réduction est effectuée en ajoutant $46 \mu\text{l}$ de NaBH_3CN 1M (2.89 mg, 50 éq). La solution est agitée pendant deux heures à
20 température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite dialysé contre H_2O pendant 24 heures (cassette de dialyse 3.5 Kd).

Le conjugué OM-197-FV-H1N1 a été analysé par SDS-PAGE dans les conditions utilisées pour le conjugué OM-197-FV-ovalbumine (gradient 4-20% polyacrylamide).
25 Les profils électrophorétiques obtenus pour la protéine initiale (ligne 6) et le conjugué avant et après dialyse (lignes 8 et 7, respectivement) sont présentés en Figure 43(C). La protéine H1N1 apparaît sous la forme de trois bandes, dont deux correspondent aux sous-unités HA1 et HA2 décrites dans la littérature (Swiss-Prot, Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva). Dans le cas des conjugués OM-197-FV-H1N1, une
30 différence de masse est observée pour chacune des bandes, mettant ainsi en évidence le couplage de molécules de OM-197-FV sur la protéine H1N1.

EXEMPLE 4**ETUDE PHARMACOLOGIQUE DES COMPOSES SELON
L'INVENTION (IN-VITRO)****4.1. Test de détermination de l'endotoxicité**

5

L'endotoxicité a été déterminée par le test Limulus Amoebocyte Lysate chromogénique cinétique (Charles River Endosafe produit R1708K lot EK2251E).

Ce test LAL a été utilisé pour démontrer la faible endotoxicité des antigènes couplés au produit de l'invention.

- 10 Le principe biologique de ce test est basé sur l'initiation par les endotoxines bactériennes d'une proenzyme présente dans le lysat des amoebocytes de Limulus (LAL) qui active une cascade de sérine protéases. En présence d'un substrat incolore (S-2834 peptide couplé à la p-nitroaniline), le clivage du chromophore conduit à la libération de p-nitroaniline (pNA) et au développement d'une coloration
- 15 jaune qui peut être suivi spectrophotométriquement à 405 nm.

1. proenzyme $\xrightarrow{\text{endotoxine}}$ enzyme

2. substrat $\xrightarrow{\text{enzyme}}$ peptide + p-nitroaniline

- 20 Le test cinétique chromogénique est basé sur le fait que la quantité d'endotoxine est inversement proportionnelle au temps nécessaire pour atteindre une densité optique (D.O.) de 0.2. La concentration est déterminée par rapport à une courbe standard de 0.005 à 50 EU/ml.

- 25 Les résultats sont exprimés en EU (unité d'endotoxine) par rapport à une solution étalon standard internationale (EC-6). Pour cette série de dosage 1 EU représente environ 0.08 ng LPS *E. coli* O55 :B5.

Tableau résultat LAL pour les différents produits de l'expérience d'immunisation avec les produits conjugués à l'ovalbumine :

Composés ou mélanges testés	EU/mg	ng. équivalent LPS par mg de produit
Ovalbumine	< 0.8	< 0.064
Ovalbumine + OM-197-MP	5.8	0.48
OM-197-FV-ovalbumine	99	8.21

- 5 Il semblerait que le fait de coupler l'OM-197-FV à l'ovalbumine crée une augmentation de l'activité LAL détectée. Cette augmentation est peut être due à un changement dans la manière dont la molécule d'OM-197-FV est présentée. Les autres produits de la série ovalbumine ont tous des activités LAL équivalentes. Les résultats LAL sont très variables et des différences entre les groupes de 3 à 4 x ne sont pas significatives. L'activité LAL maximale est de 2.4 ng équivalent LPS par injection (25 µg/injection) pour les produits de couplage, pour les autres groupes l'activité LAL maximale est de 0.012 ng équivalent LPS par injection.

- 15 Tableau résultat LAL pour les différents produits de l'expérience d'immunisation avec les produits conjugués à l'hémagglutinine H1N1 :

Composés ou mélanges testés	EU/mg	ng. équivalent LPS par mg de produit
H1N1	2	0.17
H1N1 + OM-197-MP	20	1.67
OM-197-FV-H1N1	15.6	1.30

- 20 Les produits de la série H1N1 ont tous des activités LAL équivalentes. Les résultats LAL sont très variables et des différences entre les groupes de 3 à 4 x ne sont pas significatives. Le couplage n'a pas d'effet sur l'activité LAL. L'activité LAL maximale est de 0.008 ng. équivalent LPS par injection (5 µg/injection).

Tableau résultat LAL pour les différents produits de l'expérience d'immunisation avec les produits conjugués au peptide (NANP)₆P₂P₃₀ :

Composés ou mélanges testés	EU/mg	ng. équivalent LPS par mg de produit
(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	16	1.33
(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀ + IFA	n.d. *	n.d. *
(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀ + OM-197-FV6	13	1
(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀ + OM-197-MC	12	1
(OM-197-FV) _{1,2,3} -(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	2	0.17
OM-197-FV-(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	9.4	0.78
OM-197-FV-(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀ + OM-197-MP	17.4	1.45

* pas dosable en LAL car il s'agit d'une émulsion

5

Les produits de la série (NANP)₆P₂P₃₀ ont tous des activités LAL équivalentes. Les résultats LAL sont très variables et des différences entre les groupes de 3 à 4 x ne sont pas significatives. Le couplage n'a pas d'effet sur l'activité LAL.

L'activité LAL maximale est de 0.03 ng. équivalent LPS par injection (20 µg/injection).

10

4.2. Détermination de la prolifération des cellules souche de la moelle osseuse de souris stimulées par les produits de l'invention

15

4.2.1. Expérience de prolifération

20

Des souris mâles C57/BL6 de 6 semaines sont sacrifiées par inhalation de CO₂. Les os des membres postérieurs, la hanche, le tibia et le fémur sont prélevés. La moelle est extraite de la lumière osseuse par injection de milieu Eagle modifié par Dulbecco (milieu DH) au travers des extrémités qui ont été préalablement sectionnées. Les cellules souches sont lavées et remises en suspension dans du milieu DH complété

par 20 % de sérum de veau foetal (SVF). La concentration cellulaire est ajustée à 500000 cellules/ml.

Les produits en solution dans le milieu DH additionné de 20 % SVF, d'acides aminés et d'antibiotiques, sont dilués en série directement dans la microplaque. Les produits
5 sont testés en triplicat et chaque microplaque comprend un contrôle négatif composé de milieu seul. Le volume final dans chaque puits est de 100 µl. Pour certaines expériences les produits en solution dans l'isopropanol sont dilués dans le milieu DH avec 20 % de SVF, amené à sec par évaporation, et repris dans un volume équivalent d'eau.

10 100 µl de suspension cellulaire sont ajoutés aux dilutions de produits et les cellules sont incubées pendant 7 jours dans une étuve à 37 °C, sous 8 % de CO₂, saturée en humidité. La prolifération est déterminée par la mesure de l'oxydation d'un substrat chromogénique (XTT) dans les mitochondries des cellules vivantes (Cell Proliferation kit II # 1465 015 Boehringer Mannheim).

15 A la fin de l'incubation, 50 µl de la solution XTT substrat sont ajoutés à chaque puits. Après 8 heures d'incubation à 37 °C sous 8 % de CO₂ dans une étuve saturée en humidité, les microplaques sont lues au spectrophotomètre à 492 nm contre une référence à 690 nm.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type sous forme de courbe
20 dose-réponse. Les valeurs du contrôle négatif composé de milieu DH (moyenne ± écart type) sont également indiquées sous forme graphique.

4.2.2. Présentation des résultats

25 Prolifération des cellules souches de la moelle osseuse induite par des pseudopeptidolipides porteurs d'un bras auxiliaire fonctionnalisé

La figure 44 présente l'activité des différents produits et montre l'influence du bras auxiliaire fonctionnalisé sur l'activité NO mesurée *in vitro*. Le bras contenant la fonction aldéhyde (OM-197-FV7) présente une capacité à induire la prolifération plus
30 faible que ceux qui contiennent une fonction alcool (OM-197-FV8) ou diol (OM-197-FV6). De plus le maximum d'induction de la prolifération est décalé par rapport aux autres produits (à environ 5 µg/ml). Le pseudopeptidolipide monophénylé portant un

bras auxiliaire diol (OM-197-FV6 monophénylphosphate) est très actif dans ce modèle *in vitro*, beaucoup plus que l'équivalent non phénylé (OM-197-FV6).

Le composé comprenant une charge positive sur son bras fonctionnalisé (OM-287-AC5) présente un profil d'activité différent des autres composés de la série. Il commence par être inactif et présente un pic d'activité maximal vers 1 µg/ml. Sa capacité à induire la prolifération des cellules souches est très importante. L'OM-197-MC comprenant une charge négative avec la fonction carbonyle est également très actif dans ce modèle, avec un maximum d'activité à environ 10 µg/ml.

La figure 45 présente une comparaison de l'activité NO des pseudopeptidolipides par rapport au LPS utilisé comme contrôle positif. Bien qu'induisant la prolifération des cellules souches de la moelle osseuse de manière significative, une concentration plus forte que celle du contrôle positif (100 x) est nécessaire pour que les pseudopeptidolipides commencent à induire une activité NO. L'amplitude maximale est également beaucoup plus faible que celle induite par le LPS de *E. coli*.

4.3. Détermination de la production d'oxyde nitrique par des macrophages murins stimulés par les produits de l'invention

20

4.3.1. Expérience de production d'oxyde nitrique :

Des souris mâles C57/BL6 de 6 semaines sont sacrifiées par inhalation de CO₂. Les os des membres postérieurs, la hanche, le tibia et le fémur sont prélevés. La moelle est extraite de la lumière osseuse par injection de milieu Eagle modifié par Dulbecco (milieu DH) au travers des extrémités qui ont été préalablement sectionnées. Les cellules souches sont lavées et remises en suspension (concentration cellulaire environ 40000 cellules/ml) dans du milieu DH complété par 20 % de sérum de cheval (SH) et 30 % de surnageant de L929. Les L929 sont une lignée de fibroblastes murins dont le surnageant est riche en facteur de croissance pour les macrophages (M-CSF). La suspension cellulaire est distribuée dans des boîtes de

30

Pétri qui sont incubées 8 jours à 37 °C sous 8 % de CO₂ dans une étuve saturée en humidité.

Après 8 jours les cellules souches se sont différenciées en macrophages matures.

- 5 Les macrophages sont détachés par un passage au froid, lavés et resuspendus dans du milieu DH complété par 5 % de sérum foetal de veau (SFV), des acides aminés et des antibiotiques. La concentration cellulaire est ajustée à 700000 cellules par ml.
- 10 Les produits en solution dans le milieu DH additionné de 5 % de SVF, d'acides aminés et d'antibiotiques, sont dilués en série directement dans la microplaque. Les produits sont testés en triplicat et chaque microplaque comprend un contrôle négatif composé de milieu seul. Le volume final dans chaque puits est de 100 µl. Pour certaines expériences les produits en solution dans l'isopropanol sont dilués dans le
- 15 milieu DH avec 5 % de SVF, amené à sec par évaporation, et repris dans un volume équivalent d'eau (résultats figure 41). 100 µl de suspension cellulaire sont ajoutés aux dilutions de produits et les cellules sont incubées pendant 22 heures dans une étuve à 37 °C, sous 8 % de CO₂, saturée en humidité. A la fin de l'incubation avec les produits, 100 µl de surnageant sont prélevés et la concentration de nitrite est
- 20 déterminée par la réaction de Griess.

- 100 µl de réactif de Griess (5mg/ml de sulfanilamide + 0,5mg/ml de chlorhydrate de N-(1-naphthyléthylène diamine)) dans de l'acide phosphorique à 2,5 % aqueux, sont ajoutés à chaque puits. Les microplaques sont lues au spectrophotomètre à 562 nm
- 25 contre une référence à 690 nm. La concentration en nitrite est proportionnelle à celle de l'oxyde nitrique produit. La concentration en nitrite est déterminée par rapport à une courbe standard.

- Les résultats sont exprimés après soustraction du contrôle négatif en moyenne ±
- 30 écart type sous forme de courbe dose/réponse.

4.3.2. Présentation des résultats :

Activité NO des pseudopeptidolipides porteurs d'un bras auxiliaire fonctionnalisé

La figure 46 présente l'activité des différents produits et montre l'influence du bras
5 auxiliaire fonctionnalisé sur l'activité NO mesurée *in vitro*. Le bras contenant la
fonction aldéhyde (OM-197-FV7) présente une activité plus faible que ceux qui
contiennent une fonction alcool (OM-197-FV8) ou diol (OM-197-FV6). Une
interaction de l'aldéhyde du composé OM-197-FV7 avec les protéines présentes
dans le milieu de culture pourrait expliquer l'activité de ce produit. Le composé
10 phénylé semble également moins actif que le composé non phénylé (OM-197-FV6).
La solubilité plus faible du composé phénylé pourrait expliquer cette baisse d'activité.

Le composé comprenant une charge positive sur son bras auxiliaire fonctionnalisé
(OM-287-AC5) présente un profil d'activité différent des autres composés de la série.
15 Il commence par être inactif et présente un pic d'activité maximal vers 1 µg/ml.
L'OM-197-MC comprenant une charge négative avec la fonction carbonyle est très
actif dans ce modèle.

La figure 47 présente une comparaison de l'activité NO des pseudopeptidolipides
20 par rapport au LPS utilisé comme contrôle positif. Bien qu'induisant une activité NO
significative, une concentration plus forte que celle du contrôle positif (100 x) est
nécessaire pour que les pseudopeptidolipides commencent à induire une activité
NO. L'amplitude maximale est également beaucoup plus faible que celle induite par
le LPS de *E. coli*.

25

4.4. *Test de différenciation des cellules dendritiques*

La capacité des produits de l'invention à induire la maturation des cellules pré-
dendritiques en cellules dendritiques a été évaluée. Les paramètres suivants ont été
30 mesurés: l'incorporation du Dextran-FITC et l'expression des molécules de surface
CD83, CD86.

4.4.1. Protocole expérimental

Les cellules mononucléées du sang périphérique sont isolées à partir de "buffy coats" de donneurs sains. Les monocytes purifiés par adhérence sont remis en suspension dans du milieu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, U.S.A.) contenant 10% de sérum de veau foetal, du GM-CSF (10 ng/ml; IM-HGM1, Immungenex Corp, Los Angeles, CA, U.S.A.) et de l'IL-4 (10 ng/ml; No 204-IL, R&D System, Minneapolis, MN, USA) à raison de 1×10^6 cellules/ml. Les cellules sont distribuées dans des boîtes de Pétri (P10, Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, UK) (10 x 10^6 cellules par boîte P10) et cultivées pendant 6 jours avec un changement de milieu après 3 jours. Les cellules ainsi obtenues sont appelées cellules pré dendritiques (DC-6). La maturation des cellules pré dendritiques en cellules dendritiques matures est réalisée par incubation avec les dilutions de produits ou de LPS (témoin positif) pendant 3 jours supplémentaires (voir sous produits). Au jour 9 (DC-9), les cellules sont récoltées, et les différents paramètres indicateurs de la maturation des cellules dendritiques: les molécules de surface CD83, CD86 ainsi que la capacité d'incorporer du Dextran-FITC sont évalués. Tous ces paramètres sont analysés par FACS EPICS-XL-MCL (Coulter Immunology, Hialeah, Finlande) (Lanzavecchia *et al.*, J. Exp. Med 179 (1994) 1109; Lanzavecchia *et al.*, J. Exp. Med 182 (1995) 389).

L'expression des molécules de surface est exprimée en % de la fluorescence moyenne des cellules stimulées par LPS (témoin positif) ; l'incorporation du Dextran est calculée par rapport à celle des cellules maintenues dans le milieu et est exprimée en %.

Produits : les solutions mères de OM-197-MC, OM-197-FV6, et OM-287-AC5 sont préparées à 0.5 mg/ml dans 0.9% NaCl/eau, additionnée de 0.1% triéthanolamine. Les solutions sont incubées à 37°C pendant 20 min, agitées vigoureusement pendant 3 min puis dilués à 100 µg/ml dans du milieu de culture RPMI 1640 et utilisés en dilution à partir de 10 µg/ml jusqu'à 0.03 µg/ml.

Produit de référence : lipopolysaccharide de *E. coli* (LPS, DIFCO, Detroit, MI, U.S.A.), solution stock 5 mg/ml dans PBS. Une solution intermédiaire est préparée à

100 µg/ml dans du milieu de culture RPMI 1640. Les concentrations testées sont des dilutions à partir de 1 µg/ml jusqu'à 0.03 µg/ml.

4.4.2. Evaluation des résultats

5

Les cellules dendritiques immatures (DC-6) issues de la différenciation des monocytes, par l'effet conjugué de GM-CSF et d'IL-4, sont capables d'incorporer le Dextran-FITC. Au cours du processus de maturation, les cellules perdent la capacité d'incorporer le Dextran-FITC. Les analyses sont effectuées au stade de
10 différenciation DC-9.

Les résultats (Figure 48) sont exprimés en % de l'incorporation du Dextran-FITC observée dans les cellules non stimulées incubées avec le milieu seul. Les cellules traitées avec du LPS ou de l'OM-287-AC5 ne conservent respectivement que 15% et
15 22% de phagocytose, Il faut au moins 1 µg/ml d'OM-287-AC5 pour induire une diminution maximale d'incorporation de Dextran alors que 0.1 µg/ml de LPS induisent une diminution équivalente. 10 µg/ml d'OM-197-MC sont nécessaires pour induire une diminution de 22 % de la phagocytose. De plus pour des concentrations inférieures à 3 µg/ml il n'y a aucun effet de l'OM-197-MC sur la phagocytose.
20 L'OM-197-FV6 ne semble avoir aucun effet sur la maturation des cellules dendritiques.

L'expression des molécules de surface costimulatrices est un autre critère de maturation des DC. L'augmentation de l'expression des CD83 et CD86 (Figures 49
25 et 50) a été testée. Les résultats sont exprimés en % de la moyenne de fluorescence par rapport à l'expression de ces marqueurs induite par le LPS. Ces résultats corroborent parfaitement ceux obtenus à partir de la phagocytose. L'OM-287-AC5 induit une augmentation de l'expression des molécules de surface dès 0.1 µg/ml, alors qu'il faut au moins 1 µg/ml pour que l'OM-197-MC commence à augmenter
30 l'expression de CD83 et de CD86. L'OM-197-FV6 n'a aucun effet sur l'expression des molécules de surface caractéristique des cellules dendritiques.

Ces résultats montrent un comportement très différent pour les pseudopeptidolipides en fonction de leur bras auxiliaire. L'OM-287-AC5 montre une capacité exceptionnelle à induire une différenciation des cellules DC-6 en DC-9 déjà à partir de 0.1 µg/ml, alors qu'il faut des concentrations supérieures à 1 µg/ml pour que

5 l'OM-197-MC commence à induire cette différenciation, et que l'OM-197-FV6 est totalement dépourvu de ce type d'activité.

EXEMPLE 5

ETUDE PHARMACOLOGIQUE DES COMPOSES SELON L'INVENTION (*IN-VIVO*)

5.1. *Evaluation des propriétés de pseudopeptidolipides portant un auxiliaire fonctionnalisé mélangé ou couplé au (NANP)₆P₂P₃₀ dans un modèle d'immunisation de souris*

5.1.1. Protocole expérimental

10 Antigène: le peptide (NANP)₆P₂P₃₀ comprend la séquence répétée (NANP) de *Plasmodium falciparum* et deux séquences de la toxine tétanique (P₂: 830-843 et P₃₀: 947-967) Ce peptide est connu comme étant un épitope *T-helper* et a démontré sa capacité à induire une réponse immunitaire élevée et de longue durée en présence d'adjuvants classiques. Le peptide a été obtenu par synthèse selon la
15 méthode décrite dans la littérature (Valmori *et al.*, 1992, J. immunol. 149, 717-721). La solution mère de l'antigène est préparée à 0.4 mg/ml dans 0.9% NaCl/eau à pH 8.0.

Adjuvants: les solutions mères des pseudopeptidolipides (OM-197-MP, OM-197-FV6
20 et OM-197-MC) sont préparées à 1 mg/ml dans 0.9% NaCl/eau, additionnée de 0.1% triéthanolamine. Le témoin positif est constitué par l'adjuvant incomplet de Freund (IFA de Difco, Detroit, MI, U.S.A.) et le témoin négatif est une solution de 0.9% NaCl/eau.

25 Dans le cadre de ce protocole expérimental, l'adjuvant et l'antigène sont formulés sous la forme de mélange ou de conjugués décrits précédemment. Deux types de conjugués (OM-197-FV)_n-(NANP)₆P₂P₃₀ ont été testés. Ceux-ci correspondent à des degrés de conjugaison différents, soit 1, 2 ou 3 molécules de OM-197-FV par molécule de peptide (mélange de mono-, bi- et triconjugué, n=1, 2 et 3,

respectivement), soit 1 molécule de OM-197-FV par molécule de peptide (monoconjugué, n=1).

5 Immunsation: des souris femelles BALB/c âgées de 6 semaines (6 souris par groupe) sont immunisées à deux reprises, par injection sous-cutanée à la base de la queue de 0.1 ml. Les quantités administrées sont de 20 µg d'antigène et de 50 µg d'adjuvant lors de la première injection et de 10 µg d'antigène et de 50 µg d'adjuvant lors de la seconde. Dans le cas des conjugués, la partie antigène est déterminante pour le calcul de la dose injectée.

10

Tableaux des groupes expérimentaux :

Groupe	Adjuvant		antigène	Nombre de souris
1			NaCl	6
2	---		(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	6
3	IFA	+	(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	6
4	OM-197-FV6	+	(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	6
5	OM-197-MC	+	(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	6
6	(OM-197-FV) _{1,2,3} -		(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	6
7	OM-197-FV-		(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀	6
8	OM-197-FV-		(NANP) ₆ P ₂ P ₃₀ + OM-197-MP	6

Schéma d'immunisation et des prélèvements :

Semaines	<u>0</u>	<u>3</u>	<u>5</u>
Immunsations	↑	↑	
(N°)	(1)	(2)	
Réponse anticorps spécifiques	↑		↑

15

Prélèvements du sang et des organes lymphoïdes :

Obtention du sérum: des prélèvements de sang sont effectués aux temps 0 et 5 semaines. Le sang est laissé reposer 60 min à 37°C, puis placé pendant une nuit à 20 4°C. Le sérum est ensuite congelé à -80°C jusqu'au dosage des anticorps.

5.1.2. Détermination des anticorps IgG anti-(NANP)₆P₂P₃₀:

Le dosage des anticorps IgG dirigés spécifiquement contre l'antigène (NANP)₆P₂P₃₀ est réalisé par ELISA. La fixation de l'antigène est effectuée en microplaque à 96 puits (Maxisorp F 96, Nunc, DK) par incubation pendant une nuit en chambre humide à 4°C avec dans chaque puits 0.1 ml de PBS (*phosphate buffered saline*) contenant 0.001 mg/ml d'antigène (NANP)₆P₂P₃₀. La saturation de la microplaque est effectuée avec du PBS contenant 1 % d'albumine sérique bovine (BSA, Fluka, CH). Les plaques sont lavées avec du PBS contenant 0.05% de Tween 20 (Sigma, Saint-Louis, MO, USA). Les sérums prélevés à 5 semaines sont dilués en série avec le tampon de dilution (PBS contenant 2.5% de lait en poudre dégraissé et 0.05% de Tween 20), puis transférés dans la microplaque et laissés 1 h à température ambiante (TA). Les plaques sont ensuite lavées avec du PBS. La solution de dilution contenant l'anticorps polyclonal anti-immunoglobuline G de souris conjugué à la phosphatase alcaline (Sigma, Saint-Louis, MO, USA) est ajoutée aux plaques et incubée 1 h à TA. Les plaques sont lavées avec du PBS et les anticorps spécifiques mis en évidence par réaction colorimétrique avec le substrat de la phosphatase alcaline, le p-nitrophenylphosphate (Sigma, Saint-Louis, MO, USA.). L'absorbance à 405 nm est mesurée avec un lecteur de microplaque (Dynatech 25000 ELISA reader, Ashford, Middlesex, UK), chaque condition est déterminée en duplicat. Les résultats présentés sont la moyenne des absorbances mesurées à 405 nm obtenues pour les souris de chaque groupe.

25 5.1.3. Résultats : réponse spécifique

La production spécifique des anticorps IgG anti-(NANP)₆P₂P₃₀ déterminée par ELISA, est présentée graphiquement pour les souris ayant reçu deux immunisations (Figure 51).

30 Deux injections d'un mélange antigène + adjuvant (OM-197-FV6 ou OM-197-MC) induisent une réponse sérologique largement supérieure à celle observée lors de l'injection de l'antigène seul. L'immunisation avec le monoconjugué OM-197-FV-(NANP)₆P₂P₃₀ induit une réponse en anticorps IgG légèrement

supérieure à celle obtenue avec le mélange antigène + OM-197-FV6. Un degré de conjugaison plus élevé (OM-197-FV)_{1,2,3}-(NANP)₆P₂P₃₀ n'améliore pas la réponse sérologique contre cet antigène. Le mélange de l'adjuvant OM-197-MP et du monoconjugué OM-197-FV-(NANP)₆P₂P₃₀ augmente de façon significative la
 5 réponse sérologique à cet antigène et dépasse les valeurs obtenues avec le contrôle positif constitué du mélange (NANP)₆P₂P₃₀ + IFA.

Des résultats similaires sont obtenus lorsque la capture des anticorps est effectuée par ELISA en utilisant comme antigène le peptide (NANP)₆NA (Figure 52).

10

5.2. Groupe d'immunisation ovalbumine : détermination d'anticorps spécifiques générés chez la souris après 1 et 2 administrations par voie sous-cutanée.

15 5.2.1. Description de l'expérience

Le but de cette étude est de comparer la réponse sérologique induite par l'injection d'un mélange adjuvant + antigène (OM-197-MP + ovalbumine) à celle élicitée par un conjugué avec ce même antigène (OM-197-FV-ovalbumine). Pour cela 30 souris
 20 BALB/c (femelles, 8 semaines d'âge au début du traitement) ont été réparties dans les 3 groupes suivants :

GROUPES	Adjuvant-Antigène 25 µg prot/animal/injection	Adjuvant (non lié) 50 µg/animal/injection	Volume injecté µl
A	ovalbumine	-	200
B	ovalbumine	OM-197-MP	200
C	OM-197-FV-ovalbumine	-	200

Solutions :

- Groupe A: la solution mère d'antigène seul (ovalbumine, Fluka AG, Buchs, Suisse) été préparée à la concentration de 125 µg/ml dans H₂O + 0.01% thiomersal.
- 5 • Groupe B: la solution mère du mélange antigène + adjuvant (ovalbumine + OM-197-MP) contient 125 µg/ml d'ovalbumine et 250 µg/ml de OM-197-MP dans H₂O + 0.01% thiomersal.
- Groupe C: la solution mère du conjugué OM-197-FV-ovalbumine est à la concentration de 125 µg/ml de protéine dans H₂O+ 0.01% thiomersal.

10

Préparations des solutions pour l'injection : chaque solution mère est incubée 15 minutes à 37°C, puis dans chaque cas un volume adéquat de NaCl (14%) est ajouté à chaque solution pour obtenir une solution isotonique (0.9% NaCl). Le tout est vortexé pendant 3 minutes.

15

Immunisations: les injections ont eu lieu à jours 0 et 14. Les solutions sont administrées par voie sous-cutanée (100 µl en 2 sites différents, au total 200 µl par animal). Les prises de sang ont eu lieu à jours 14 et 28 (ponction retro-orbitale).

20 Dosage des immunoglobulines anti-ovalbumine: les immunoglobulines sériques spécifiques pour ovalbumine suivantes ont été déterminées en duplicats par ELISA : IgG1, IgG2a, et IgM. En bref, des plaques micropuits (NUNC Immunoplate, Roskilde, DK) ont été incubées (coating overnight) à 4°C avec 100 µl de ovalbumine (0.5 µg) dans un tampon bicarbonate (pH 9.6). Après lavage avec 0.5% Tween-20 (Merck, Hohenbrunn, D) les sérums ont été dilués 50, 200 et 800 fois (solution de dilution: phosphate buffered saline (PBS) + 1 % d'albumine sérique bovine (BSA, Sigma, St. Louis, Mo, USA) + 0.02% Tween-20)). 100 µl de chacun des sérums dilués ont été ajoutés aux puits. Cette incubation a duré 45 minutes à 37°C.

30 Après un second lavage, les IgG1, IgG2a et IgM spécifiques pour ovalbumine sont incubées 30 minutes à 37°C avec 100 µl des anticorps (rat anti-souris) anti-IgG1 conjugués à la peroxydase (Serotec, Oxford, UK) , IgG2a conjugués à la peroxydase (Pharmingen, San Diego, CA, USA) et IgM conjugués à la biotine (Pharmingen, San

Diego, CA, USA), dilués au préalable dans le tampon PBS/BSA/Tween (dilutions : 250, 1000, et 500 fois respectivement). Pour les IgM, après un lavage supplémentaire, une 3^{ème} incubation a été nécessaire (30 min à 37°C) avec une solution 1/100 de streptavidine conjuguée à la peroxidase (Dako, Glostrup, DK).

5

Après lavage, 100 µl d'une solution de 1,2 phénylène diamine (OPD, Merck, Darmstadt, D) sont ajoutés pour détecter la peroxydase conjuguée aux anticorps secondaires anti-IgG1, tandis que pour les IgG2a et IgM, le réactif utilisé est le 3',3',5',5'-tétraméthylbenzidine (TMB, Sigma, St. Louis, Mo, USA). Après une
10 incubation de 20 minutes à température ambiante, la réaction est stoppée par l'ajout de 100 µl de 2N H₂SO₄. Les absorbances sont mesurées à 490 nm avec un lecteur de plaques Bio Rad 3550.

5.2.2. Résultats

15

Les résultats de chaque mesure à 490 nm sont exprimés en unités arbitraires (u.a) par ml. Ceci a été possible par comparaison de chaque échantillon avec une référence préparée à partir de dilutions d'un pool des échantillons à 28 jours
20 provenant du groupe A (animaux injectés avec ovalbumine seule). Par définition le pool d'échantillons dilué 50 fois est à la concentration de 1000 u.a./ml. Les résultats individuels ont ensuite été corrigés selon le facteur de dilution correspondant (50, 200, ou 800 fois) et sont présentés dans les Figures 53, 54 et 55 : les cercles vides correspondent à la moyenne à 14 jours et les cercles pleins correspondent à la moyenne à 28 jours; abbréviation Ova = ovalbumine.

25

Ces résultats indiquent que le conjugué OM-197-FV-ovalbumine est particulièrement immunogène dans le modèle étudié, puisqu'il augmente de façon significative après la deuxième injection les anticorps spécifiques anti-ovalbumine produits par la
30 souris, ceci quelque soit la sous-classe d'immunoglobuline analysée (IgG1, IgG2a, et IgM). En particulier il faut relever l'augmentation très importante des IgG2a anti-ovalbumine (Figure 54) qui suggère une immunité préférentiellement orientée TH1. Le mélange non covalent ovalbumine + OM-197-MP donne une réponse IgG2a inférieure à celle obtenue avec le conjugué.

5.3. Groupe d'immunisation hémagglutinine H1N1 : détermination d'anticorps spécifiques générés chez la souris après 1 et 2 administrations par voie sous-cutanée.

5

5.3.1. Description de l'expérience

Le but de cette étude est de comparer la réponse sérologique induite par l'injection d'un mélange adjuvant + antigène (OM-197-MP + H1N1) à celle élicitée par un
 10 conjugué avec ce même antigène (OM-197-FV-H1N1). Pour cela 30 souris BALB/c (femelles, 8 semaines d'âge au début du traitement) ont été réparties dans les 3 groupes suivants :

GROUPE	Adjuvant-Antigène H1N1 2.5 µg/animal/injection	Adjuvant (non lié) 50 µg/animal/injection	Volume injecté µl
A	H1N1	-	100
B	H1N1	OM-197-MP (50 µg)	100l
C	OM-197-FV-H1N1	-	100

15

5.3.2. Préparation des solutions injectées

- Groupe A: la solution mère de H1N1 (hémagglutinine A/Beijing 262/95, Solvay Duphar, Weesp, NL) a été préparée à la concentration de 25 µg/ml dans H₂O.
 - 20 • Groupe B: la solution mère H1N1 + OM-197-MP contient 25 µg/ml de H1N1 et 500 µg/ml de OM-197-MP dans H₂O.
 - Groupe C: la solution mère OM-197-FV- H1N1 (H1N1 lié de façon covalente à OM-197-FV) est à la concentration de 25 µg/ml dans H₂O).
- 25 Chaque solution mère est incubée 15 minutes à 37°C, puis 135 µl de NaCl (14%) sont ajoutés à 2 ml de chaque solution. Le tout est vortexé pendant 3 minutes.

5.2.3. Injections et dosage des immunoglobulines anti-H1N1

Les injections ont eu lieu à jours 0 et 14. Les solutions sont administrées par voie sous-cutanée (50 µl en 2 sites différents, au total 100 µl par animal). Les prises de sang ont eu lieu à jours 14 (ponction retro-orbitale).

Les IgM spécifiques pour H1N1 ont été déterminées en duplicats par ELISA. En bref, des plaques micropuits (NUNC Immunoplate, Roskilde, DK) ont été incubées (*coating overnight*) à 4°C avec 100 µl de H1N1 (0.5 µg) dans un tampon bicarbonate (pH 9.6). Après lavage avec 0.5% Tween-20 (Merck, Hohenbrunn, D) les sérums ont été dilués 50, 200 et 800 fois (solution de dilution: phosphate buffered saline (PBS) + 1 % d'albumine sérique bovine (BSA, Sigma, St. Louis, Mo, USA) + 0.02% Tween-20). 100 µl de chacun des sérums dilués ont été ajoutés aux puits. Cette incubation a duré 45 minutes à 37°C.

15

Après un second lavage, les IgM spécifiques pour H1N1 sont incubées 30 minutes à 37°C avec 100 µl des anticorps (rat anti-souris) anti-IgM conjugués à la biotine (Pharmingen, San Diego, CA, USA), dilués au préalable dans le tampon Tween (dilution: 500 fois). Après un lavage supplémentaire, une troisième incubation (30 min à 37°C) a été effectuée avec une solution 1/100 de streptavidine conjuguée à la peroxidase (Dako, Glostrup, DK).

Après lavage, 100 µl d'une solution de 3',3',5',5'-tétraméthylbenzidine (TMB, Sigma, St. Louis, Mo, U.S.A.) sont ajoutés pour détecter la peroxydase conjuguée aux anticorps secondaires anti- IgM. Après une incubation de 20 minutes à température ambiante, la réaction est stoppée par l'ajout de 100 µl de 2N H₂SO₄. Les absorbances sont mesurées à 490 nm avec un lecteur de plaques Bio Rad 3550.

25

5.3.4. Résultats

30

Les résultats de chaque mesure à 490 nm sont exprimés en Unités Arbitraires (U.A) par ml. Ceci a été possible par comparaison de chaque échantillon avec une référence préparée à partir de dilutions d'un pool des échantillons à 28 jours

provenants du groupe A (animaux injectés avec H1N1 seul). Par définition le pool d'échantillons dilué 50 fois est à la concentration de 1000 U.A./ml. Les résultats individuels ont ensuite été corrigés selon le facteur de dilution correspondant (50, 200, ou 800 fois) et sont présentés dans la Figure 56 : les cercles pleins
5 correspondent à la moyenne à 28 jours.

Les souris immunisées avec le conjugué OM-197-FV-H1N1 montrent un titre d'anticorps IgM anti-H1N1 supérieur à celui du contrôle constitué par l'antigène H1N1 seul, ainsi qu'à celui du mélange OM-197-MP + H1N1.

- hydroxysulfonyl [(C₁-C₅)alkylthio]
- hydroxysulfonyloxy [(C₁-C₅)alkoxy]
- hydroxysulfonyloxy [(C₁-C₅)alkylthio]

- 5 2. Un composé selon la revendication 1 dans lequel le groupe auxiliaire en X ou Z, répond à la formule générale (II)



10 A est O, S ou NH

le descripteur r prend une valeur de 0 ou de 1

le descripteur s prend une valeur variant de 1 à 10

W est choisi parmi les groupements :

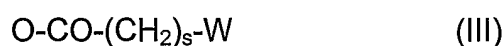
- formyle
- 15 -acétyle
- cyano
- halogéno -amino
- bromo ou iodo-acétamido
- acylamido
- 20 -diacylimido
- sulfhydryle
- alkylthio
- hydroxyle
- acyloxy
- 25 -vinyle
- éthynyle
- carboxyle libre ou sous forme d'ester, d'anhydride mixte, d'amide ou d'hydrazide
- azido
- thiocyano

30

3. Un composé selon la revendication 1 ou 2 dans lequel lorsque le substituant X ou Z représente un groupe acide sous forme neutre, il s'agit de la forme carboxylique, sulfonique, phosphonique ou phosphorique libre.

4. Un composé selon la revendication 1 ou 2 dans lequel lorsqu'il s'agit d'un groupe acide sous forme chargée, il s'agit de la forme carboxylique, sulfonique, phosphonique ou phosphorique salifiée, notamment par addition d'une base minérale ou organique, de préférence thérapeutiquement compatible.

5. Un composé selon l'une des revendications 1 à 4 dans lequel, lorsque le substituant X ou Z représente un groupe auxiliaire de formule générale (III)



le descripteur s prend une valeur variant de 1 à 10, et plus particulièrement 4, 5 ou 6

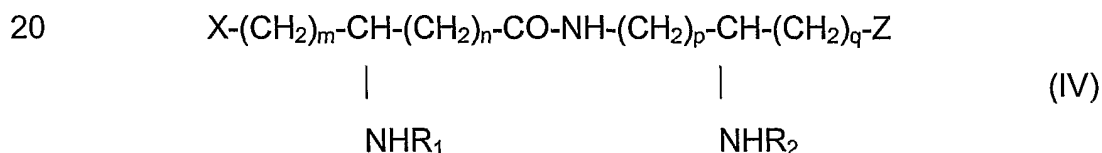
W est choisi parmi les groupements :

-formyle

-amino

et hydroxyle.

6. Un composé selon l'une des revendications 1 à 5 répondant à la formule générale IV



dans laquelle R₁ et R₂ représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyl en C₁ - C₂₄) thio

les descripteurs m, n prennent une valeur variant de 0 à 10

les descripteurs p, q prennent une valeur variant de 1 à 10

et dans laquelle l'un des substituants X ou Z est un carboxyle ou un radical dihydroxyphosphoryloxy ou un groupe carboxy [(C₁-C₅)alkoxy] ou carboxy [(C₁-C₅)alkylthio] et dans laquelle l'autre est un radical 6-aminohexanoyloxy, un

radical 6-oxohexanoyloxy, un radical 6-hydroxyhexanoyloxy ou un radical 6,7-dihydroxyheptanoyloxy.

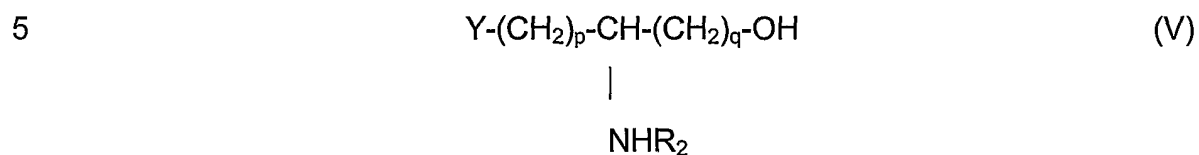
7. A titre de composés actuellement préférés selon l'une des revendications 1 à 6,
 5 un composé choisi dans le groupe formé de :
- l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétra-decanoylamino] pentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique,
 - le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-
 10 hydroxytétra décanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-(6-oxohexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique,
 - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétra-decanoylamino] pentyl]amide 5-O-(6-oxohexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique,
 - 15 - le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétra-décanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogéné-phosphate (6-aminohexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique,
 - le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-
 hydroxytétra décanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogéné-phosphate 10-(6-
 20 hydroxyhexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique,
 - et le 2-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-(dihydroxyphosphoryloxy) butanoate de {2-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-5-(6-oxohexyl)amino} pentyle et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique.
- 25 8. A titre de composés préférés selon la revendication 1, un composé de formule générale I choisi dans le groupe formé :
- du composé dans lequel X = dihydroxyphosphoryloxy, Y = NH, Z = auxiliaire 6-oxohexanoyloxy, R1 = 3-lauryloxy-myristyle, R2 = 3-hydroxymyristyle, m = 2, n = 0, p = 3, q = 1 ;
 - 30 - du composé dans lequel X = -dihydroxyphosphoryloxy, Y = NH, Z = auxiliaire 6-aminohexanoyloxy, R1 = 3-lauryloxymyristyle, R2 = 3-hydroxymyristyle, m = 2, n = 0, p = 3, q = 1 ;

- du composé dans lequel X = carboxyle, Y = NH, Z = auxiliaire 6-oxohexanoyloxy, R1 = 3-lauryloxy-myristyle, R2 = 3-hydroxy-myristyle, m = 1, n = 0, p = 3, q = 1 ;
- 5 - du composé dans lequel X = dihydroxyphosphoryloxy, Y = NH, Z = auxiliaire 6-hydroxylhexanoyloxy, R1 = 3-lauryloxy-myristyle, R2 = 3-hydroxy-myristyle, m = 2, n = 0, p = 3, q = 1 ;
- du composé dans lequel X = dihydroxyphosphoryloxy, Y = O, Z = auxiliaire (6-oxohexyl)amino, R1 = 3-lauryloxy-myristyle, R2 = 3-hydroxy-myristyle, m = 2, n = 0, p = 1, q = 3 ;
- 10 - du composé dans lequel X = -carboxyméthoxy, Y = NH, Z = auxiliaire 6-oxohexanoyloxy, R1 = 3-lauryloxy-myristyle, R2 = 3-hydroxy-myristyle, m = 1, n = 0, p = 3, q = 1 ;
- du composé dans lequel X = carboxyméthylthio, Y = NH, Z = auxiliaire 7-aminoheptanoyloxy, R1 = 3-myristoyloxy-myristyle, R2 = 3-hydroxy-myristyle, m = 1, n = 0, p = 3, q = 1 ;
- 15 - du composé dans lequel X = -O-CH₂-CH(COOH)₂, Y = NH, Z = auxiliaire 6-oxohexanoyloxy, R1 = 3-lauryloxy-myristyle, R2 = 3-hydroxy-myristyle, m = 1, n = 0, p = 3, q = 1 ;
- du composé I dans lequel X = dihydroxyphosphoryloxy, Y = NH, Z = auxiliaire 6-(bromoacétamido)hexanoyloxy, R1 = 3-lauryloxy-myristyle, R2 = 3-hydroxy-myristyle, m = 2, n = 0, p = 3, q = 1 ;
- 20 - et du composé J dans lequel X = dihydroxyphosphoryloxy, Y = NH, Z = auxiliaire 6-oxohexanoyloxy, R1 = 3-hydroxy-myristyle, R2 = 3-lauryloxy-myristyle, m = 2, n = 0, p = 3, q = 1.

25

9. Procédé d'obtention des pseudodipeptides N-acylés selon la revendication 1, porteurs d'un groupement acide sous forme neutre ou chargée à l'une des extrémités du pseudodipeptide et porteurs à l'autre extrémité d'un auxiliaire fonctionnalisé, répondant à la formule générale I, qui consiste en ce qu'on bloque les fonctions amine en position (q+1) et YH en position ω d'un acide aminé ω-fonctionnalisé par des réactifs de blocage orthogonaux, en ce qu'on soumet la fonction carboxylique restée libre à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool correspondant, on libère la fonction amine en position (q+1) que l'on acyle
- 30

à l'aide d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule R_2OH dans laquelle R_2 est défini comme précédemment, puis libère la fonction terminale pour obtenir l'amino alcool fonctionnalisé de formule générale V

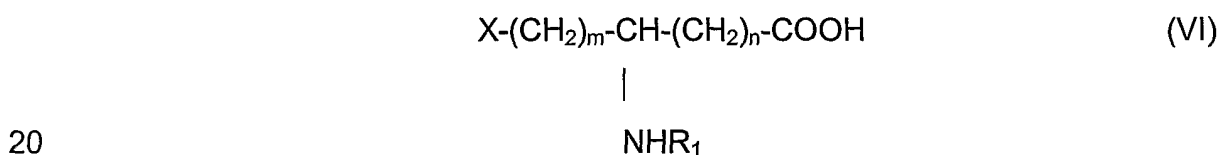


dans laquelle Y représente HO ou NH_2 ,

10 R_2 représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus,

p et q représentent chacun un nombre entier variant de 1 à 10

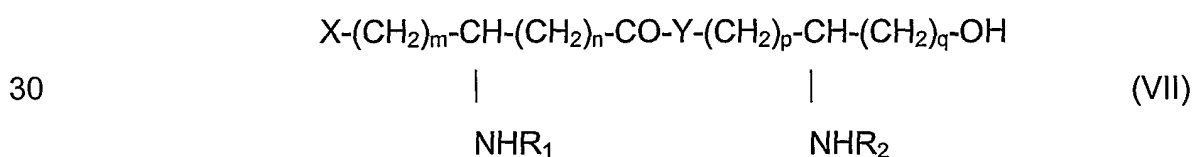
15 que l'on condense en présence d'un agent de condensation peptidique dans un solvant inerte, avec un dérivé d'un acide aminé ω -fonctionnalisé de formule générale VI



dans laquelle R_1 est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme précédemment,

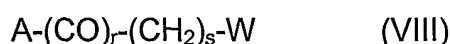
25 m et n est un nombre entier variant de 0 à 10

et X est un groupe acide défini comme précédemment qui peut être sous forme estérifiée pour former le pseudodipeptide de formule générale VII



dans laquelle les substituants R_1 , R_2 , et les descripteurs m , n , p et q sont définis comme précédemment,

dont on peut -si désiré- substituer, alkyler ou acyler la fonction alcool terminal libre par un réactif de substitution, d'alkylation ou d'acylation de formule générale VIII,



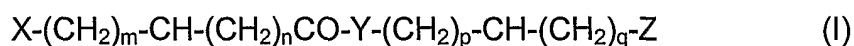
dans laquelle A est un groupe partant, une fonction OH, SH ou NH_2 .

le descripteur r est 1 ou 0

le descripteur s varie de 1 à 10 et de préférence entre 2 et 6,

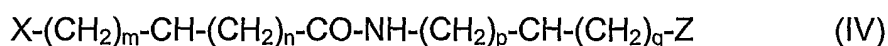
W est choisi de préférence parmi les groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -amino, -bromo ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -sulfhydryle, -alkylthio, -hydroxyle, -acyloxy, -vinyle, -ethynyle, -carboxyle libre ou présent sous forme d'ester, d'anhydride mixte, d'amide ou d'hydrazide, -azido, -thiocyano ou leurs précurseurs,

si nécessaire en présence d'un agent de couplage, et de le soumettre à une hydrogénation catalytique ou à un autre processus de déprotection de façon à obtenir le dérivé de formule générale I



dans laquelle et les substituants X, Y, Z, R_1 , R_2 , n , m , p et q ont les significations fournies antérieurement,

10. Procédé d'obtention des phosphopseudodipeptides de formule générale IV



dans laquelle R_1 et R_2 représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et

5

(alkyl en C_1-C_{24}) thio

les descripteurs m , p et q prennent une valeur allant de 1 à 10

le descripteur n prend une valeur allant de 0 à 10

dans laquelle X et Z représentent chacun un groupement acide ou un auxiliaire fonctionnalisé

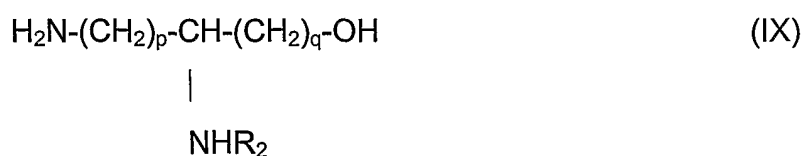
10

caractérisé en ce qu'on bloque les fonctions amine en position $(q+1)$ et en ω d'un acide diaminé de formule $H_2N(CH_2)_pCHNH_2(CH_2)_{q-1}COOH$ par des réactifs de blocage labiles par acidolyse et hydrogénéolyse, respectivement, soumet la fonction carboxylique restée libre à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool correspondant, libère la fonction amine en $(q+1)$ que l'on acyle à l'aide

15

d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule R_2OH dans laquelle R_2 est défini comme précédemment, puis libère la fonction amine terminale par hydrogénéolyse pour obtenir l'amino alcool de formule générale IX

20



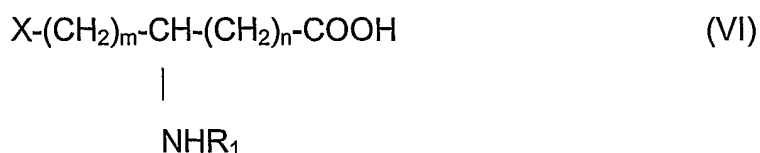
dans laquelle R_2 représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou

25

plusieurs substituants définis comme ci-dessus,

p et q représentent un nombre entier variant de 1 à 10 que l'on condense en présence d'un agent de condensation peptidique dans un solvant inerte avec un dérivé d'acide aminé ω -hydroxylé de formule générale VI

30



dans laquelle R_1 est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants

m est un nombre entier variant de 1 à 10

5 n est un nombre entier variant de 0 à 10

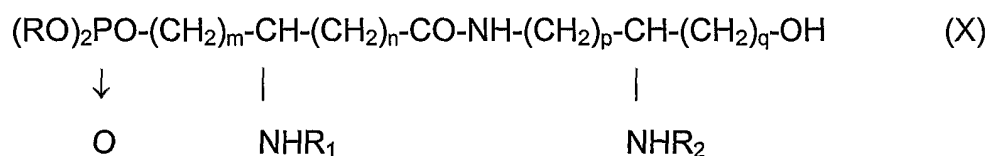
et X est un groupe dialkyloxy- ou diaryloxy-phosphoryloxy de formule $(RO)_2 P-O$

↓

O

pour former le pseudodipeptide de formule générale X

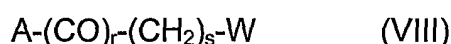
10



15

dans laquelle les substituants R_1 , R_2 et les descripteurs m , n , p et q sont définis comme précédemment, et R est un radical labile par hydrogénéolyse, dont on peut -si désiré- substituer, alkyler ou acyler la fonction alcool terminal libre par un réactif de substitution, d'alkylation ou d'acylation de formule générale VIII,

20



dans laquelle A est un groupe partant, une fonction OH, SH ou NH_2

le descripteur r a une valeur de 0 ou 1

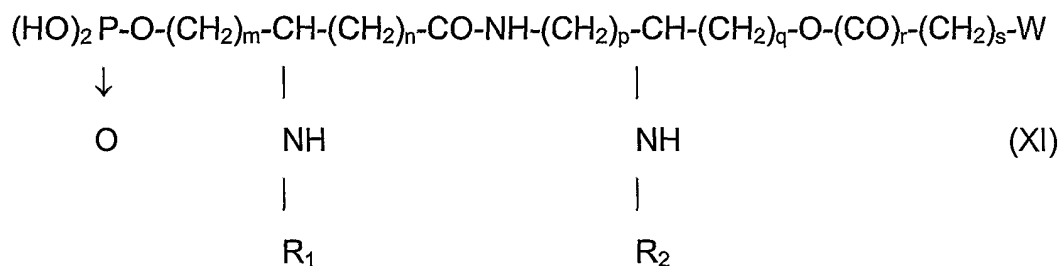
le descripteur s variant de 1 à 10, et de préférence de 2 à 6

25

W est choisi de préférence parmi les groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -amino, -bromo ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -sulfhydryle, -alkylthio, -hydroxyle, -acyloxy, -vinyle, -ethynyle, -carboxyle libre ou sous forme d'ester, d'anhydride mixte, d'amide ou d'hydrazide, -azido, -thiocyano ou leurs précurseurs,

30

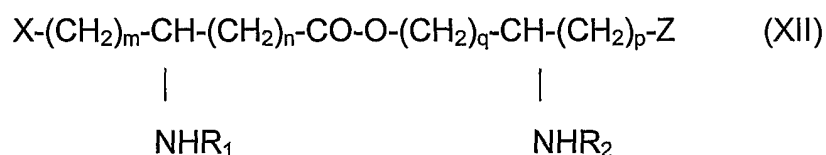
si nécessaire en présence d'un agent de couplage, et de le soumettre à une hydrogénation catalytique ou à un autre processus de déprotection de façon à obtenir le dérivé de formule générale XI



5

dans laquelle les substituants W, R₁, R₂, m, n, p, q, r, s ont les significations fournies antérieurement.

10 11. Procédé d'obtention des phosphopseudodipeptides de formule générale XII



15

dans laquelle R₁ et R₂ représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyl en C₁ - C₂₄) thio

20

les descripteurs m, p et q prennent une valeur allant de 1 à 10

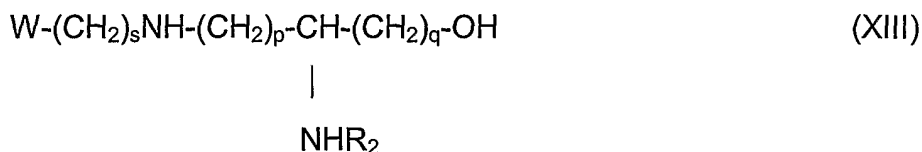
le descripteur n prend une valeur allant de 0 à 10

dans laquelle X et Z représentent chacun un groupement acide ou un auxiliaire fonctionnel

25

qui consiste en ce qu'on bloque les fonctions amine en position (q+1) et en ω d'un acide diaminé de formule H₂N(CH₂)_pCHNH₂(CH₂)_{q-1}COOH par des réactifs de blocage labiles par acidolyse et hydrogénolyse, respectivement, soumet la fonction carboxylique restée libre à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool correspondant, libère la fonction amine en (q+1) que l'on acyle à l'aide d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule R₂OH dans laquelle R₂ est défini comme précédemment, libère la fonction amine terminale par hydrogénolyse puis alkyle la fonction amine avec un triflate d'alkyle ω-fonctionnel pour obtenir l'amino alcool de formule générale XIII

30



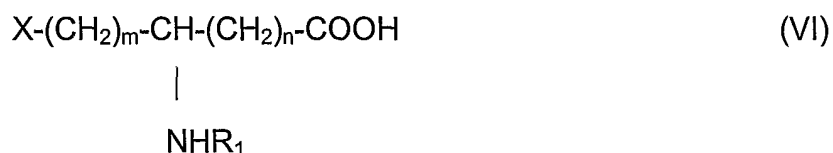
5

dans laquelle R_2 représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus,

p et q représentent un nombre entier variant de 1 à 10

10 le descripteur s variant de 1 à 10, et de préférence entre 2 et 7

que l'on condense en présence d'un agent de condensation dans un solvant inerte avec un dérivé d'acide aminé ω -hydroxylé de formule générale VI



15

dans laquelle R_1 est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants

20

m est un nombre entier variant de 1 à 10

n est un nombre entier variant de 0 à 10

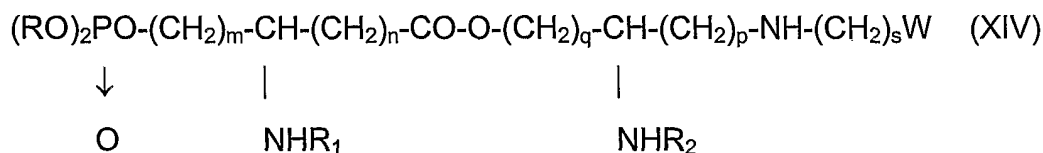
et X est un groupe dialkyloxy- ou diaryloxy-phosphoryloxy de formule $(RO)_2 P-O$

25

↓

O

pour former le pseudodipeptide de formule générale XIV

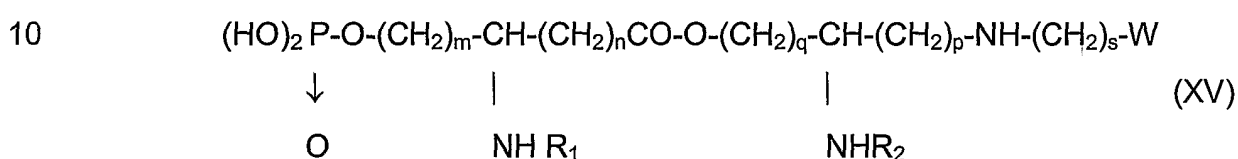


30

dans laquelle les substituants R_1 , R_2 et les descripteurs m , n , p , q et s sont définis comme précédemment, et R est un radical labile par hydrogénéolyse,

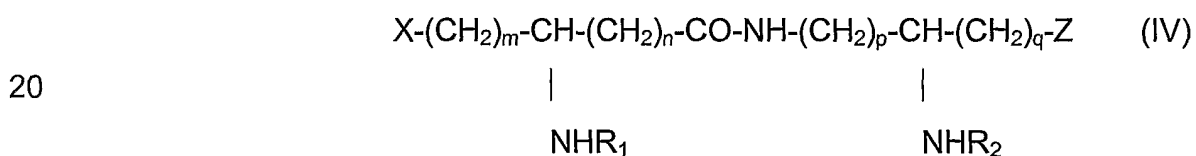
puis le soumettre à une hydrogénation catalytique ou à un autre processus de déprotection de façon à obtenir le dérivé de formule générale XV

- 5 W étant choisi de préférence parmi les groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -bromo ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -acyloxy, -vinyle, -ethynyle, -carboxyle libre ou sous forme d'ester, d'anhydride mixte, d'amide ou d'hydrazide, -azido, -thiocyano ou leurs précurseurs.



- 15 dans laquelle les substituants W, R₁, R₂, m, n, p, q, r, et s ont les significations fournies antérieurement.

12. Procédé d'obtention des carboxypseudodipeptides de formule générale IV



- 25 dans laquelle R₁ et R₂ représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyl en C₁-C₂₄) thio

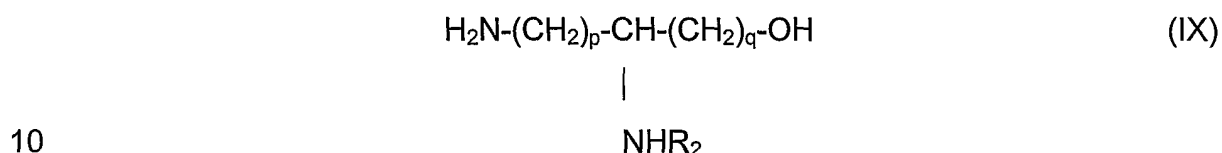
les descripteurs m, p et q prennent une valeur allant de 1 à 10

le descripteur n prend une valeur allant de 0 à 10

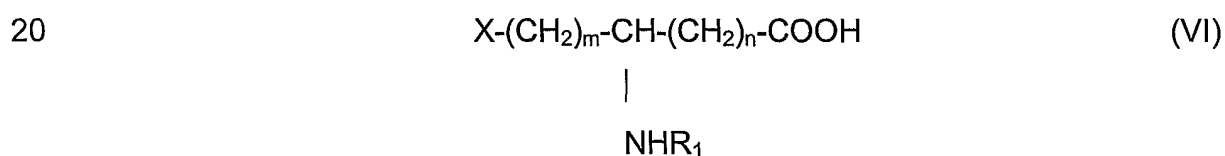
- 30 dans laquelle X et Z représentent chacun un groupement acide ou un auxiliaire fonctionnalisé

qui consiste en ce qu'on bloque les fonctions amine en position (q+1) et en ω d'un acide diaminé de formule H₂N(CH₂)_pCHNH₂(CH₂)_{q-1}COOH par des réactifs

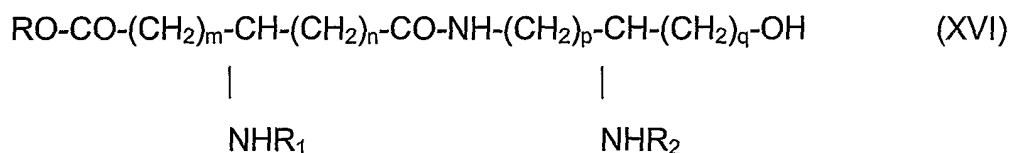
de blocage labiles par acidolyse et hydrogénéolyse, respectivement, soumet la fonction carboxylique restée libre à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool correspondant, libère la fonction amine en (q+1) que l'on acyle à l'aide d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule R₂OH dans laquelle R₂ est défini comme précédemment, puis libère la fonction amine terminale par hydrogénéolyse pour obtenir l'amino alcool de formule générale IX



dans laquelle R₂ représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus,
 15 p et q représentent un nombre entier variant de 1 à 10
 que l'on condense en présence d'un agent de condensation peptidique dans un solvant inerte avec un dérivé fonctionnel d' ω -carboxy amino acide de formule générale VI

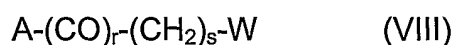


dans laquelle R₁ est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à
 25 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants
 m est un nombre entier variant de 1 à 10
 n est un nombre entier variant de 0 à 10
 et X est un radical RO-CO-
 30 pour former le pseudodipeptide de formule générale XVI



5 dans laquelle les substituants R_1 , R_2 et les descripteurs m , n , p et q sont définis comme précédemment, et R est un groupe labile par hydrogénolyse, dont on peut -si désiré- substituer, alkyler ou acyler la fonction alcool terminal libre par un réactif de substitution, d'alkylation ou d'acylation de formule générale VIII,

10



dans laquelle A est un groupe partant, une fonction OH, SH ou NH_2

le descripteur r est 1 ou 0

le descripteur s varie de 1 à 10, et de préférence de 2 à 6

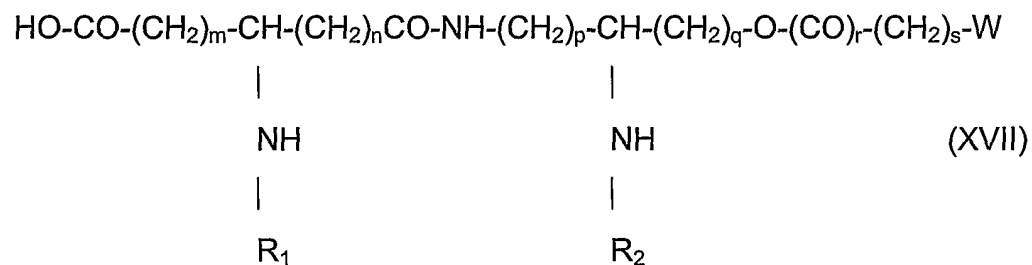
15

W est choisi de préférence parmi les groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -amino, -bromo ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -sulfhydryle, -alkylthio, -hydroxyle, -acyloxy, -vinyle, -ethynyle, -carboxyle libre ou sous forme d'ester, d'anhydride mixte, d'amide ou d'hydrazide, -azido, -thiocyano ou leurs précurseurs,

20

si nécessaire en présence d'un agent de couplage, et de le soumettre à une hydrogénation catalytique ou à un autre processus de déprotection de façon à obtenir le dérivé de formule générale XVII

25



30

dans laquelle les substituants W , R_1 , R_2 , m , n , p , q , r , s ont les significations fournies antérieurement.

13. Les énantiomères et les diastéréoisomères des composés de formule générale I, IV ou XII selon la revendication 1.
14. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9, dans lequel le blocage
5 de la fonction amine en ω sur la chaîne d'un dérivé d'ornithine est effectué par N-benzyloxycarbonylation, après réaction initiale de la fonction acide avec un sel de cuivre, en milieu alcalin, réaction de ce carboxylate de cuivre avec du chloroformiate de benzyle et libération de la fonction carboxylique par chélation du cuivre en milieu acide, pour obtenir le dérivé N-benzyloxycarbonylé.
- 10
15. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9, dans lequel la
réduction de la fonction carboxylique libre est effectuée en utilisant le complexe
borane-sulfure de diméthyle ou en faisant réagir le dérivé carboxylique avec un
chloroformiate d'alkyle pour former un anhydride mixte que l'on réduit ensuite au
15 moyen d'un borohydrure de métal alcalin ou alcalinoterreux, pour obtenir le dérivé hydroxylé correspondant ayant une fonction alcool primaire.
16. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9, dans lequel
l'élimination du groupe benzyloxy méthyle est effectuée par hydrogénolyse dans
20 un solvant hydroxylique contenant de la triéthylamine.
17. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9, dans lequel l'amine
libérée est couplée avec l'acide α -acylamino ω -phosphorylé carboxylique en
présence d'IDQ ou d'un autre réactif de couplage peptidique pour donner un
25 pseudodipeptide phosphorylé protégé.
18. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9, dans lequel l'acide α -
acylamino ω -phosphorylé carboxylique est acylé à l'oxygène avec un acide ω -
fonctionnalisé en présence d'EDCI ou un autre agent d'estérification en un ester
30 alcénylé.
19. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9, dans lequel la fonction
alcényle de l'ester alcénylé est soumis à une réaction de dihydroxylation en un

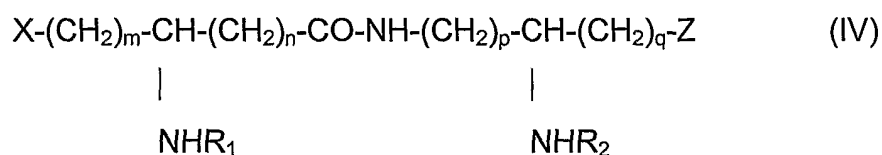
diol vicinal que l'on soumet à une oxydation périodique pour obtenir une fonction aldéhyde.

20. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9, dans lequel l'acide α -acylamino ω -phosphorylé carboxylique est acylé à l'oxygène avec un acide ω -amino-alkanoïque.
- 5
21. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9, dans lequel une réaction de déprotection complète par hydrogénolyse en présence de catalyseurs appropriés fournit un pseudodipeptide portant un auxiliaire aminoalkanoyle.
- 10
22. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9, dans lequel le partenaire acide de la réaction de couplage est un dérivé d'acide aspartique ou d'acide glutamique obtenu par acylation de la fonction amine de l'ester β -benzylique de l'acide aminé par un dérivé d'acide gras en présence d'un agent d'acylation pour obtenir un ester β -benzylique N-acyl aspartique ou glutamique.
- 15
23. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9, dans lequel le dérivé N-acylé est couplé à un amino alcool portant une amine secondaire puis le pseudodipeptide ainsi obtenu est soumis à une réaction d'hydrogénolyse en présence d'un catalyseur pour fournir le pseudodipeptide portant une fonction carboxylique.
- 20
24. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9, dans lequel la fonction hydroxyle du pseudodipeptide est acylée à l'aide d'un acide ω -fonctionnalisé par un groupe alcényle et on soumet le groupe alcényle aux réactions de dihydroxylation puis de déprotection et d'oxydation périodique.
- 25
25. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9, dans lequel la fonction hydroxyle du pseudodipeptide est acylée à l'aide d'un acide ω -aminoalkanoïque et on soumet le composé aux réactions de déprotection.
- 30

26. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9, dans lequel l'amino alcool obtenu par réduction de l'ornithine ou de la lysine est alkylé par un triflate d' ω -alcényle que l'on couple avec un acide α -acylaminé ω -phosphorylé carboxylique en présence d'un agent d'acylation comme l'EDCI, puis soumet le
5 groupe alcényle à une réaction de dihydroxylation en présence de tetroxyde d'osmium, élimine les groupes protecteurs, et oxyde la fonction diol vicinal par le périodate de sodium pour obtenir un composé à fonction aldéhyde.
27. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9 dans lequel on soumet
10 un dérivé N-protégé de la sérine à une O-alkylation, on élimine le groupe protecteur de la fonction amine par acidolyse, on acyle à nouveau la fonction amine avec un dérivé d'acide gras 3-hydroxylé en présence d'un agent d'acylation pour obtenir un dérivé N-acylé O-alkylé de la sérine que l'on couple avec un aminoalcool en présence d'un agent de couplage peptidique puis acyle
15 la fonction OH libre avec un acide alkanoïque ω -fonctionnalisé.
28. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9 dans lequel l'acide aminé de départ est la cystéine ou l'homocystéine que l'on alkyle par le bromoacétate de p-methoxybenzyle puis acyle à l'azote avec un dérivé d'acide
20 gras 3-hydroxylé, couple le dérivé S-alkylé et N-acylé ainsi obtenu avec le 5-amino 2-[3-hydroxytetradecanoylamino]pentan-1-ol en présence d'un agent de couplage peptidique pour obtenir un produit de condensation dont on acyle la fonction alcool primaire libre par un acide alcanoïque ω -fonctionnalisé, et si désiré soumet le produit en résultant à une réaction de déprotection.
25
29. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9 dans lequel on soumet un dérivé p-méthoxybenzyloxycarbonylé de la sérine à une O-alkylation à l'aide du méthylène malonate de dibenzyle en milieu alcalin, libère la fonction amine par traitement acide puis acyle la fonction amine libérée avec un acide gras
30 3-hydroxylé en présence d'un agent d'acylation, puis couple le dérivé N-acylé O-alkylé ainsi obtenu avec un amino alcool en présence d'un agent de couplage peptidique pour former un pseudodipeptide que l'on acyle ensuite sur la fonction OH libre avec un acide alkanoïque ω -fonctionnalisé par un radical alcénylé ou

aminé, soumet le dérivé alcényle à une réaction de dihydroxylation puis de déprotection par hydrogénolyse puis à une oxydation périodique pour obtenir un dérivé portant un bras auxiliaire oxoalcanoïque et un groupe malonylé.

- 5 30. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 9 dans lequel en partant de l'ester benzylique de l'homosérine O-phosphorylée, on procède à une N-acylation avec l'acide 3-benzyloxytétradécanoïque, soumet l'ester de benzyle à une hydrogénolyse sélective, soumet le dérivé résultant à une N-acylation par
 10 l'acide 3-dodécanoyloxytétradécanoïque en présence d'un agent de couplage et libère la fonction ω -aminée par hydrogénolyse sélective, couple cette amine avec un dérivé N-3-benzyloxytétradécanyl O-diphényloxyphosphoryle de l'homosérine en présence d'un agent de couplage peptidique pour obtenir un pseudodipeptide que l'on acyle avec un acide alcanoïque ω -fonctionnalisé par un alcényle ou un amino, en présence d'une carbodiimide et dans le cas d'un dérivé alcényle
 15 soumet celui-ci aux réactions de dihydroxylation puis de déprotection par hydrogénolyse en présence d'un catalyseur et d'oxydation périodique, pour conduire à un pseudodipeptide portant un bras auxiliaire comportant une fonction aldéhyde.
- 20 31. A titre de produits nouveaux nécessaires pour la réalisation des composés de formule générale I selon la revendication 1, les composés de formule IV



25

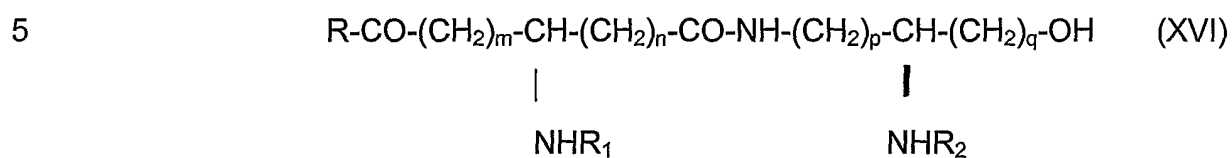
dans laquelle R_1 et R_2 représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis parmi un
 30 hydroxyle, un alkyle, un alkoxy, un acyloxy, un amino, un acylamino, un acylthio et un (alkyl en $C_1 - C_{24}$) thio

les descripteurs m, p et q prennent une valeur allant de 1 à 10

le descripteur n prend une valeur allant de 0 à 10

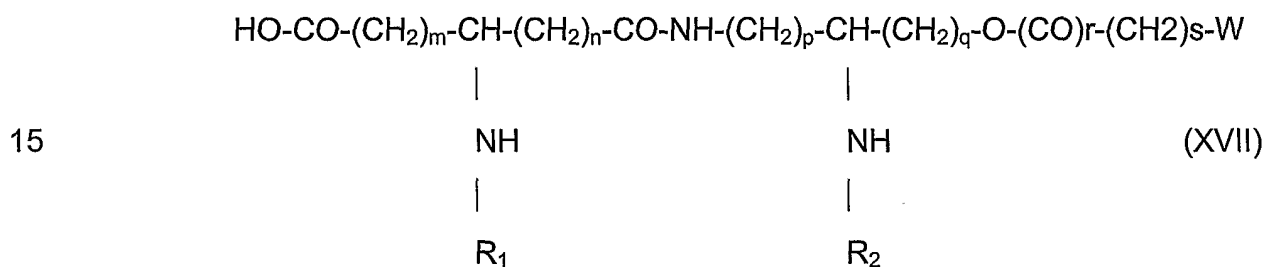
dans laquelle X et Z représentent chacun un groupement acide ou un bras espaceur fonctionnalisé ;

- les composés de formule générale XVI :



10 dans laquelle les substituants R₁, R₂ et les descripteurs m, n, p et q sont définis comme précédemment, et R est un groupe labile par hydrogénéolyse

- et les composés de formule générale XVII



20 dans laquelle A est de l'oxygène et les substituants W, R₁, R₂, m, n, p, q, r, s ont les significations fournies antérieurement

ceux-ci étant sous forme énantiomérique pure ou sous forme de mélanges de stéréoisomères.

25 32. Les compositions pharmaceutiques renfermant à titre de principe actif au moins un composé de formule générale I selon la revendication 1, sous forme neutre ou chargée, en association ou en mélange avec un excipient ou un véhicule inerte, non toxique, pharmaceutiquement acceptable.

30 33. Les compositions pharmaceutiques selon la revendication 32, renfermant à titre de principe actif au moins un sel d'un composé de formule générale I, avec une base minérale ou organique, thérapeutiquement compatible.

34. Les compositions pharmaceutiques selon la revendication 32, à base d'un composé de formule générale I, sous forme énantiomériquement pure ou sous forme de mélange de stéréoisomères, en association ou en mélange avec un excipient ou un véhicule pharmaceutique.

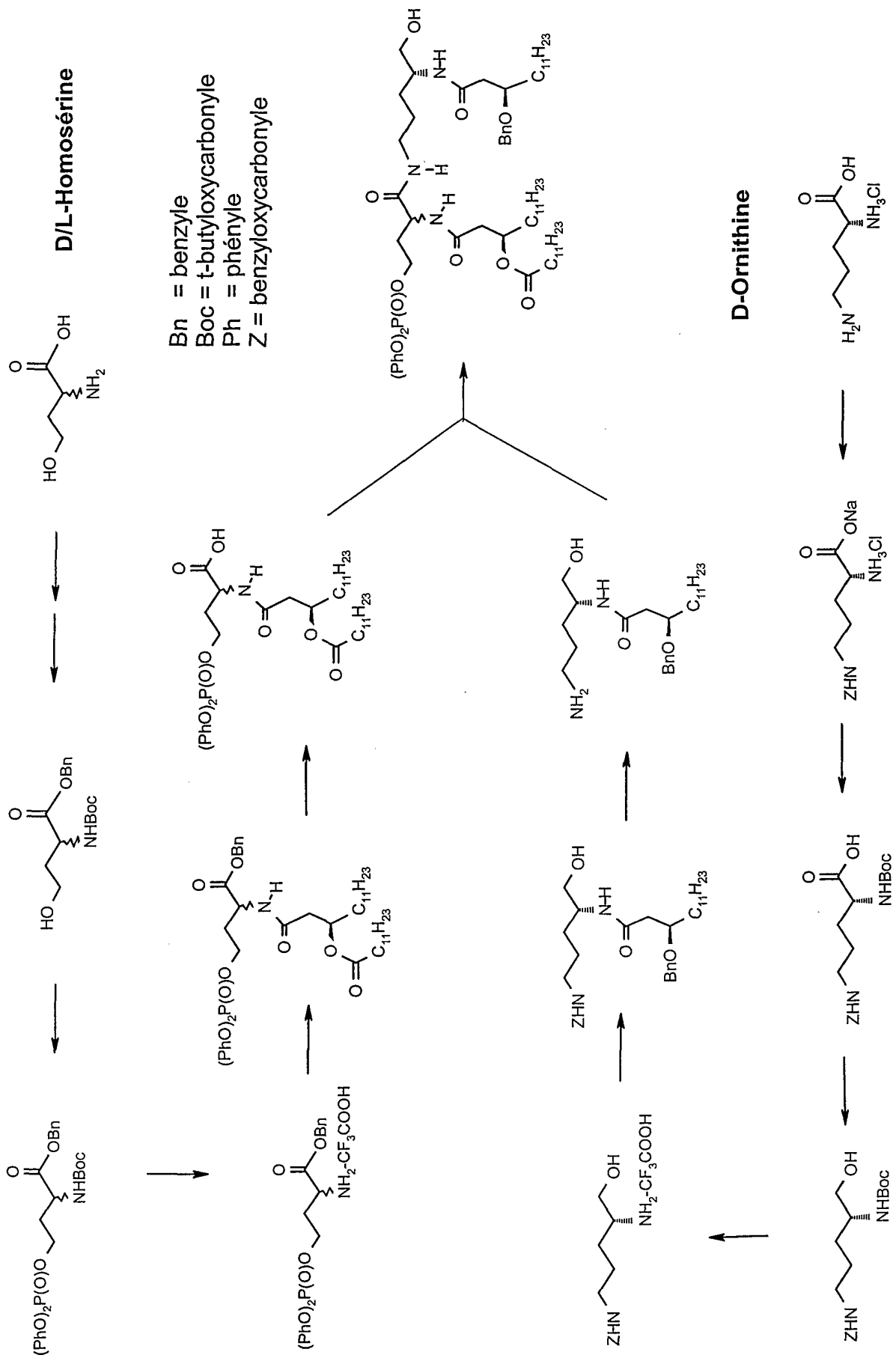
5

35. Les composés selon la revendication 1, greffés sur un antigène pour moduler la réponse immunitaire, et les compositions pharmaceutiques qui renferment de tels conjugués.

10 36. Les composés selon la revendication 1, greffés sur un composé pharmacophore pour en améliorer l'action thérapeutique et/ou son ciblage, et les compositions pharmaceutiques renfermant de tels composés.

15

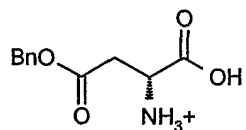
FIGURE 1



Acide D-aspartique
β-benzyle ester

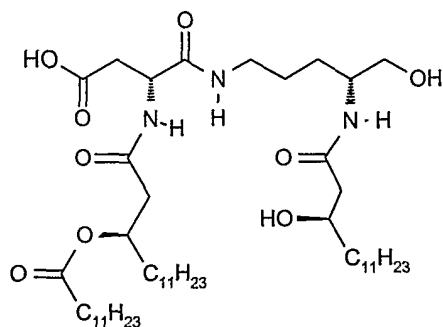
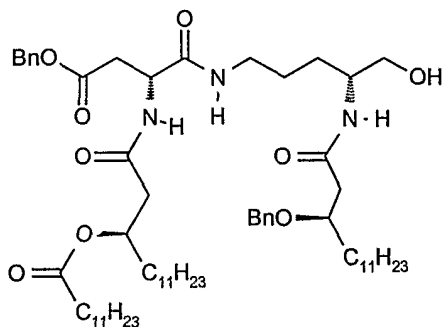
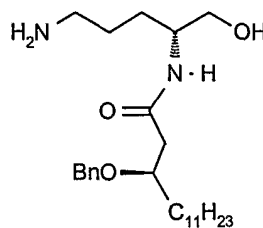
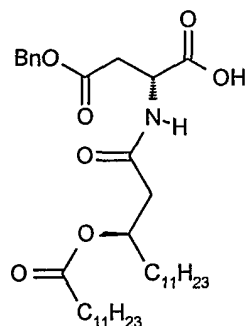
2/56

FIGURE 2



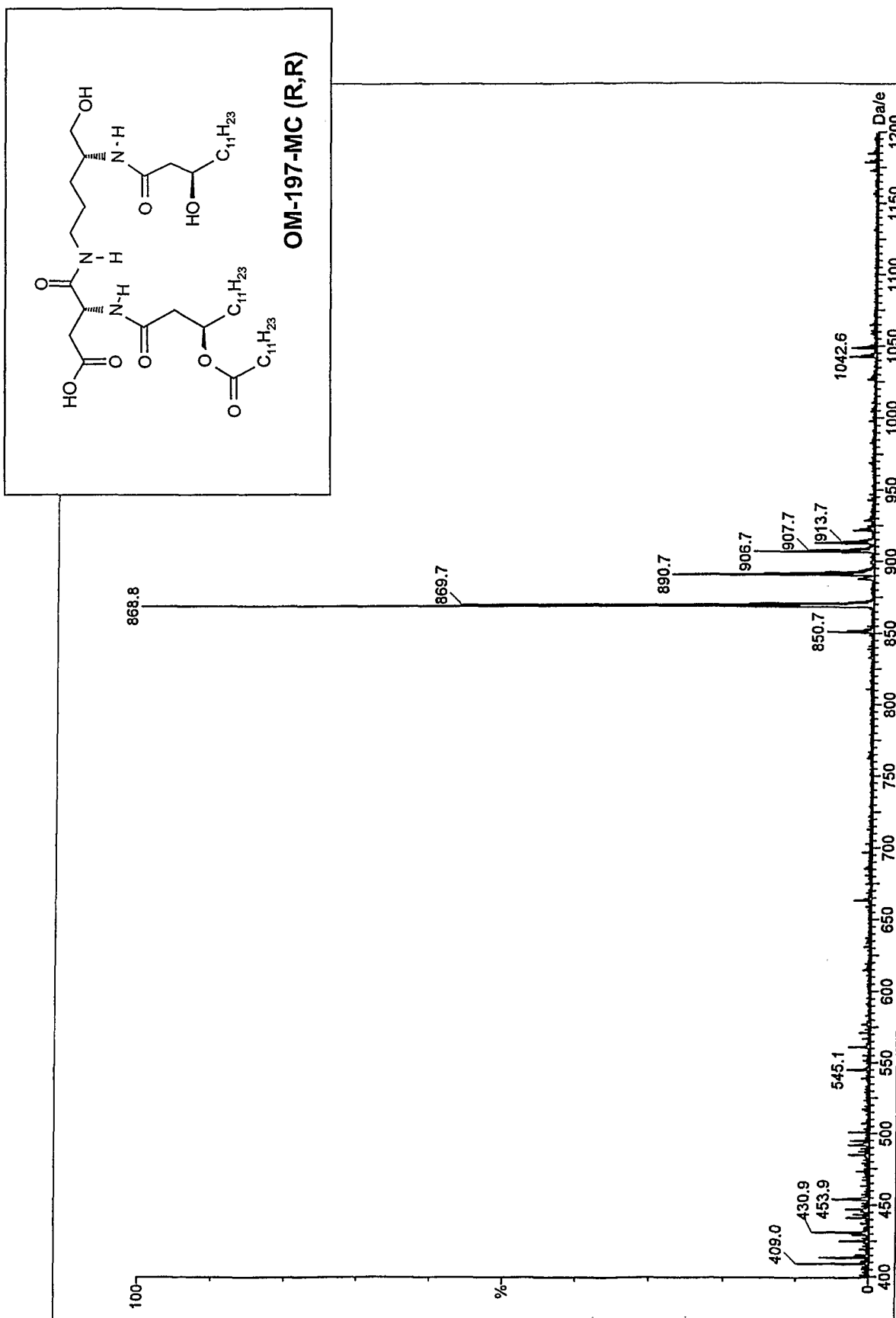
D-Ornithine

Bn = benzyle



OM-197-MC (R,R)

FIGURE 3



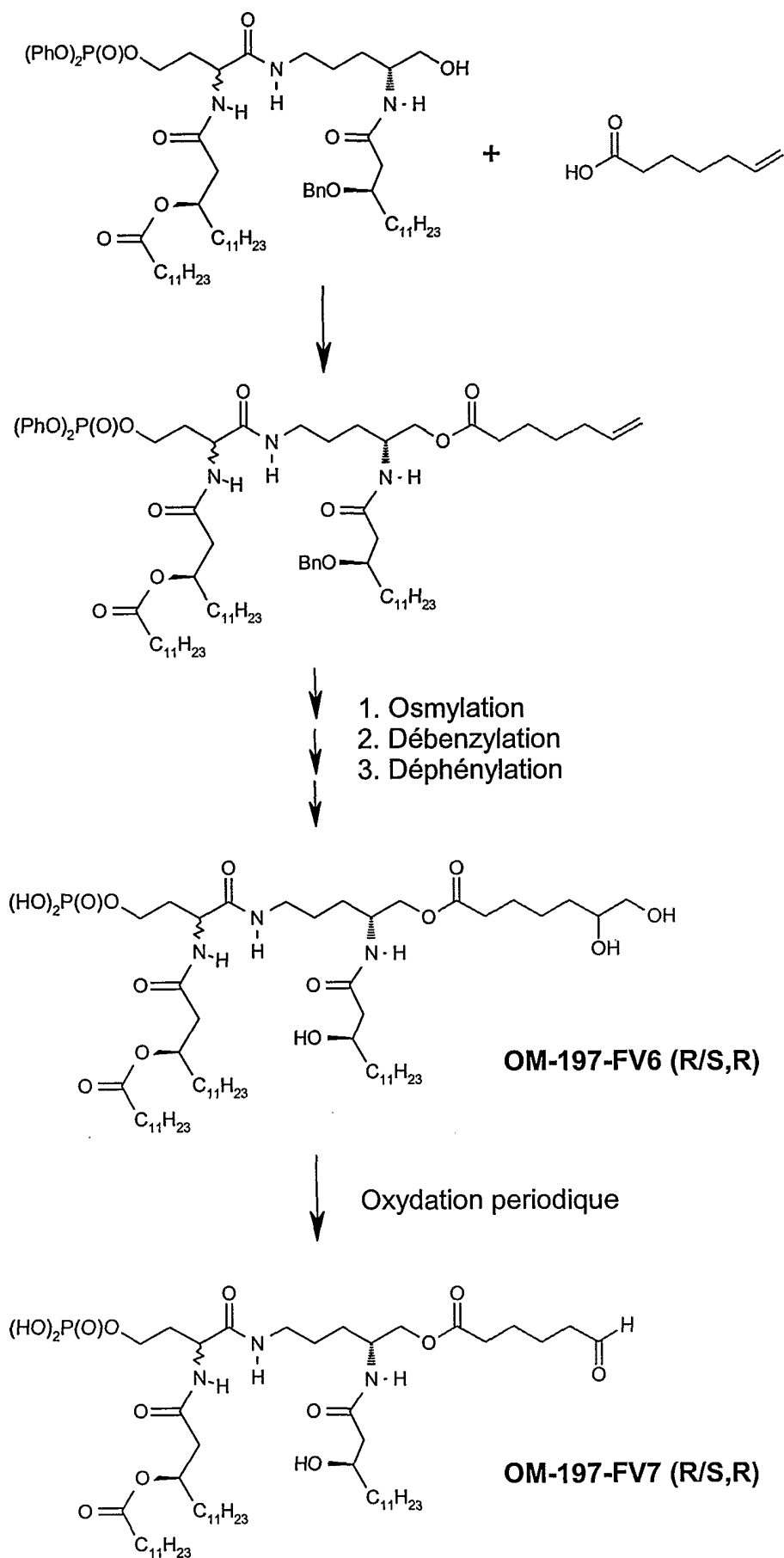


FIGURE 5

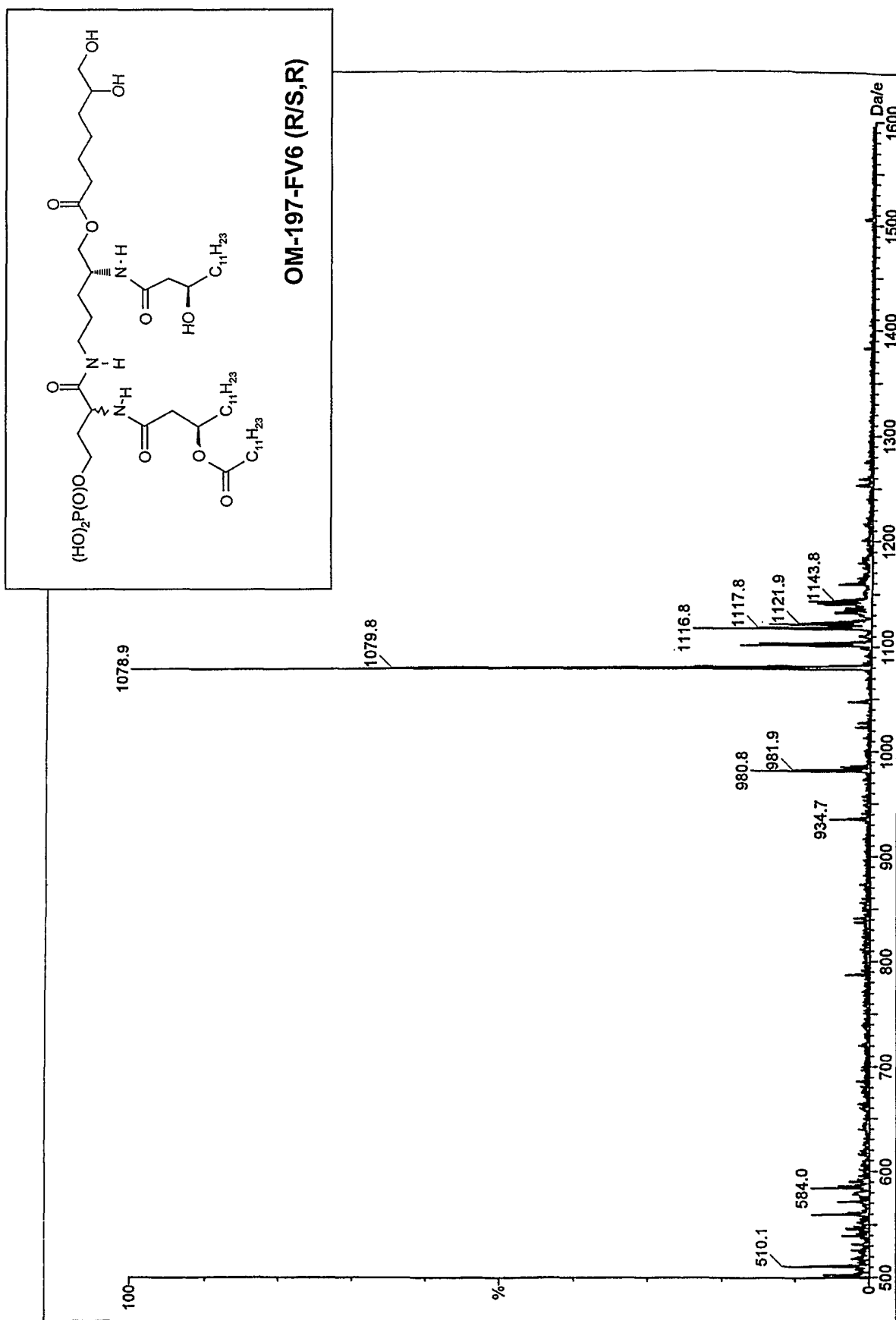


FIGURE 6

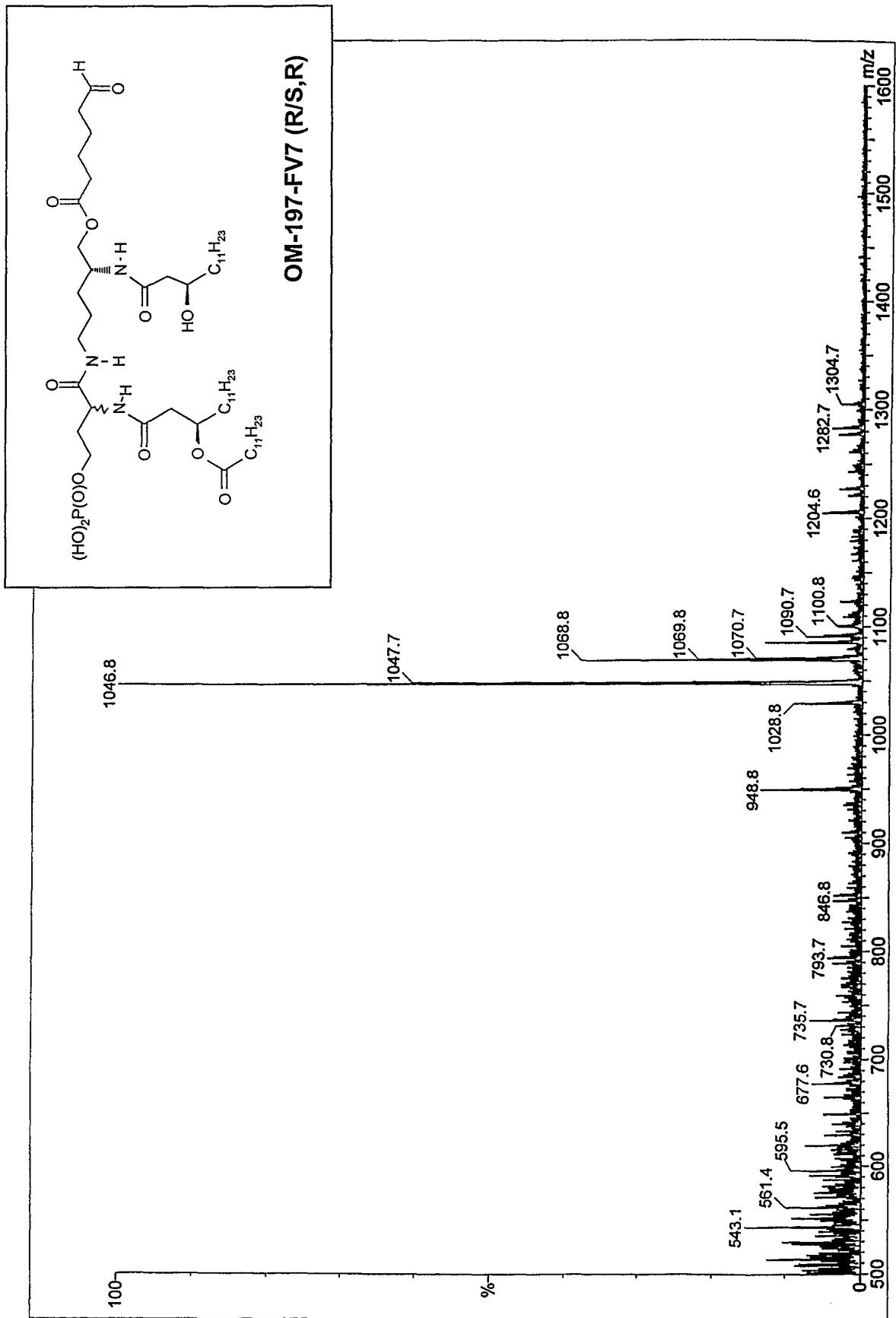


FIGURE 7

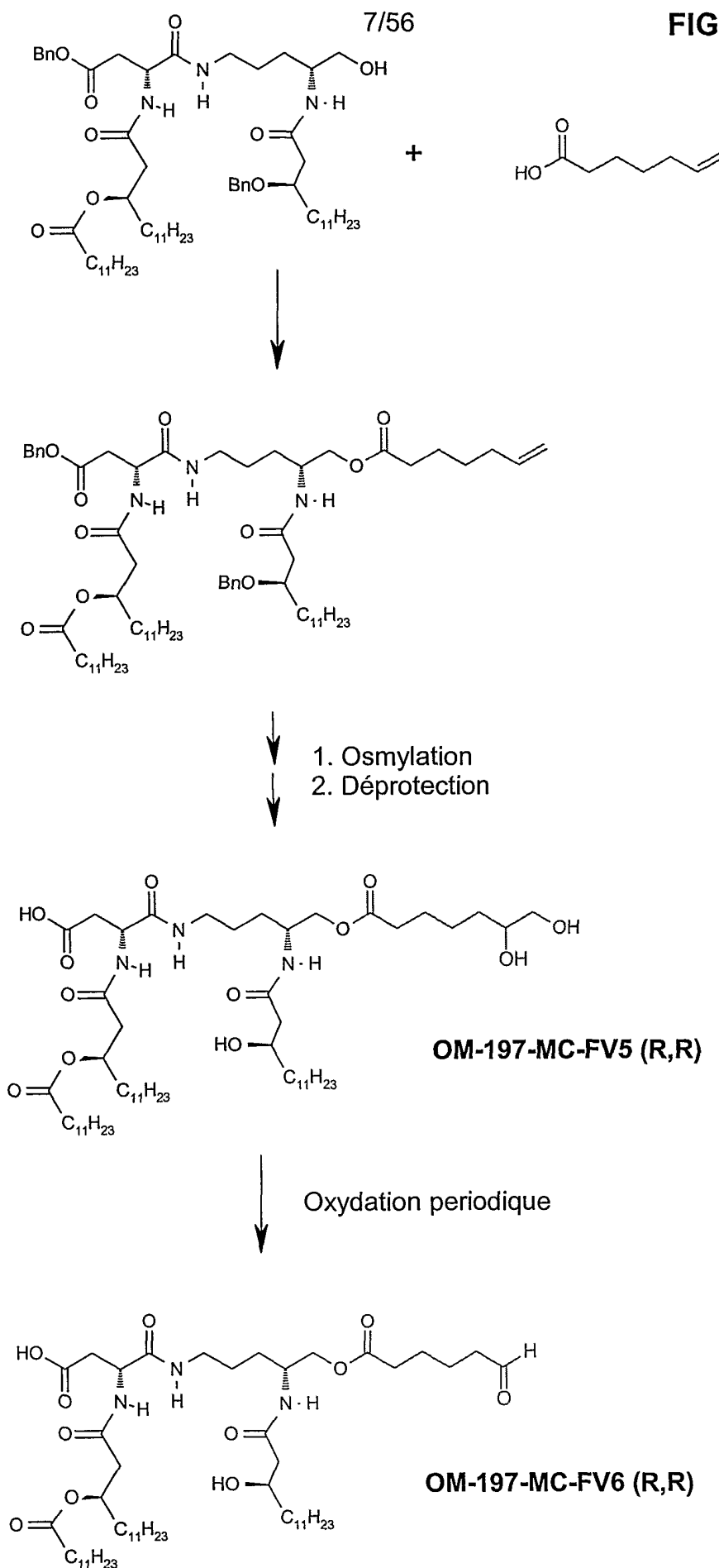


FIGURE 8

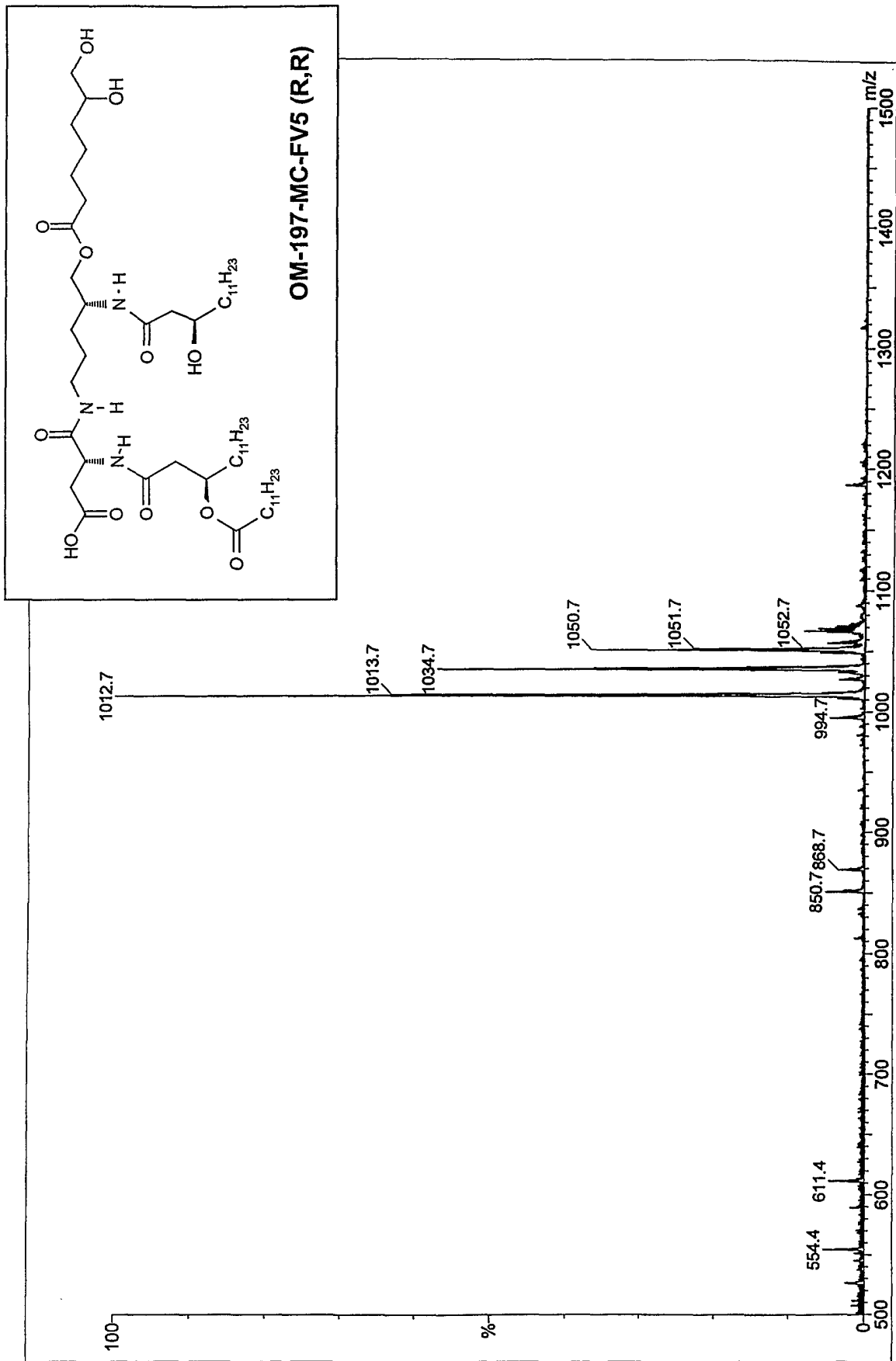


FIGURE 9

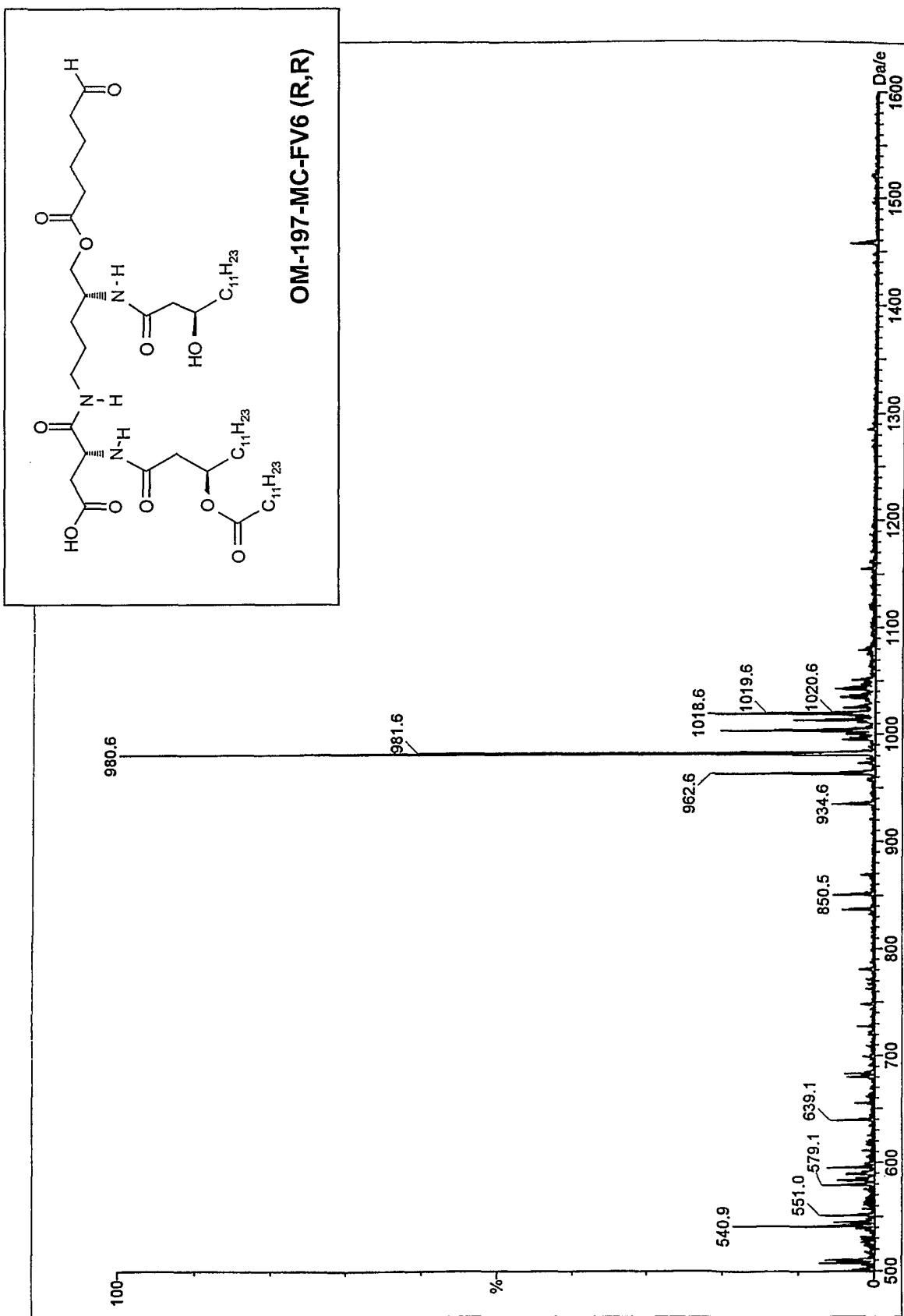
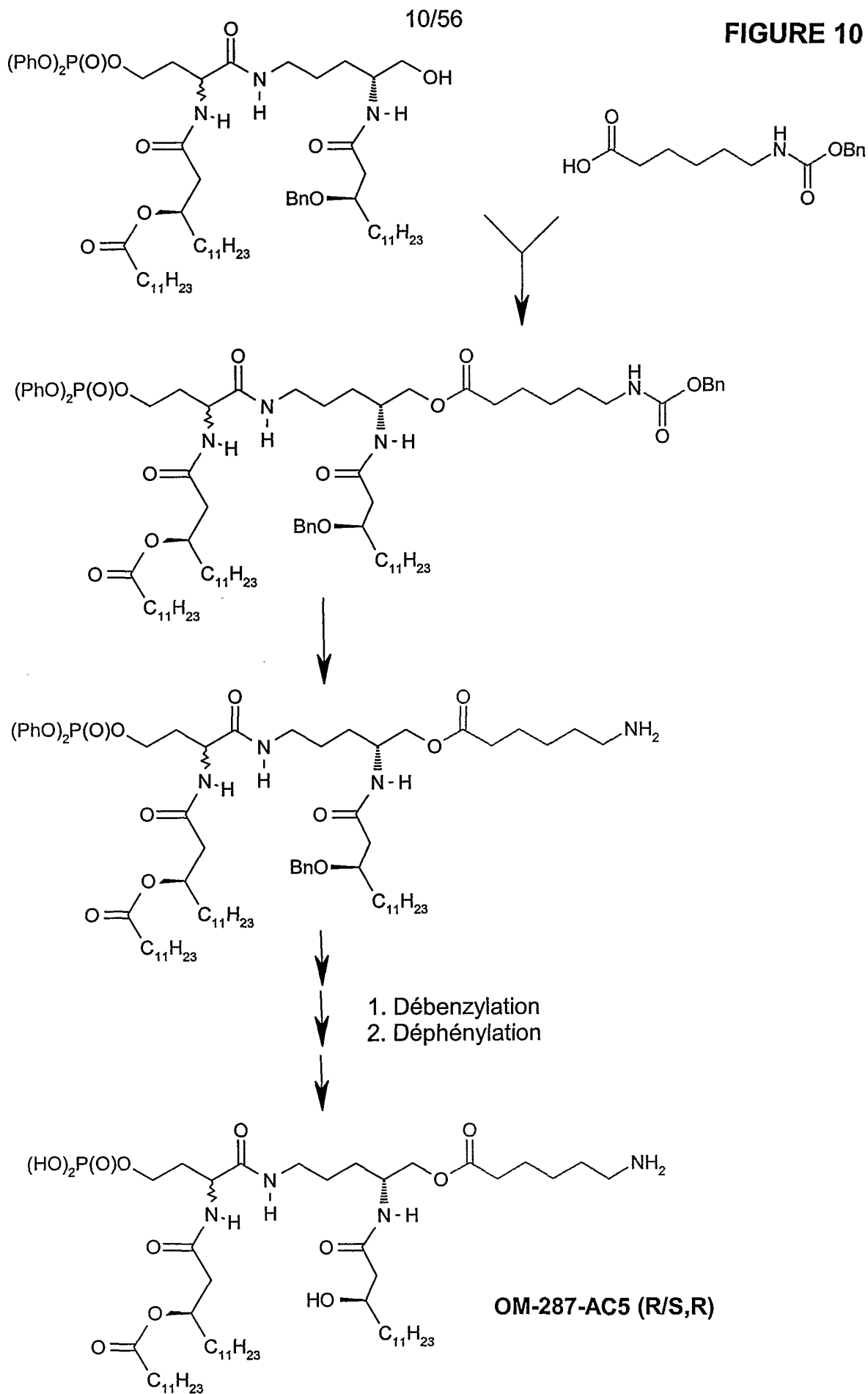
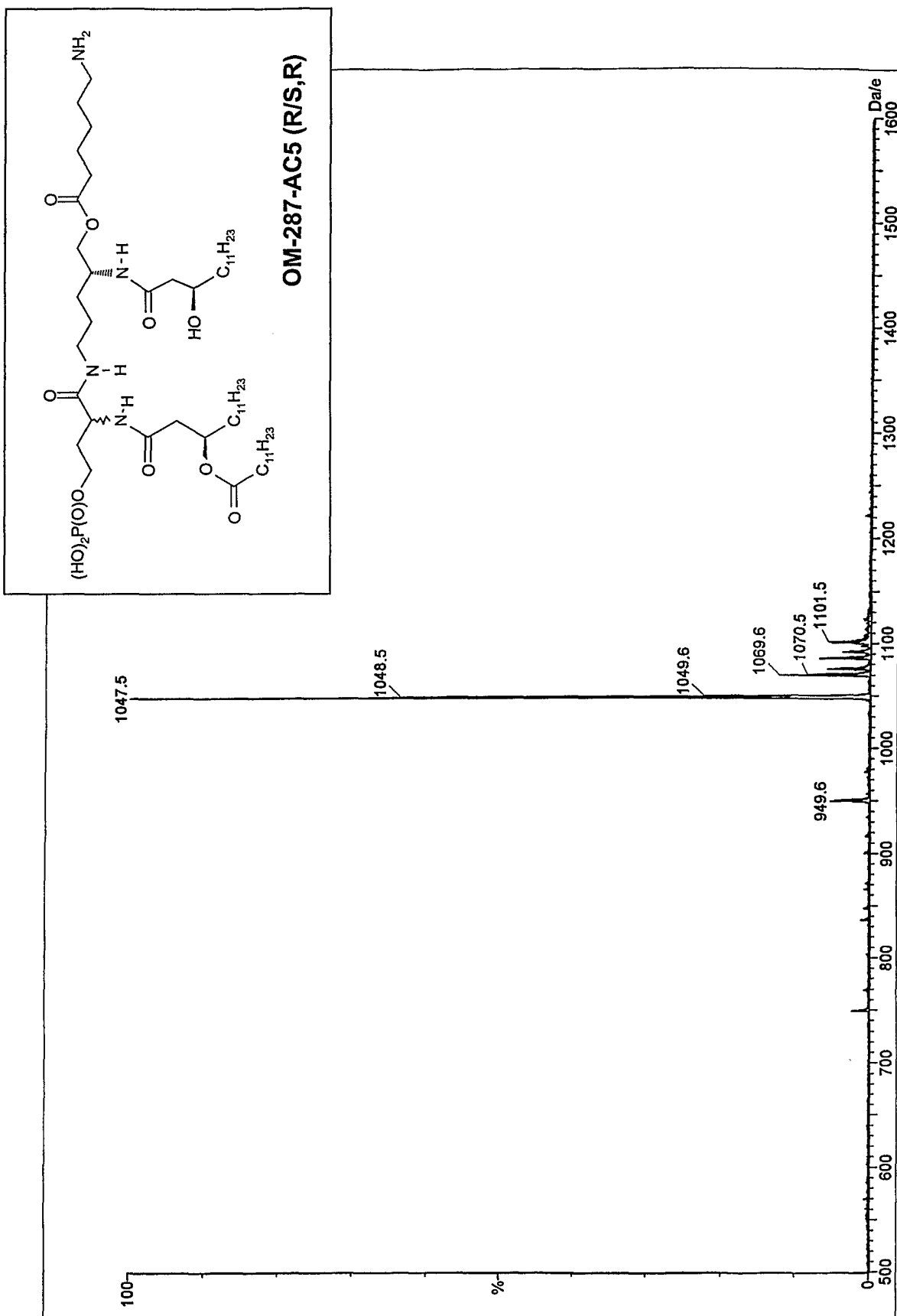


FIGURE 10





12/56

FIGURE 12

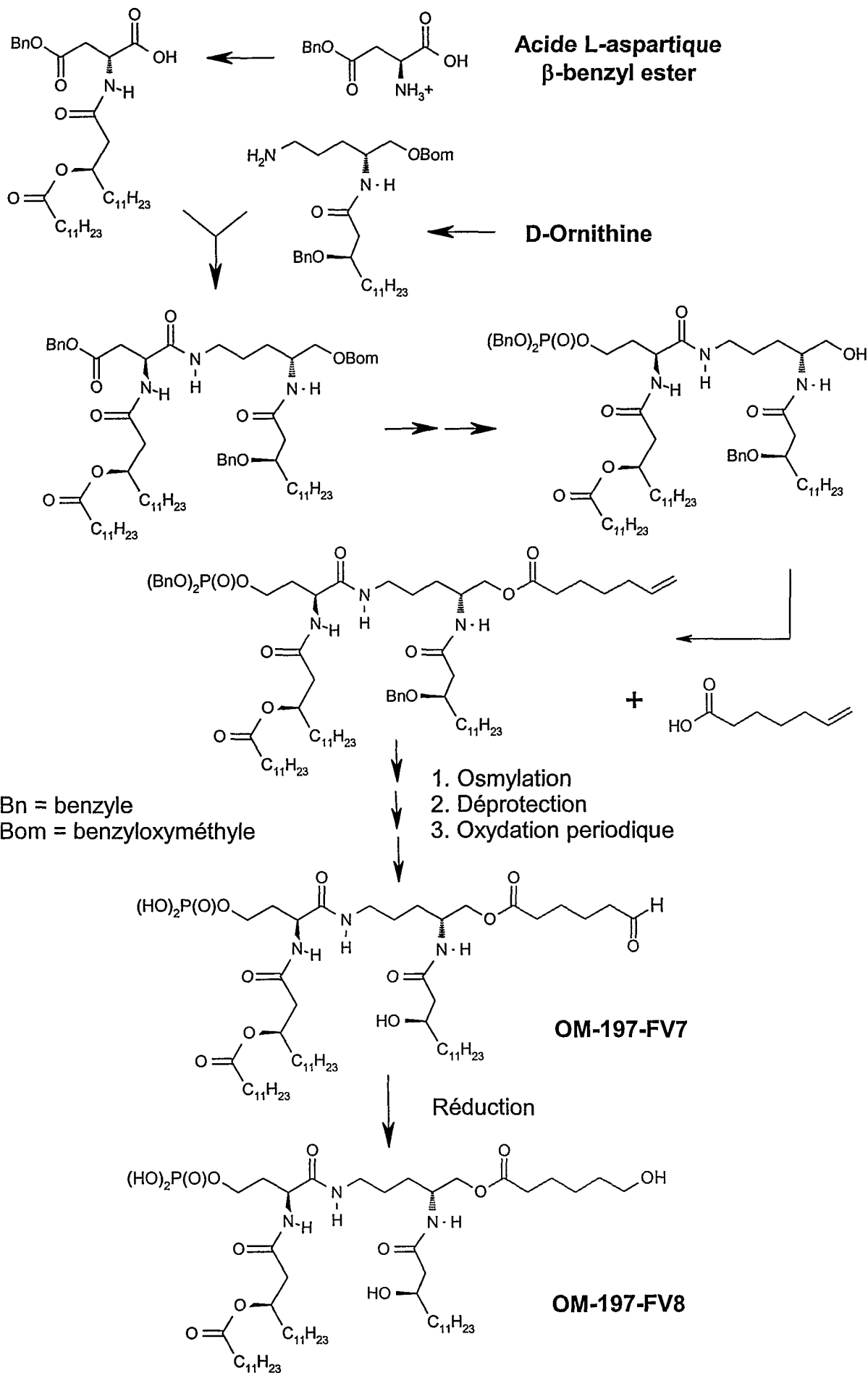


FIGURE 13



14/56

FIGURE 14

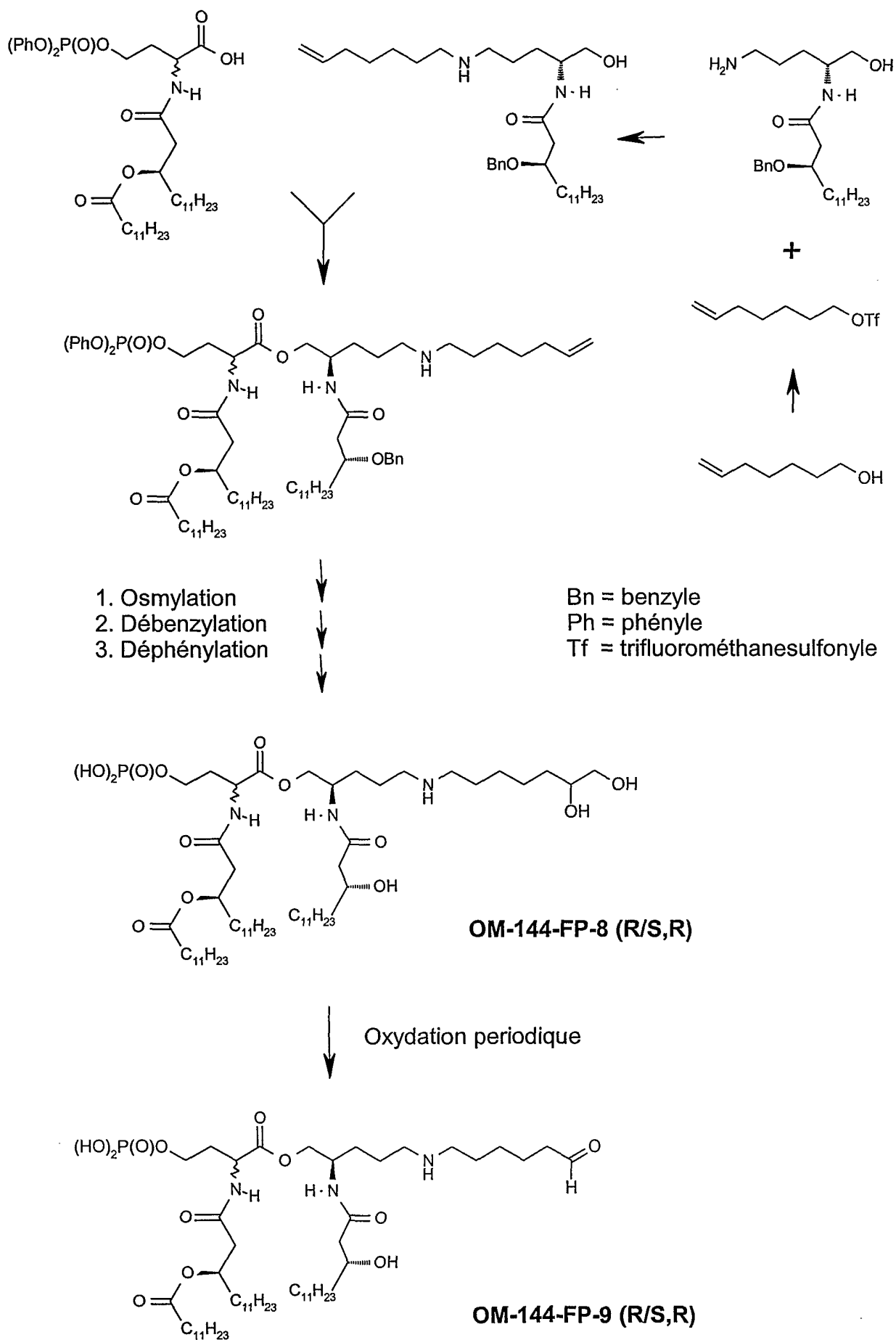


FIGURE 15

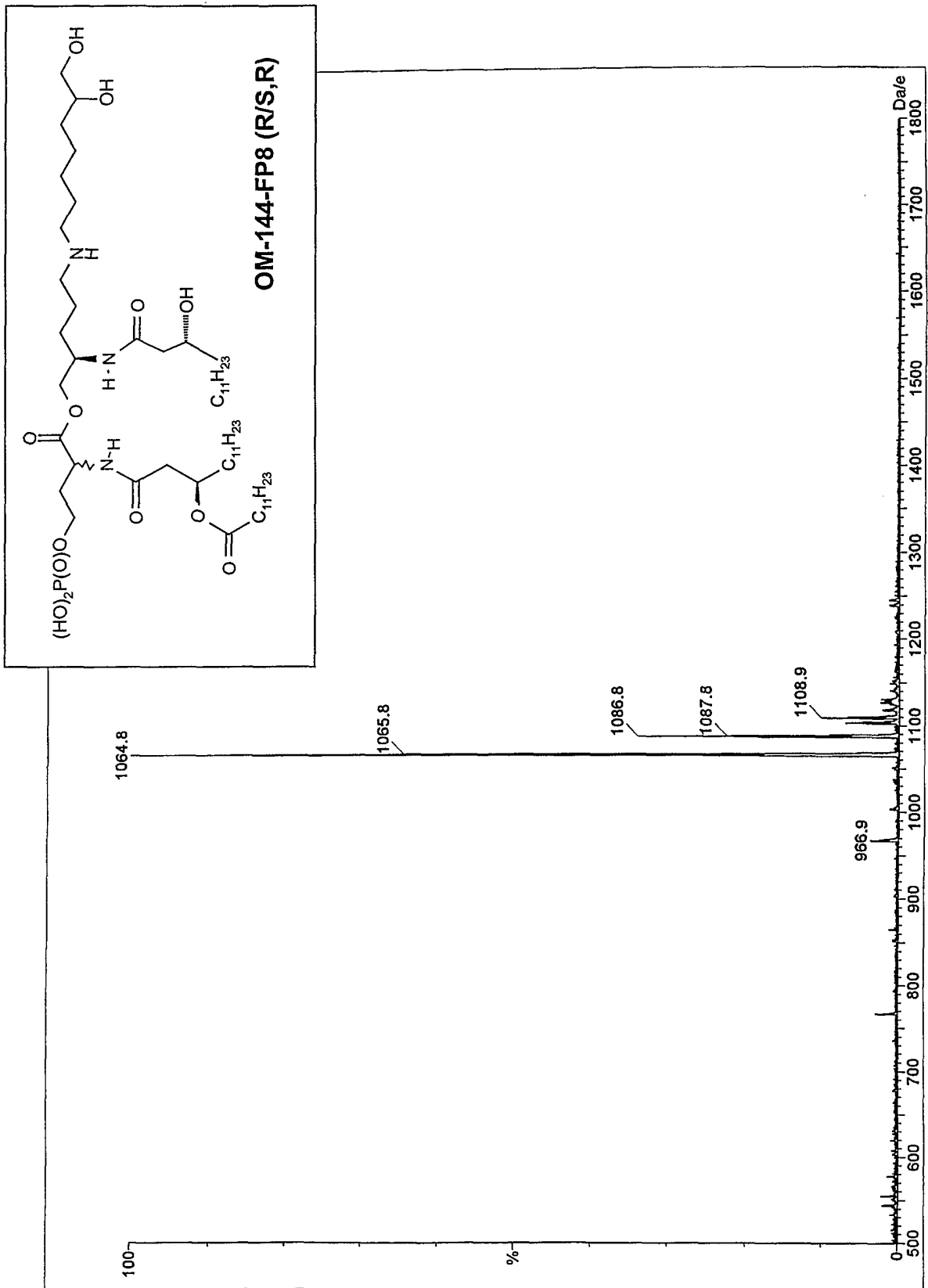
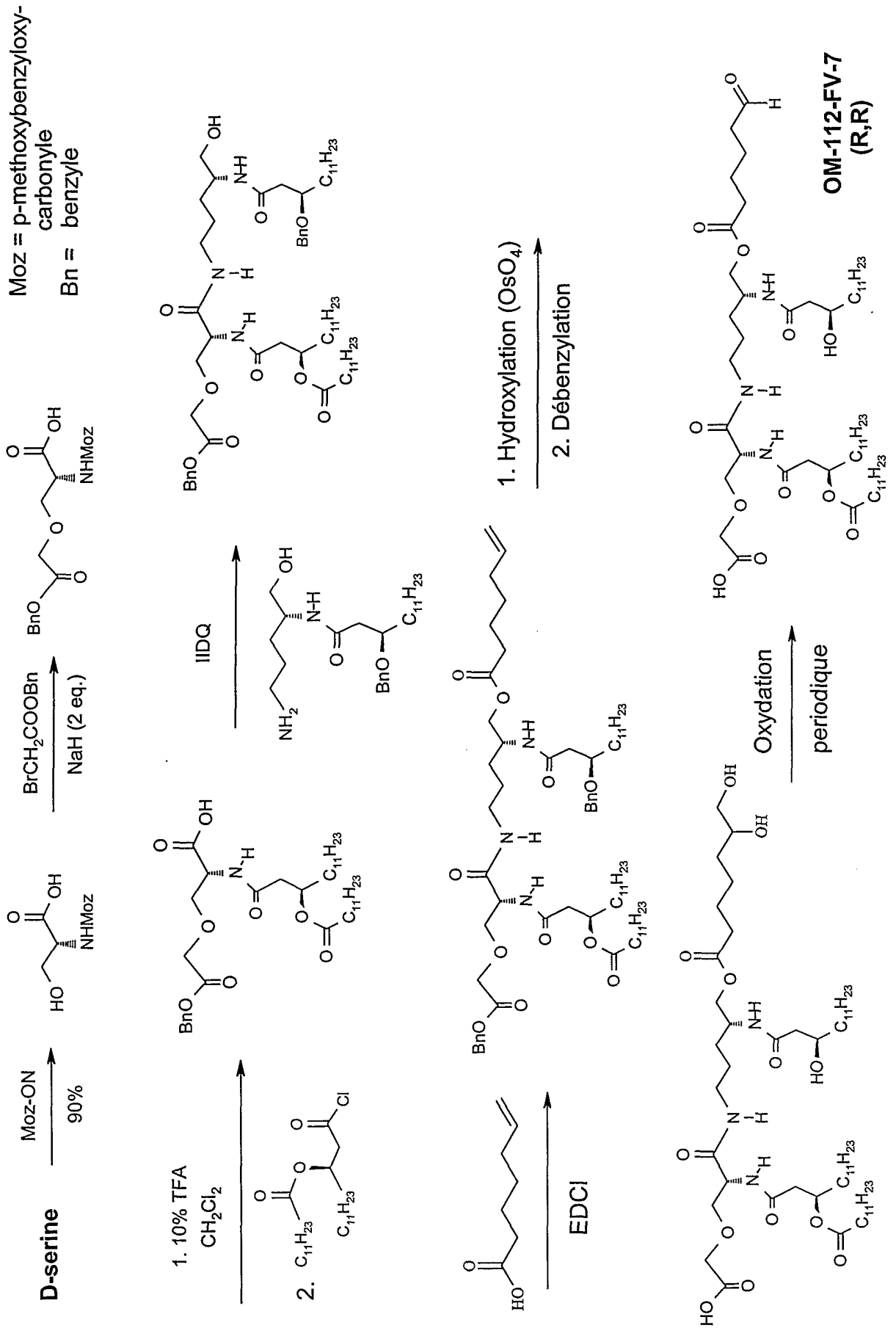
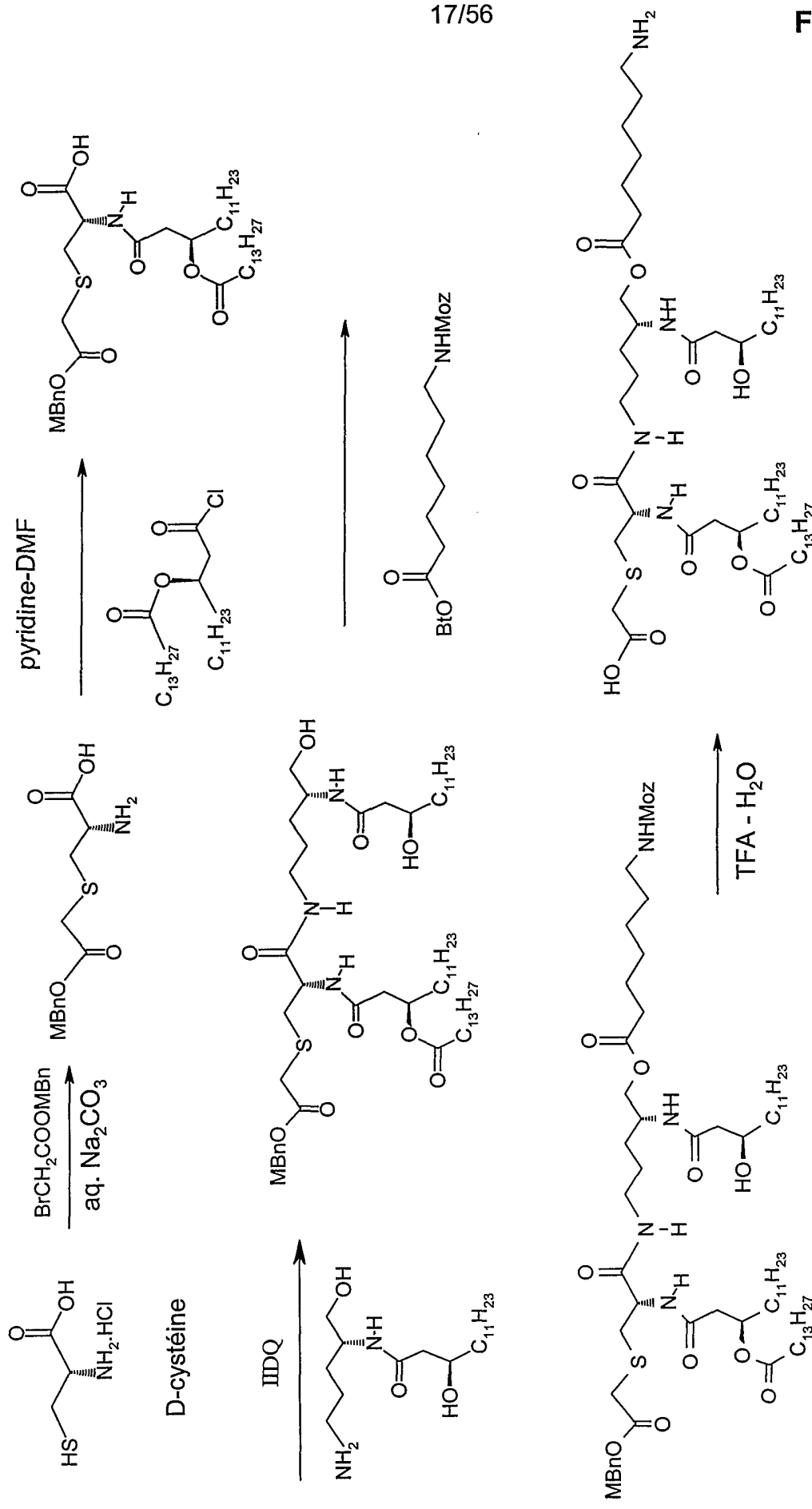


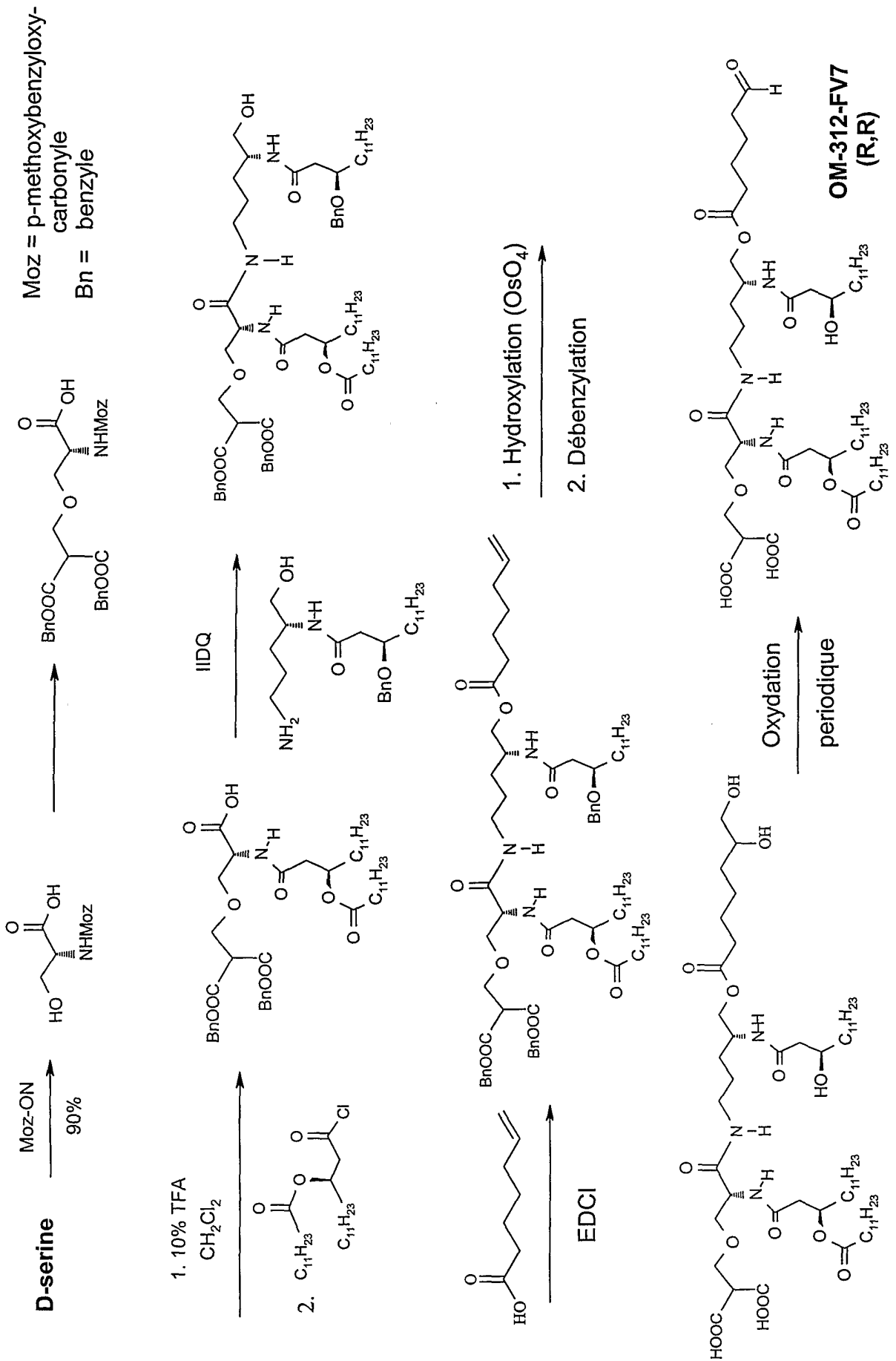
FIGURE 16





OM-212-AH1 (S,R)

Bt = benzotriazolyle
 MBn = p-methoxybenzyle
 Moz = p-methoxybenzyloxycarbonyl



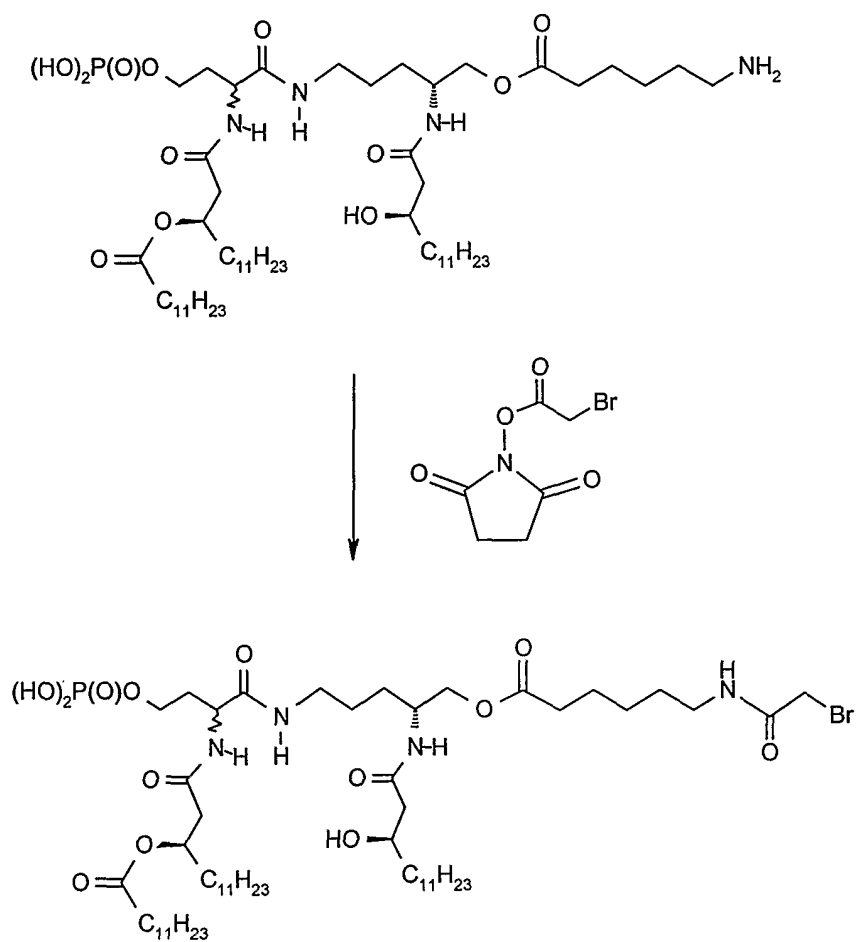
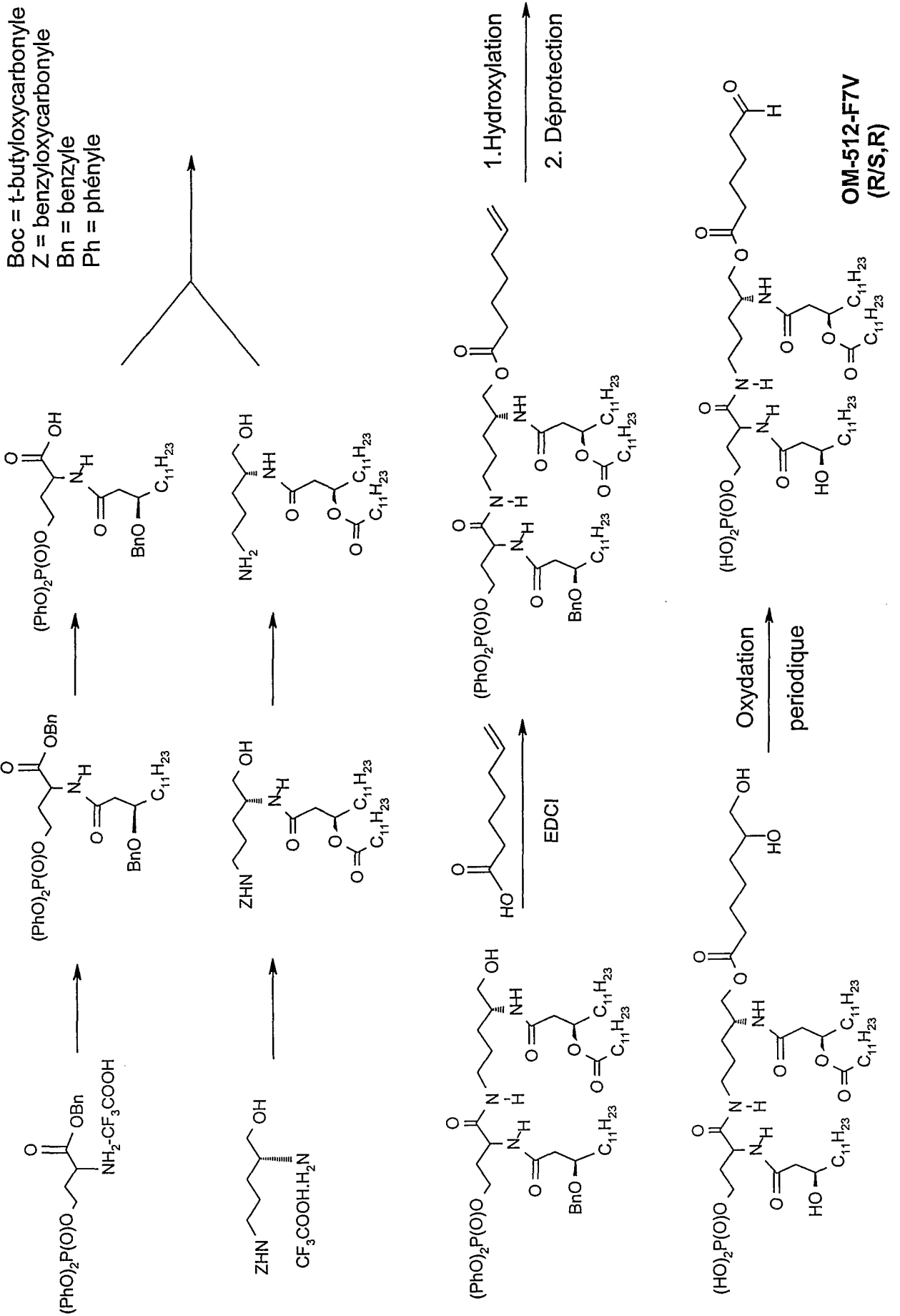
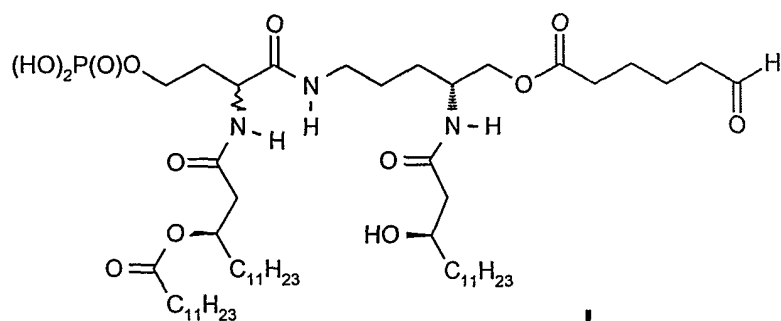
**OM-412-BA7 (R/S,R)**

FIGURE 20



21/56

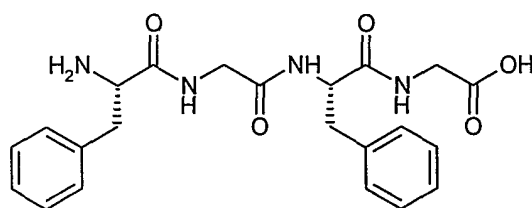
FIGURE 21



OM-197-FV7 (R/S,R)

1046.8 uma

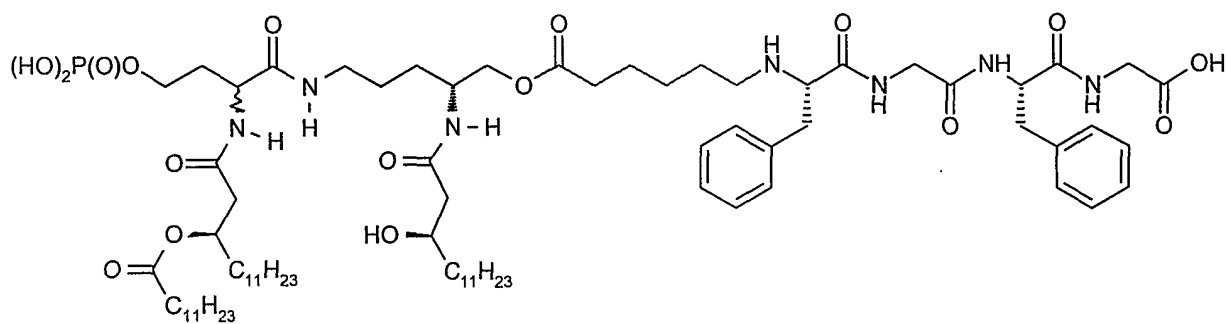
+



FGFG

426.5 uma

Amination réductrice



OM-197-FV-FGFG

1456.9 uma

FIGURE 22

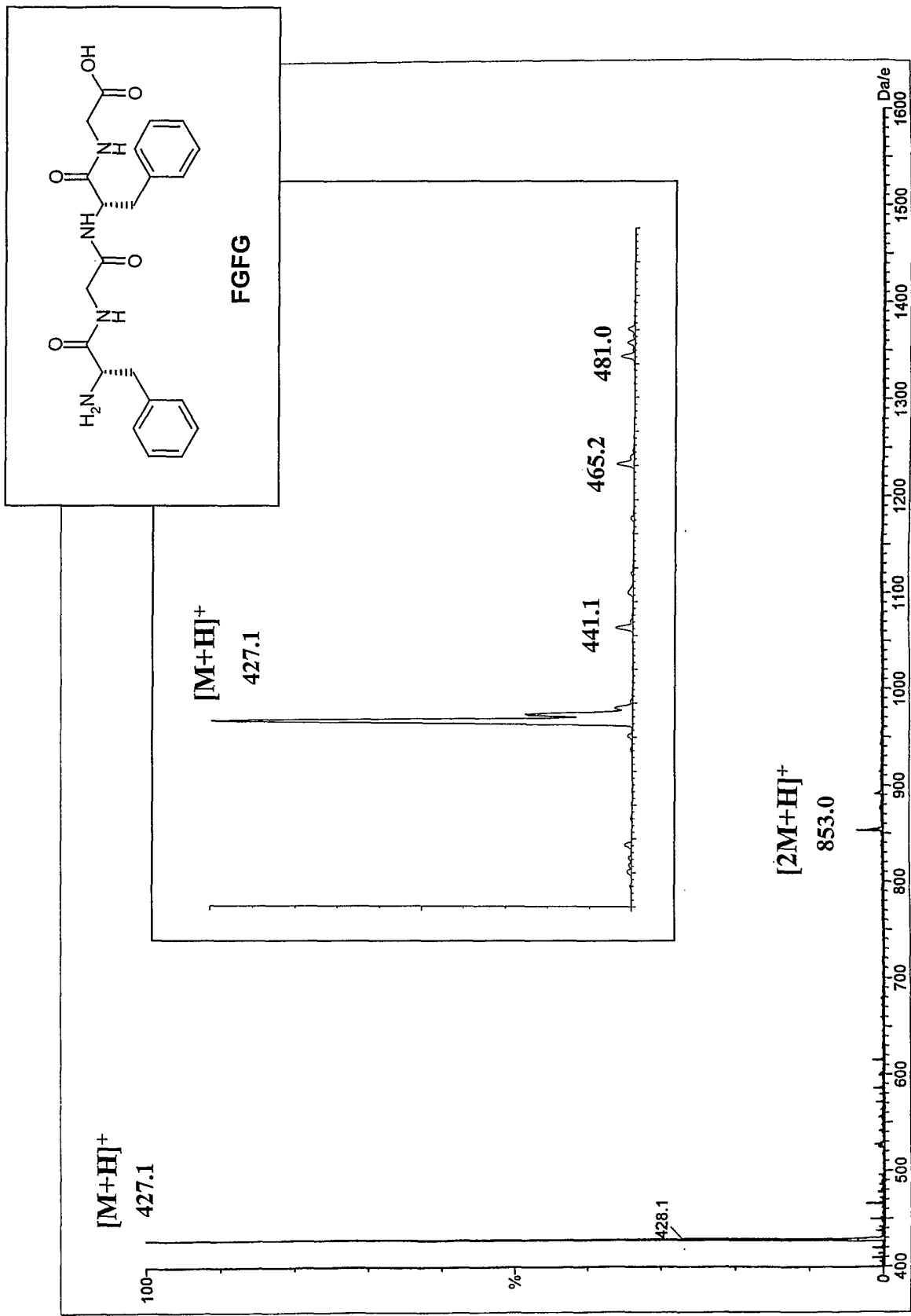




FIGURE 24

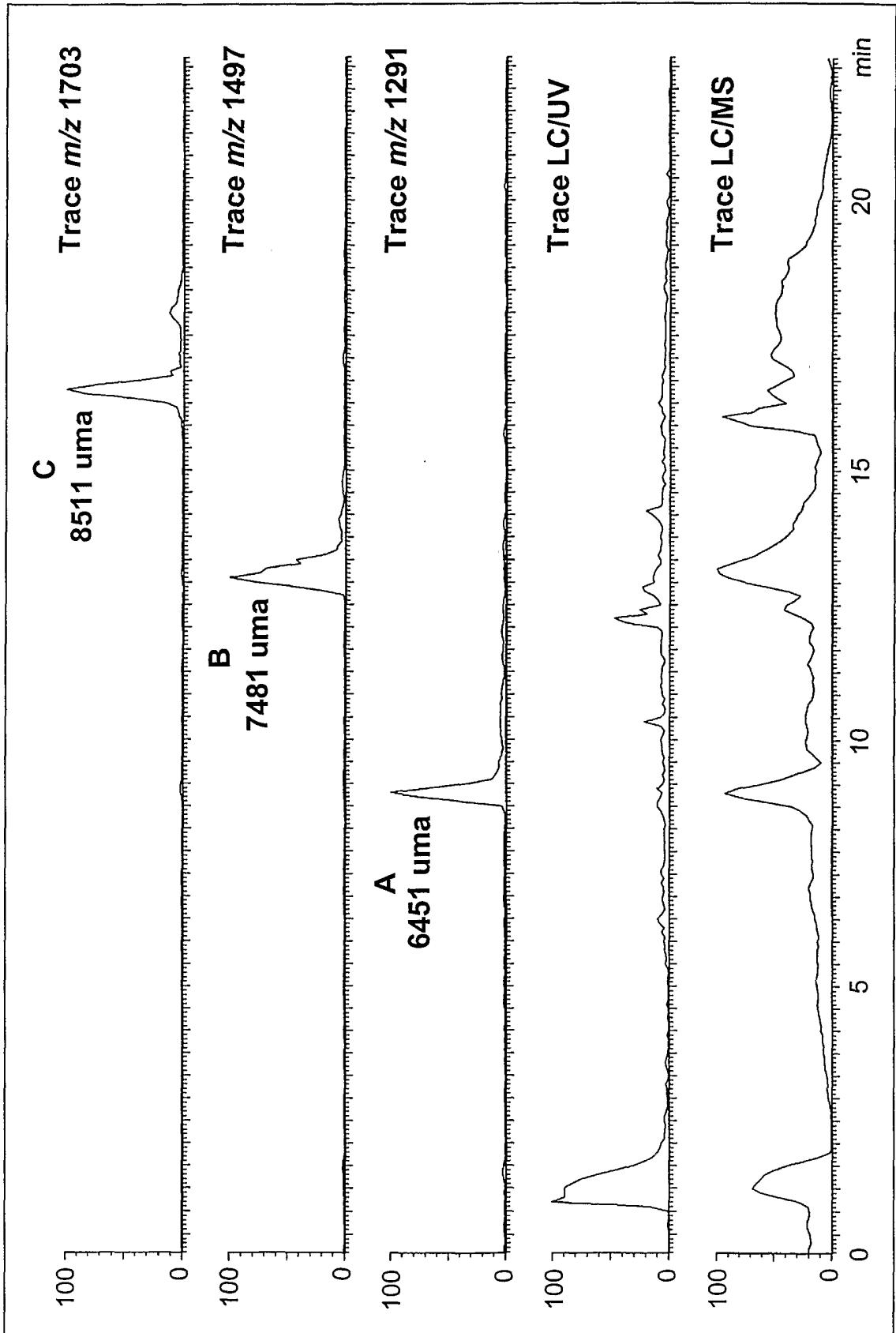


FIGURE 25

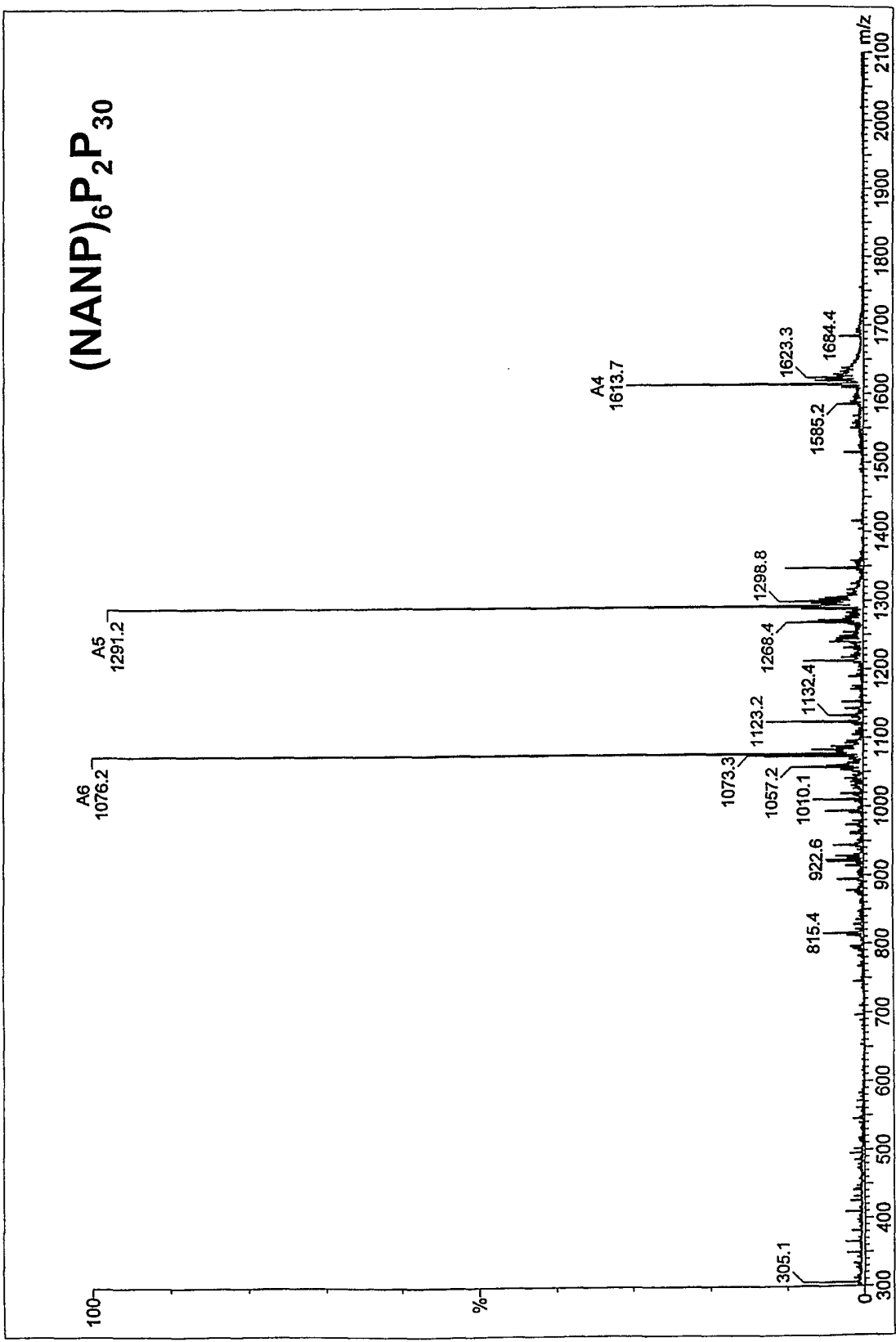


FIGURE 26

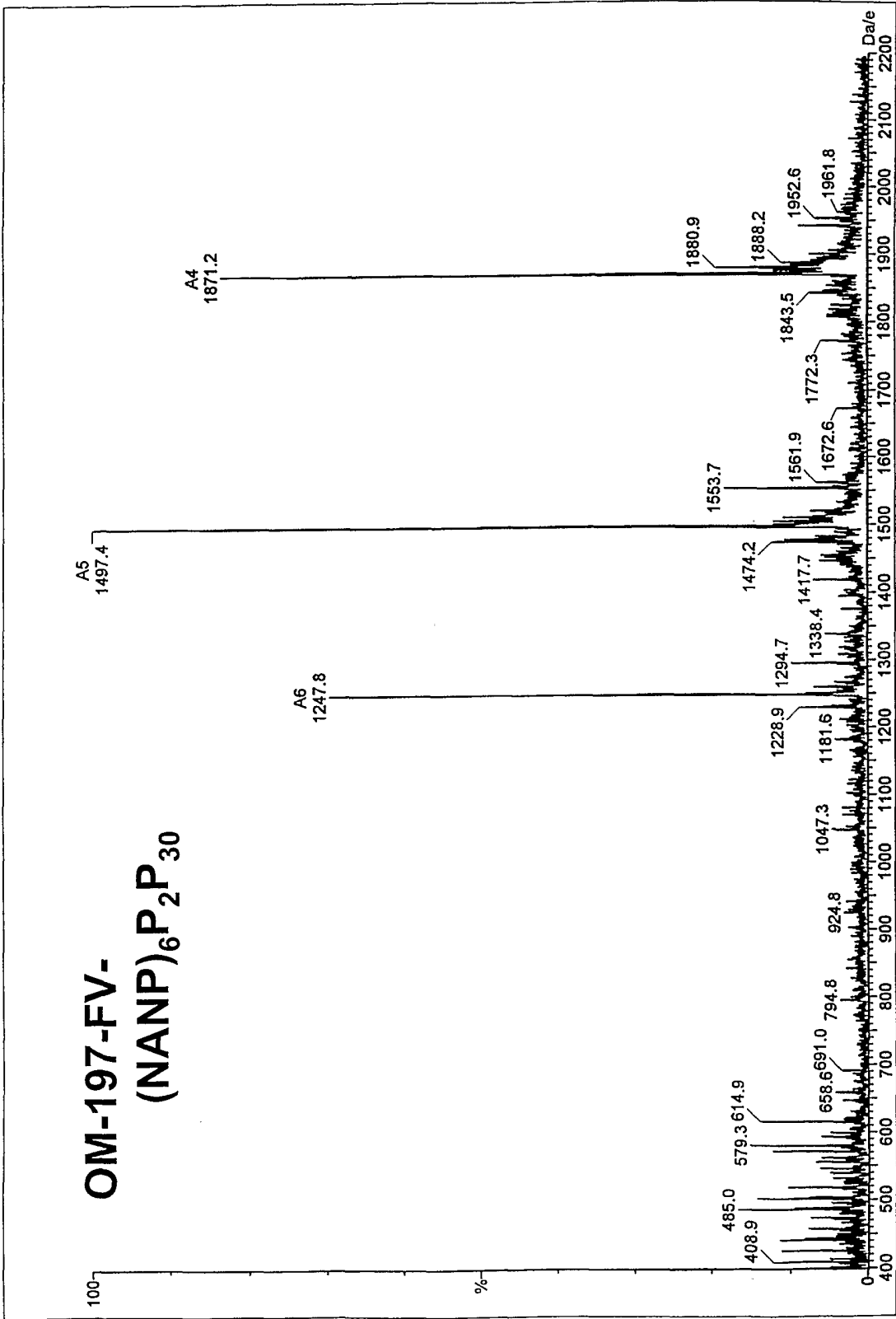


FIGURE 27

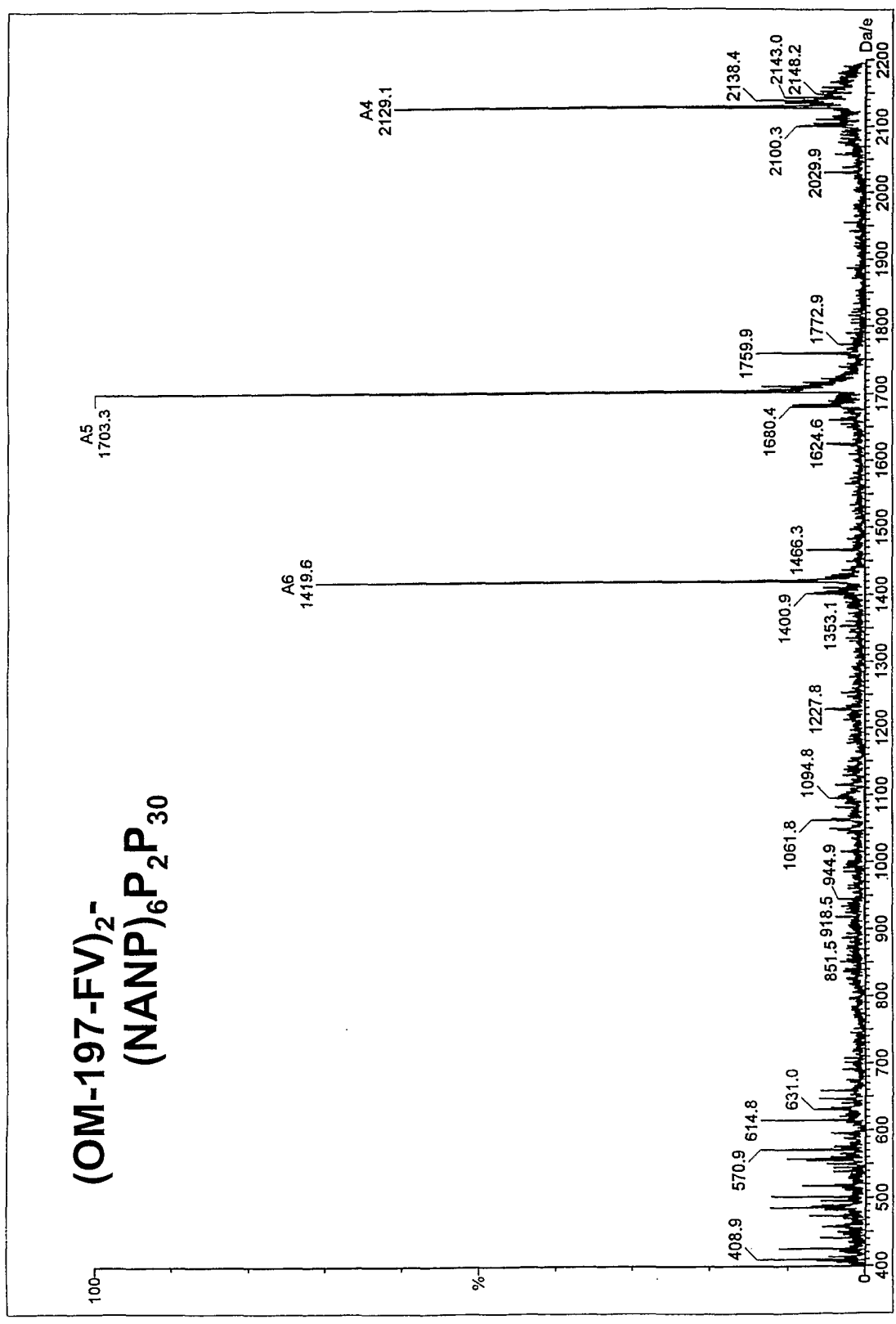


FIGURE 28

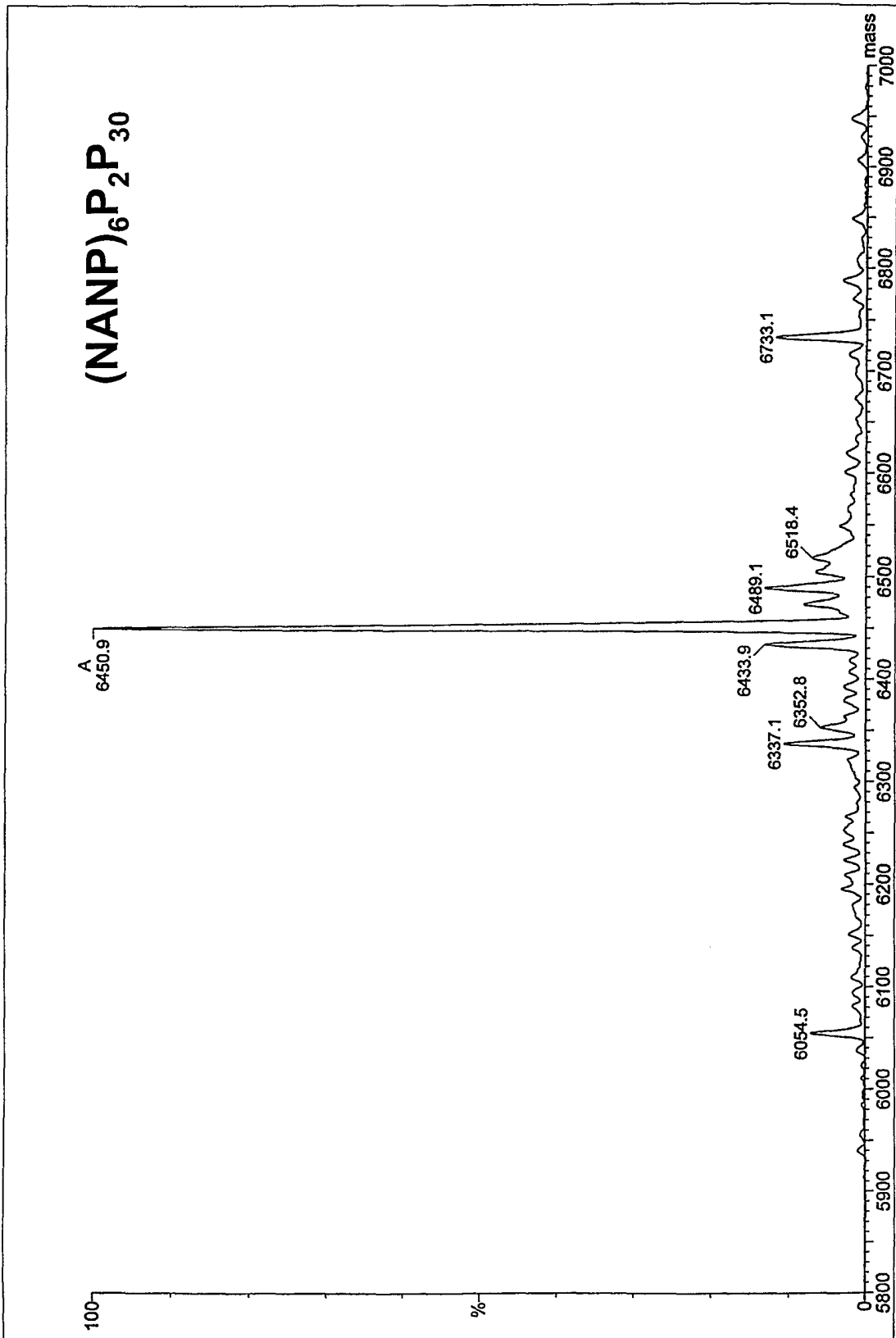


FIGURE 29

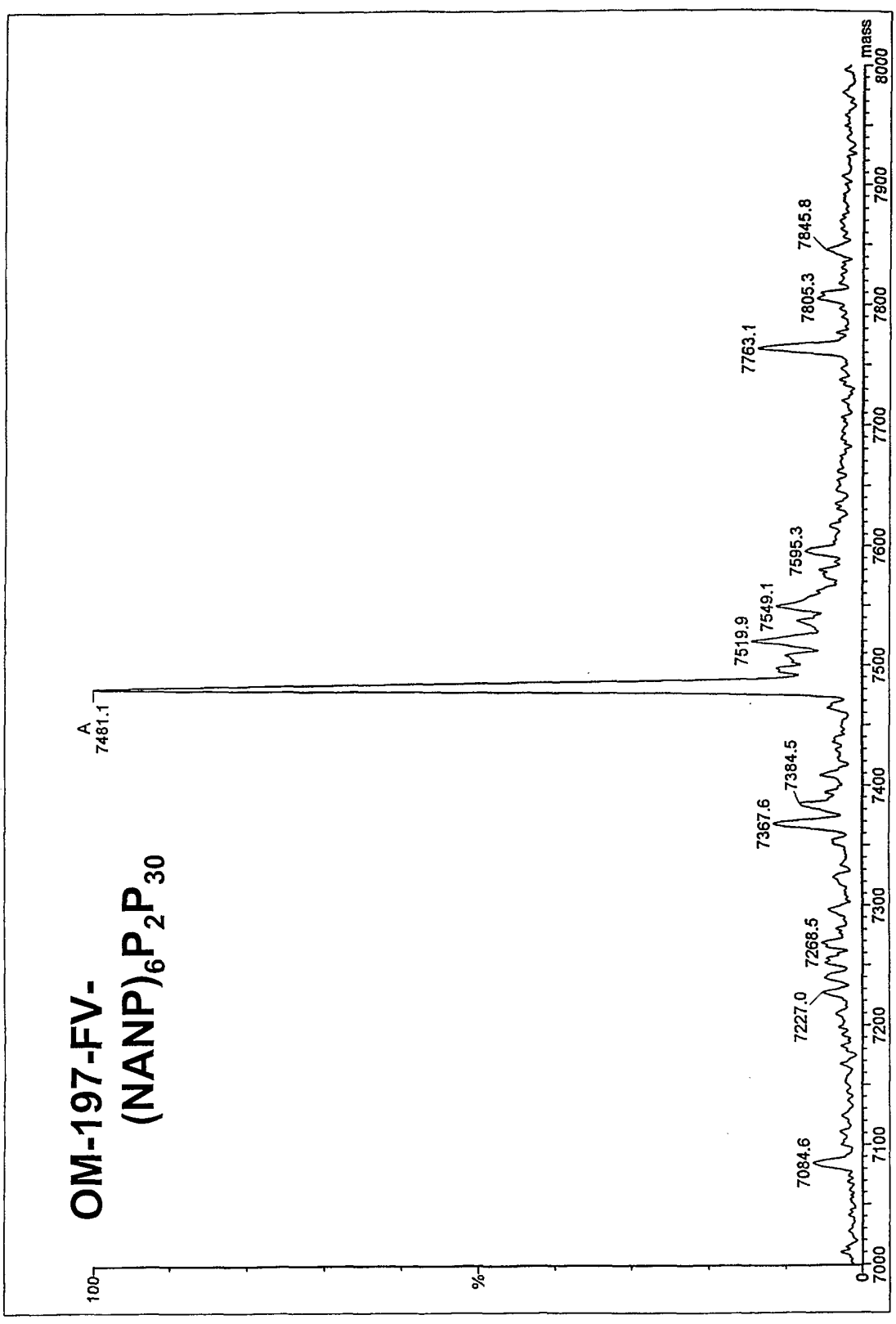


FIGURE 30

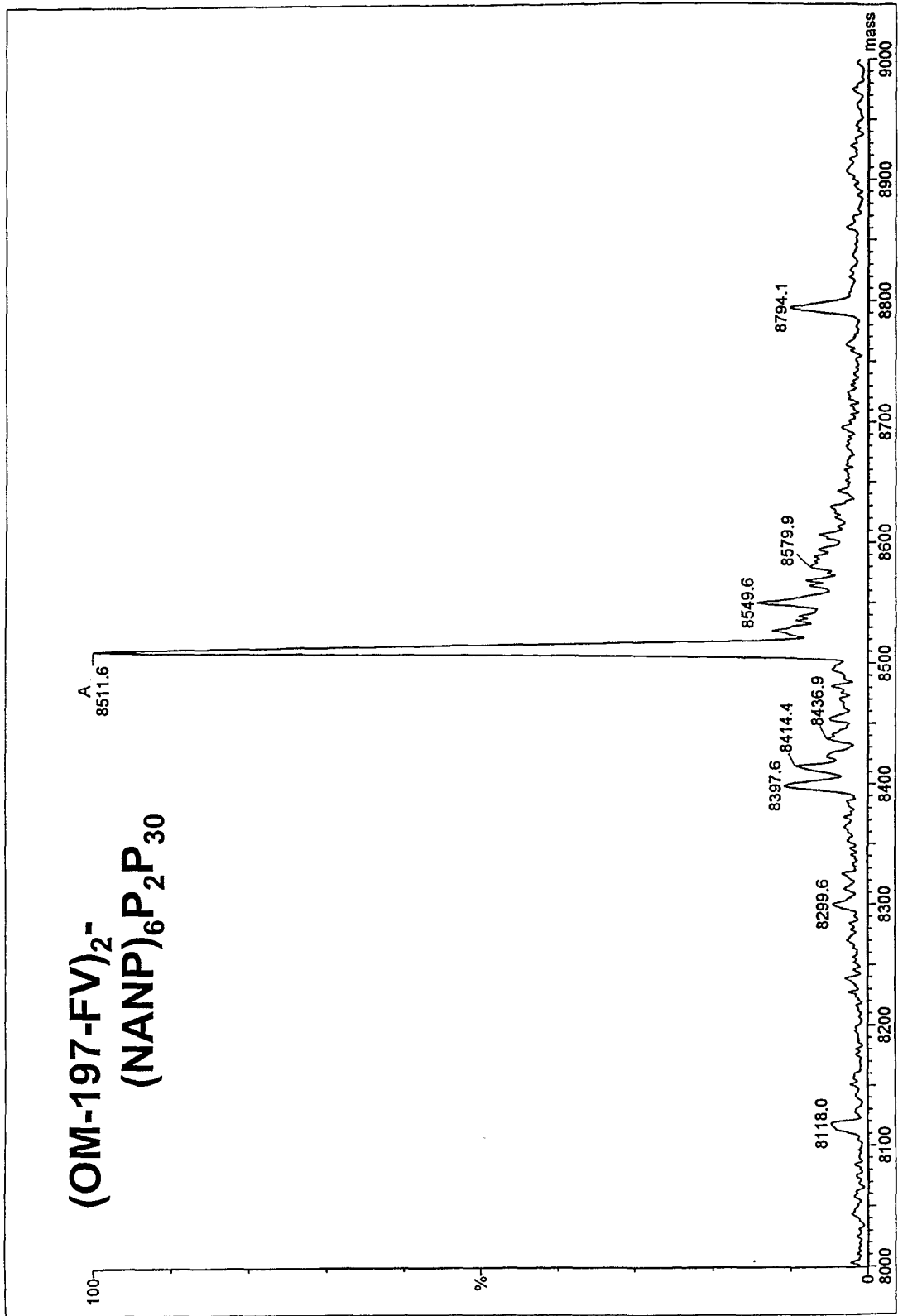


FIGURE 31

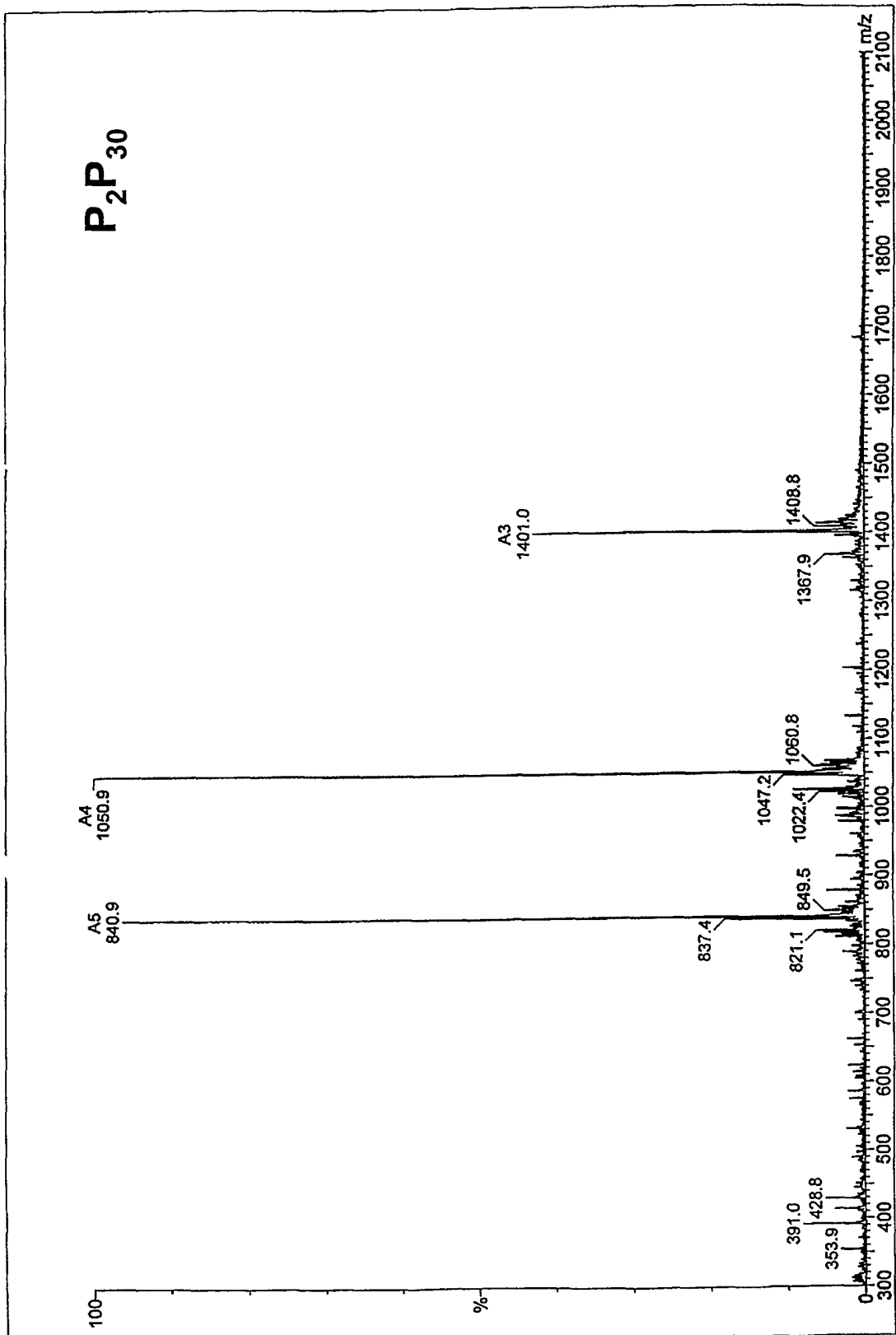


FIGURE 32

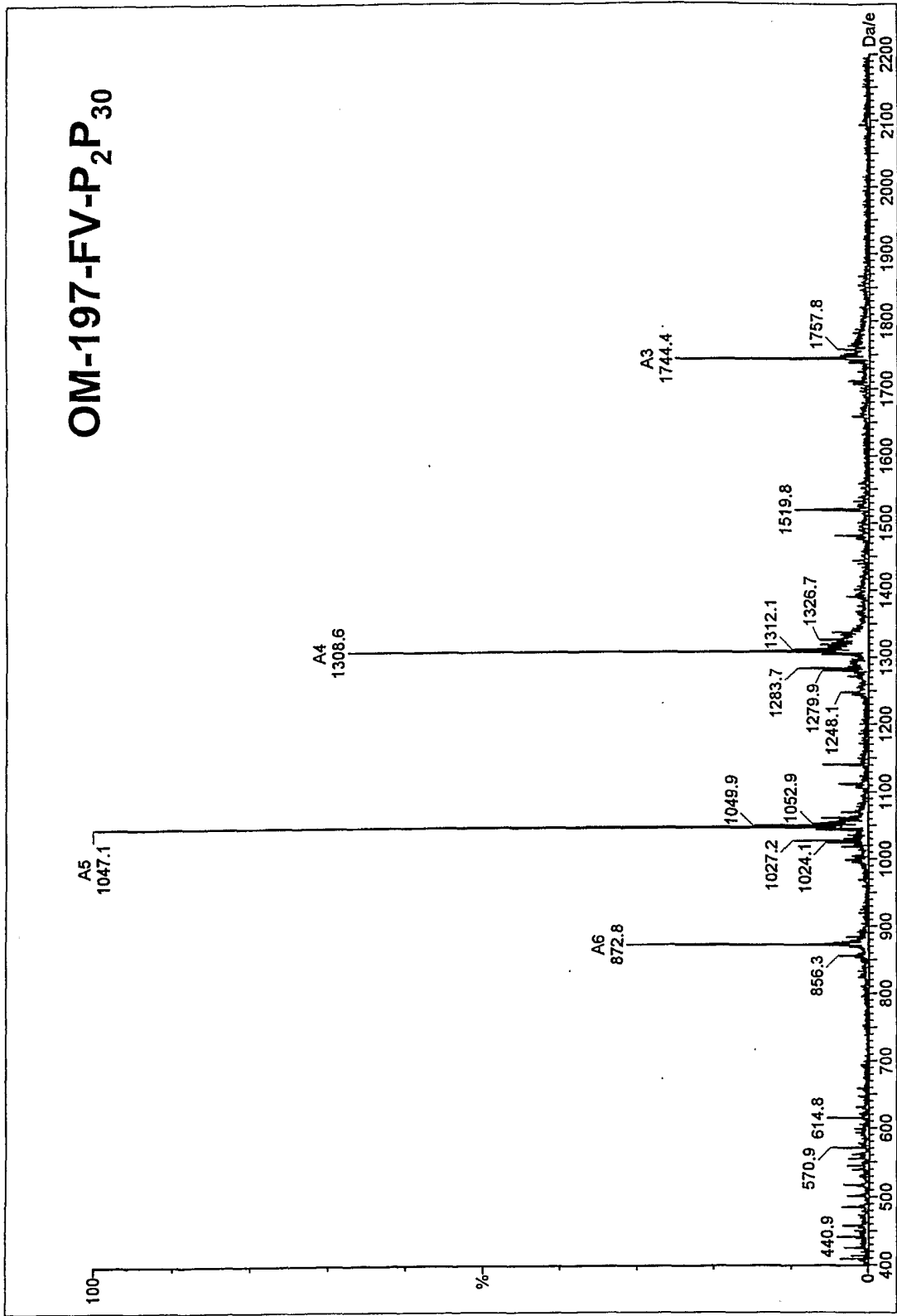


FIGURE 33

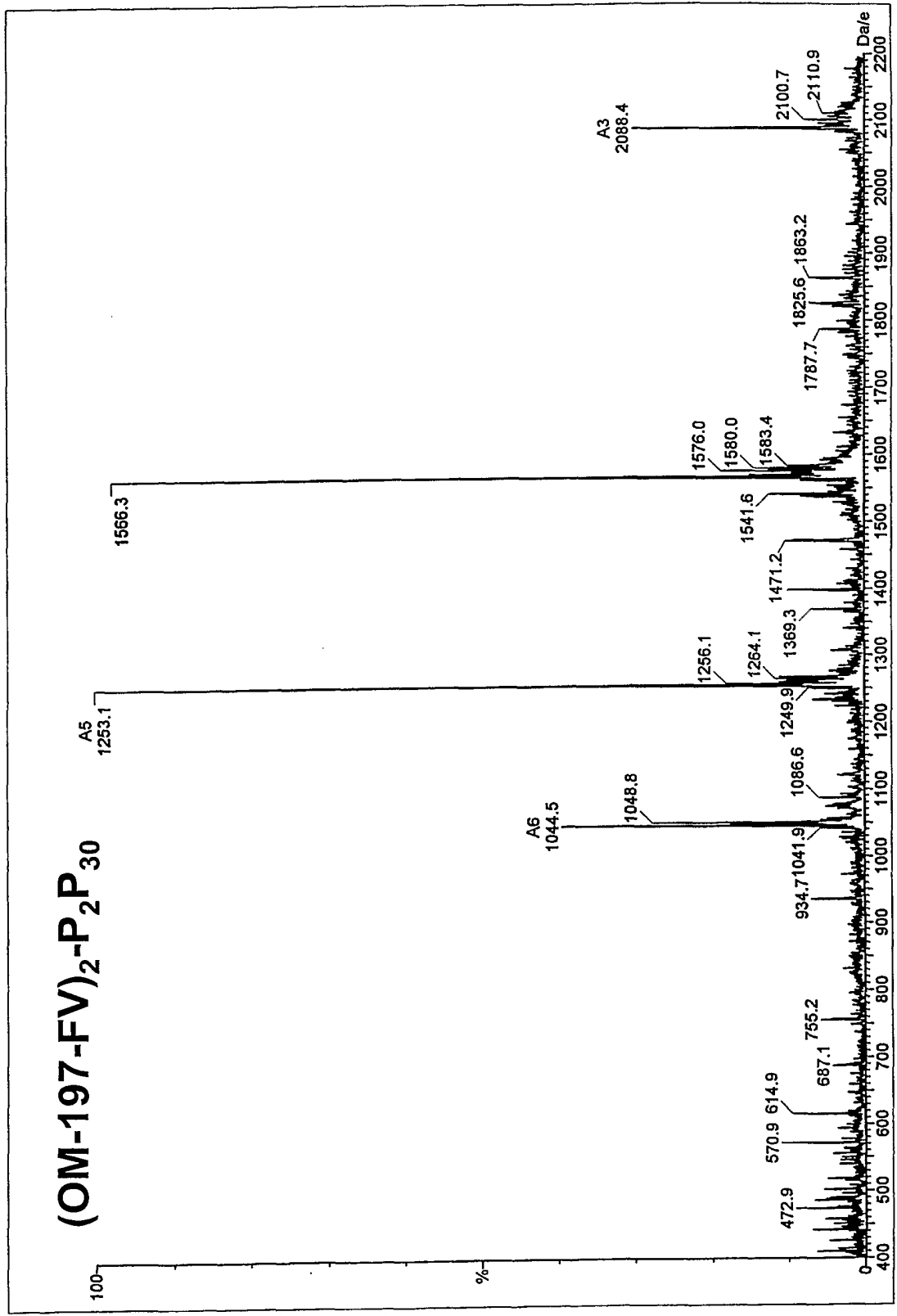


FIGURE 34

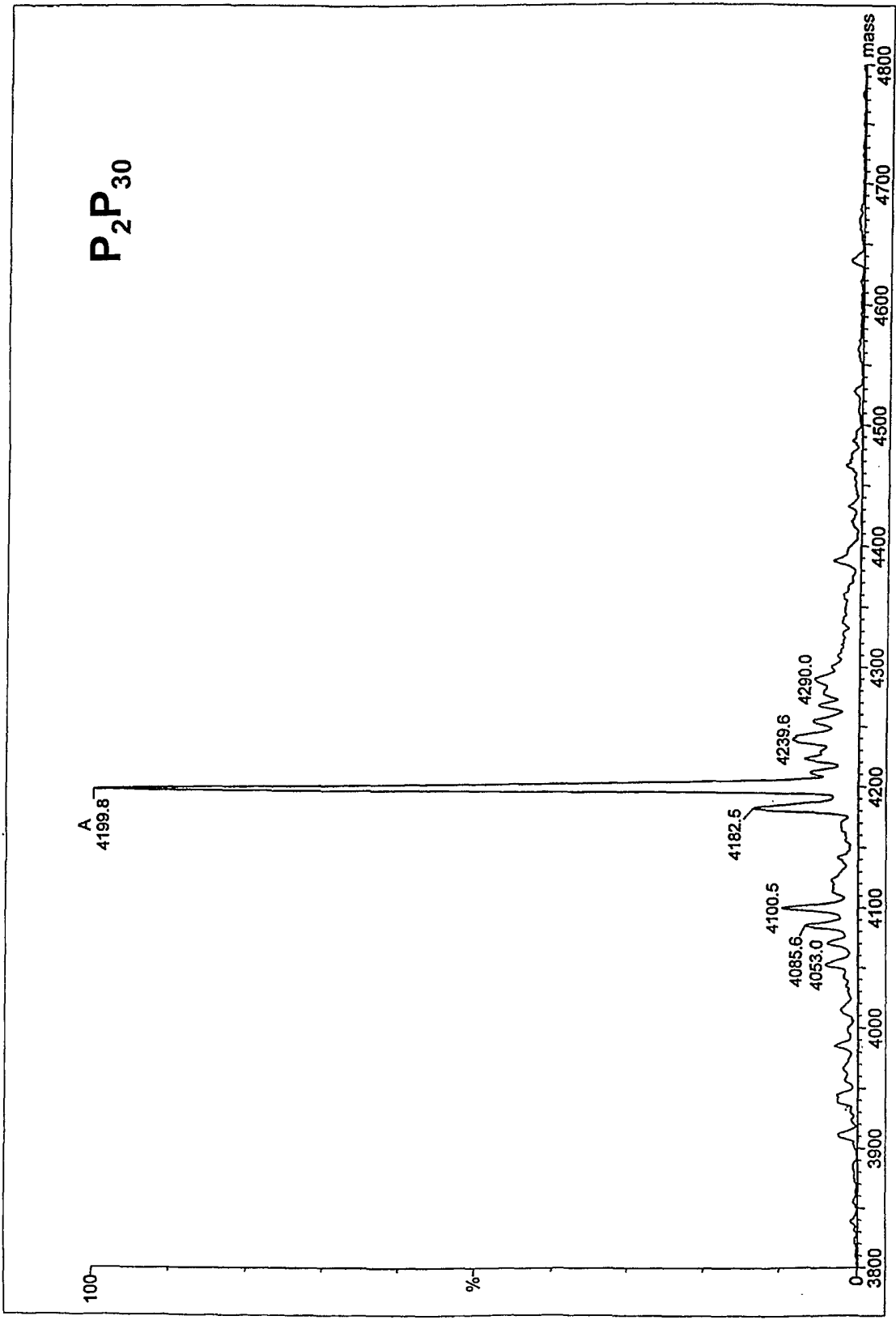


FIGURE 35

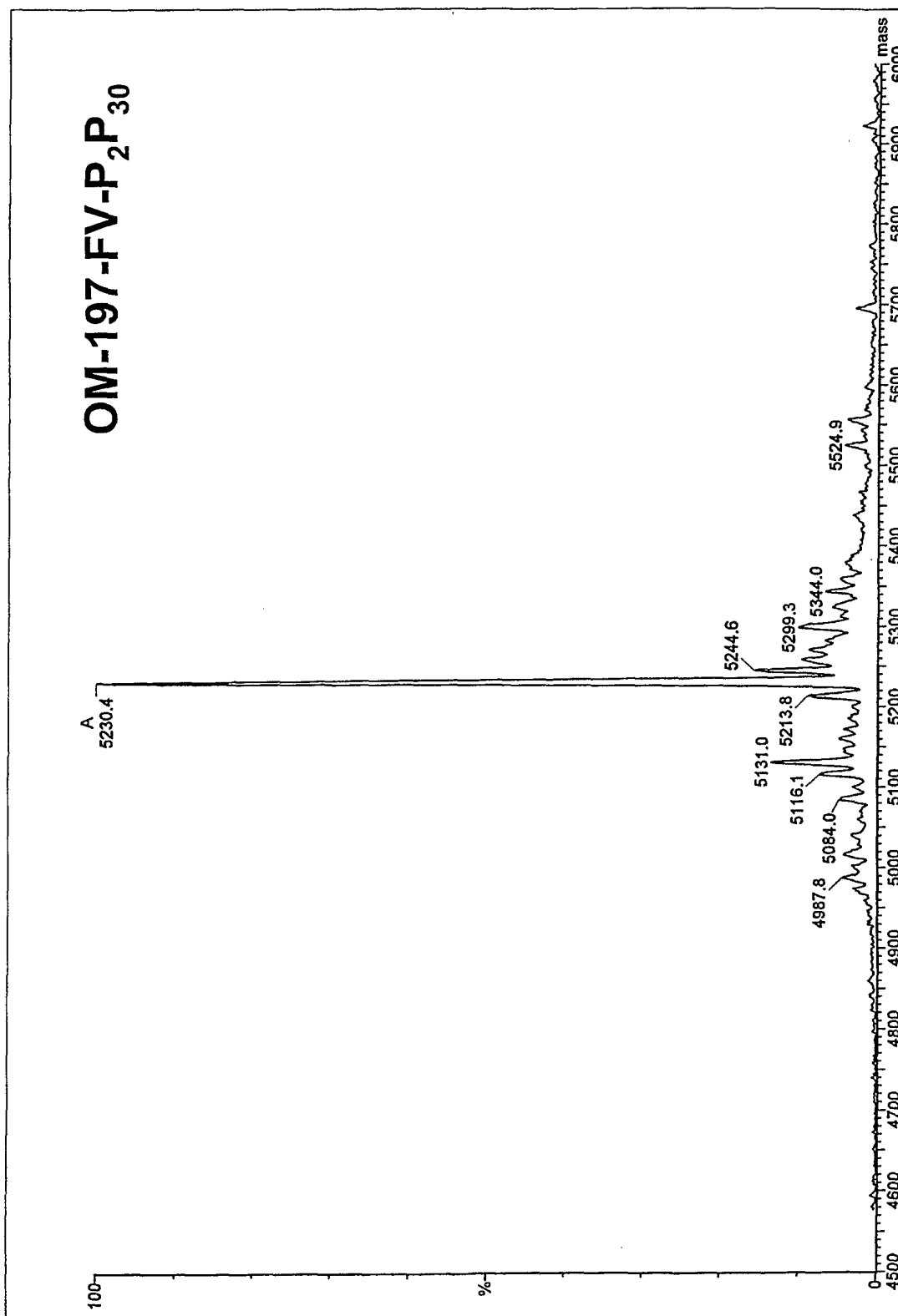


FIGURE 36

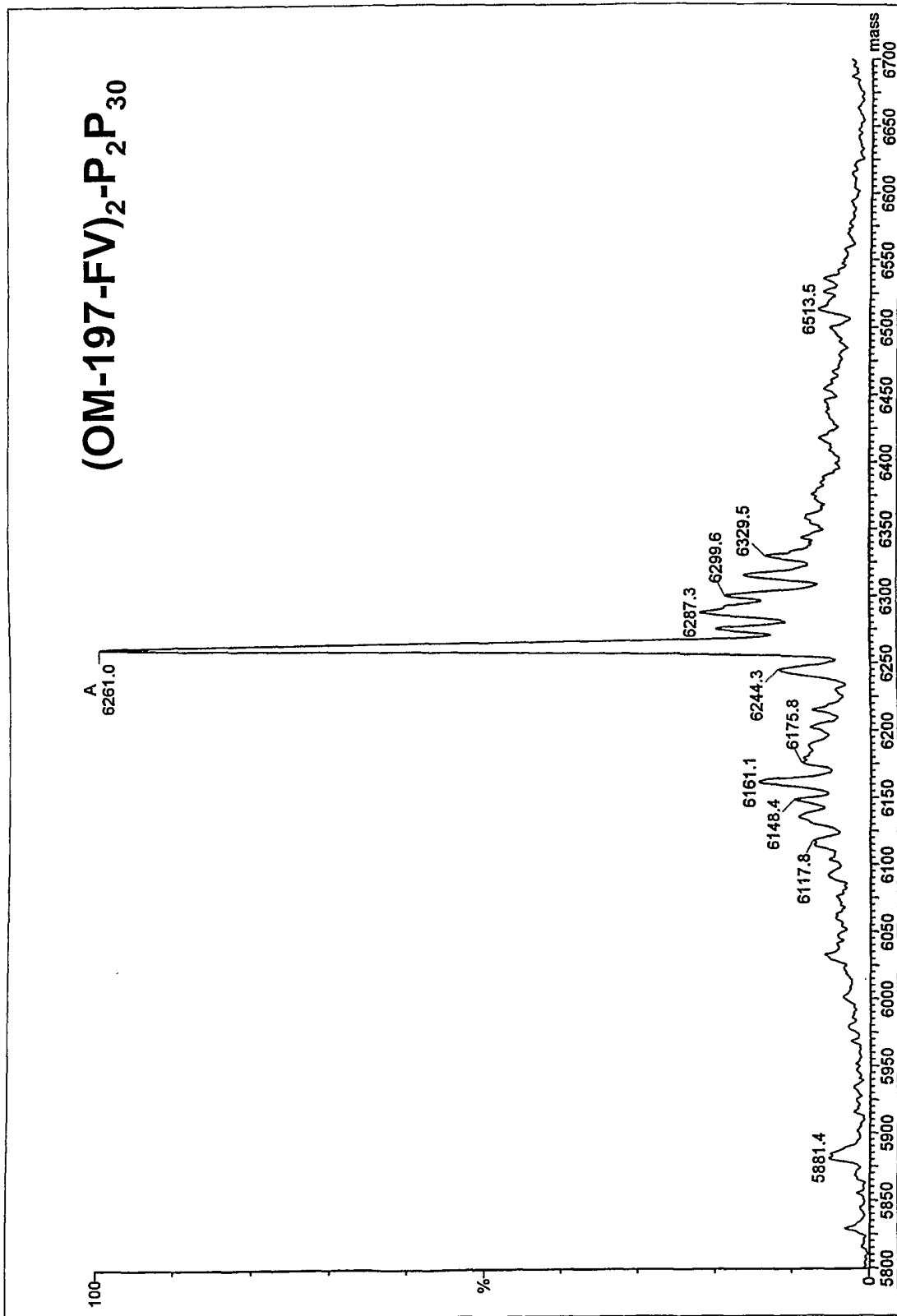


FIGURE 37

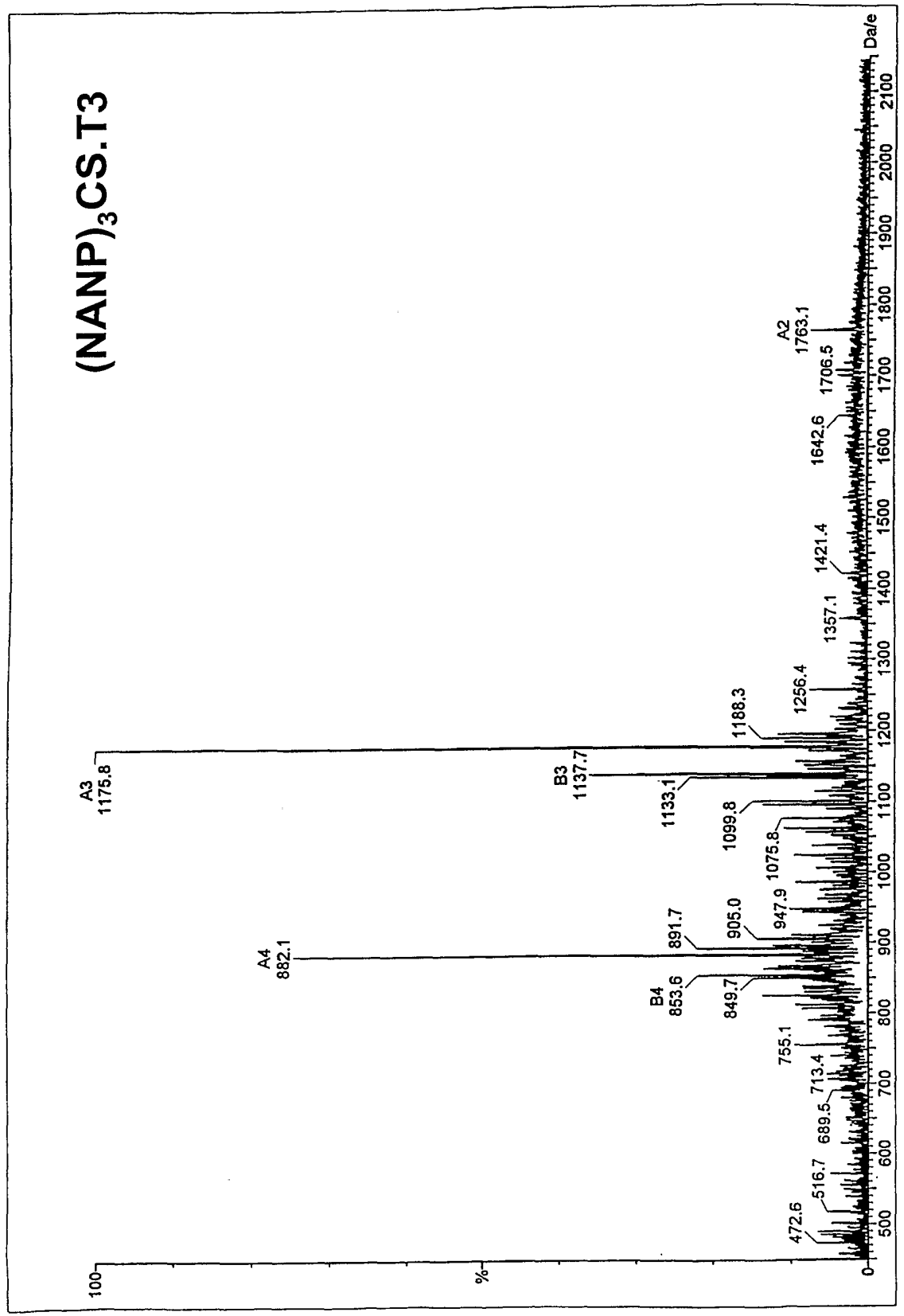


FIGURE 38

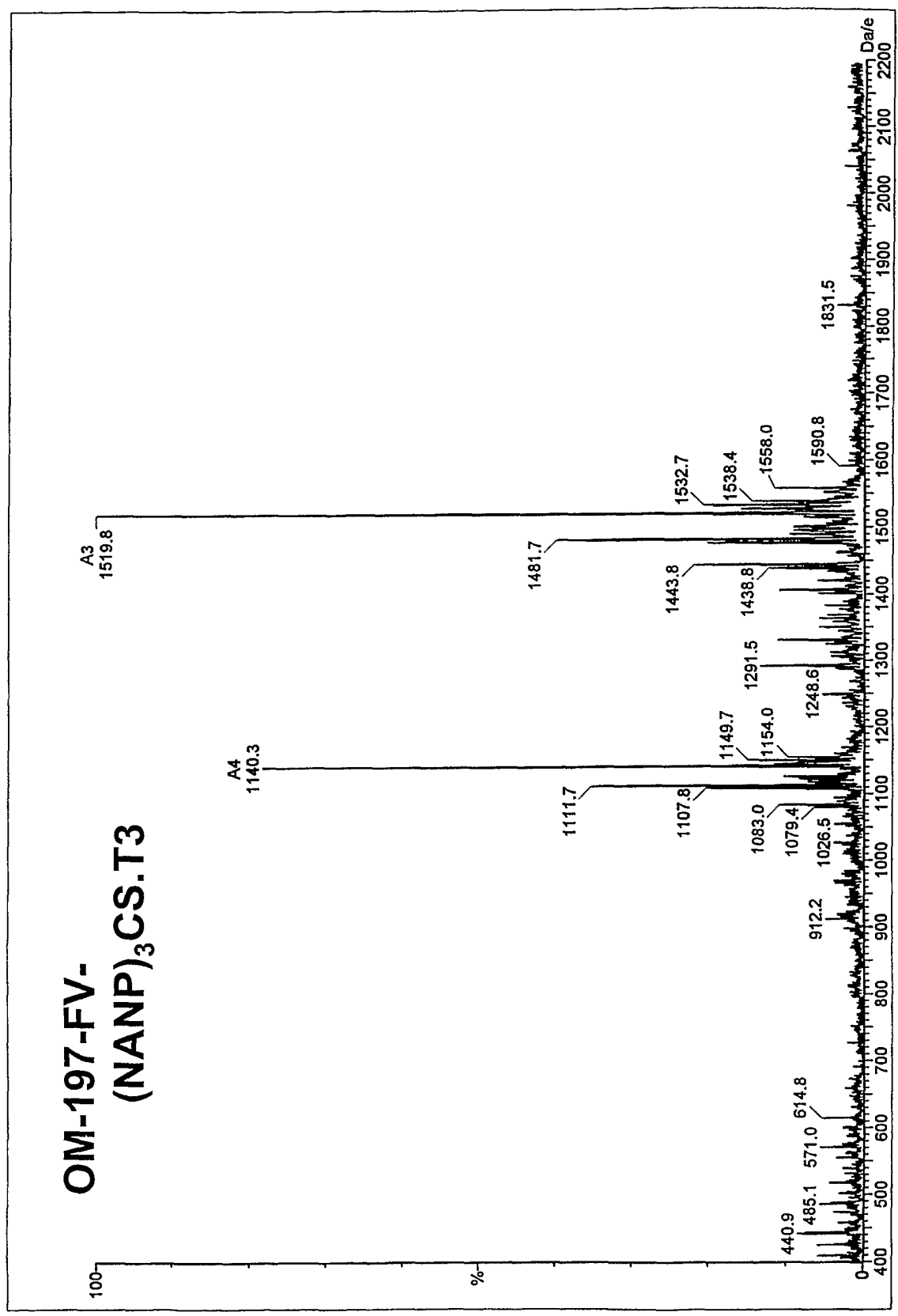


FIGURE 39

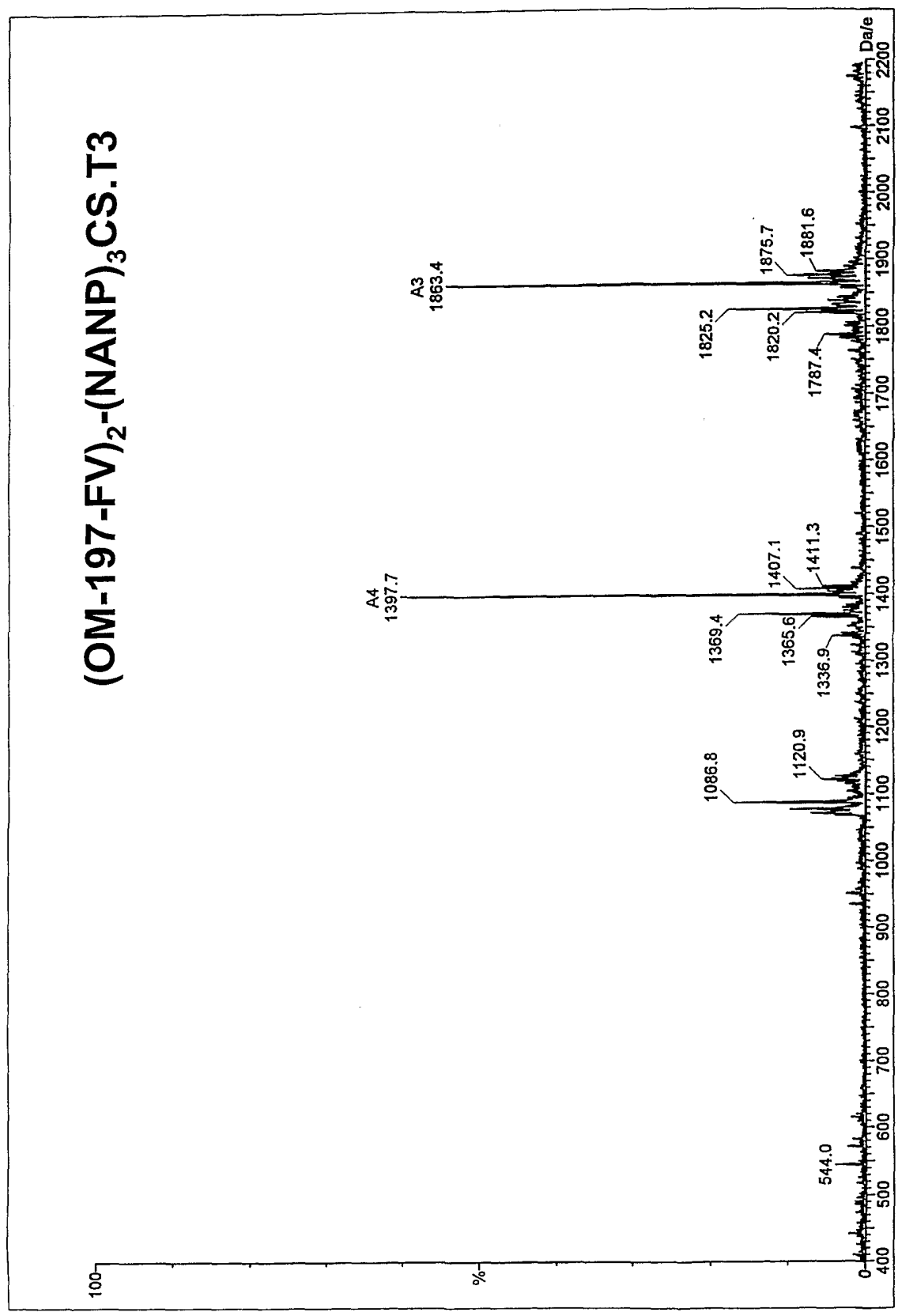


FIGURE 40

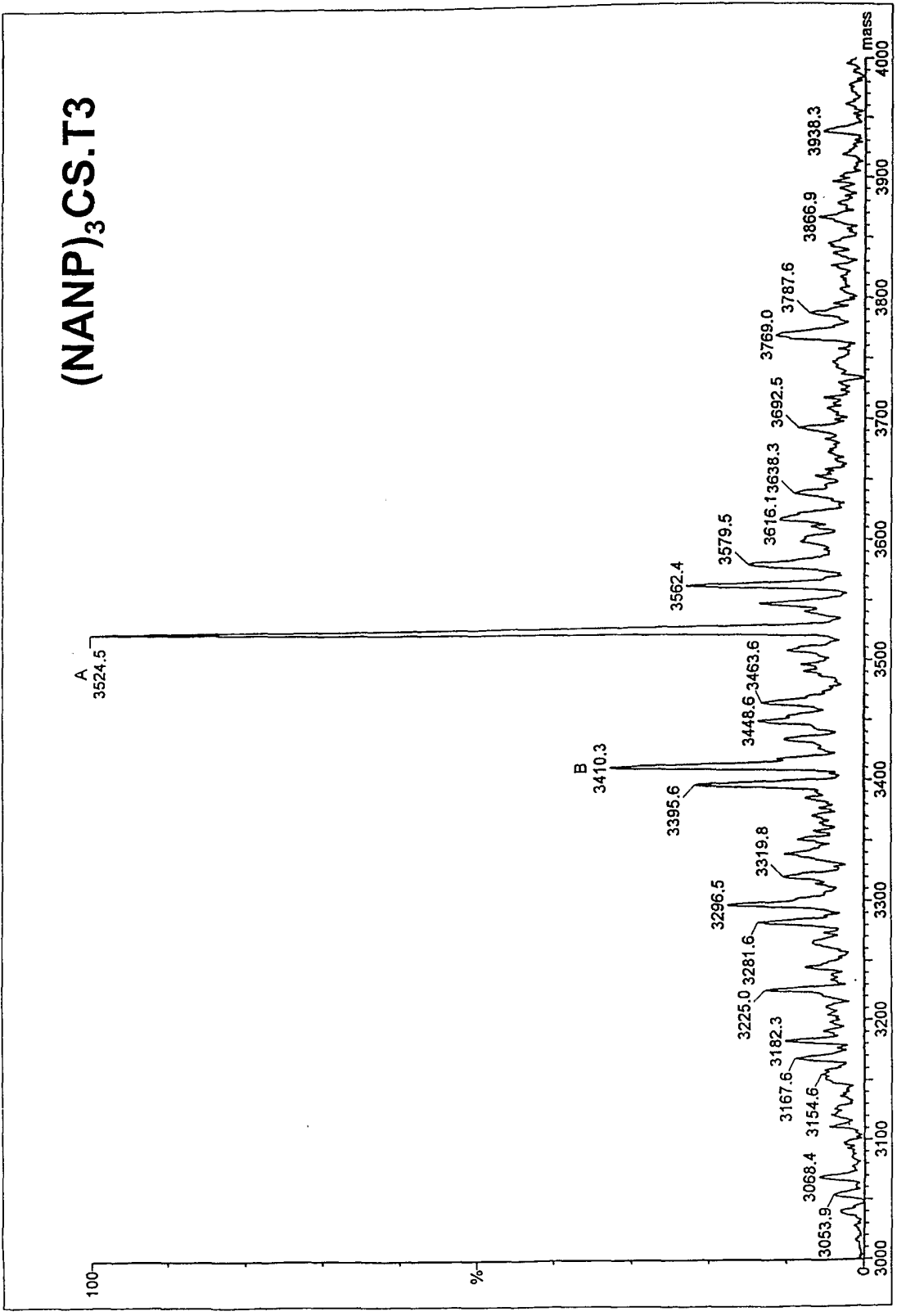


FIGURE 41

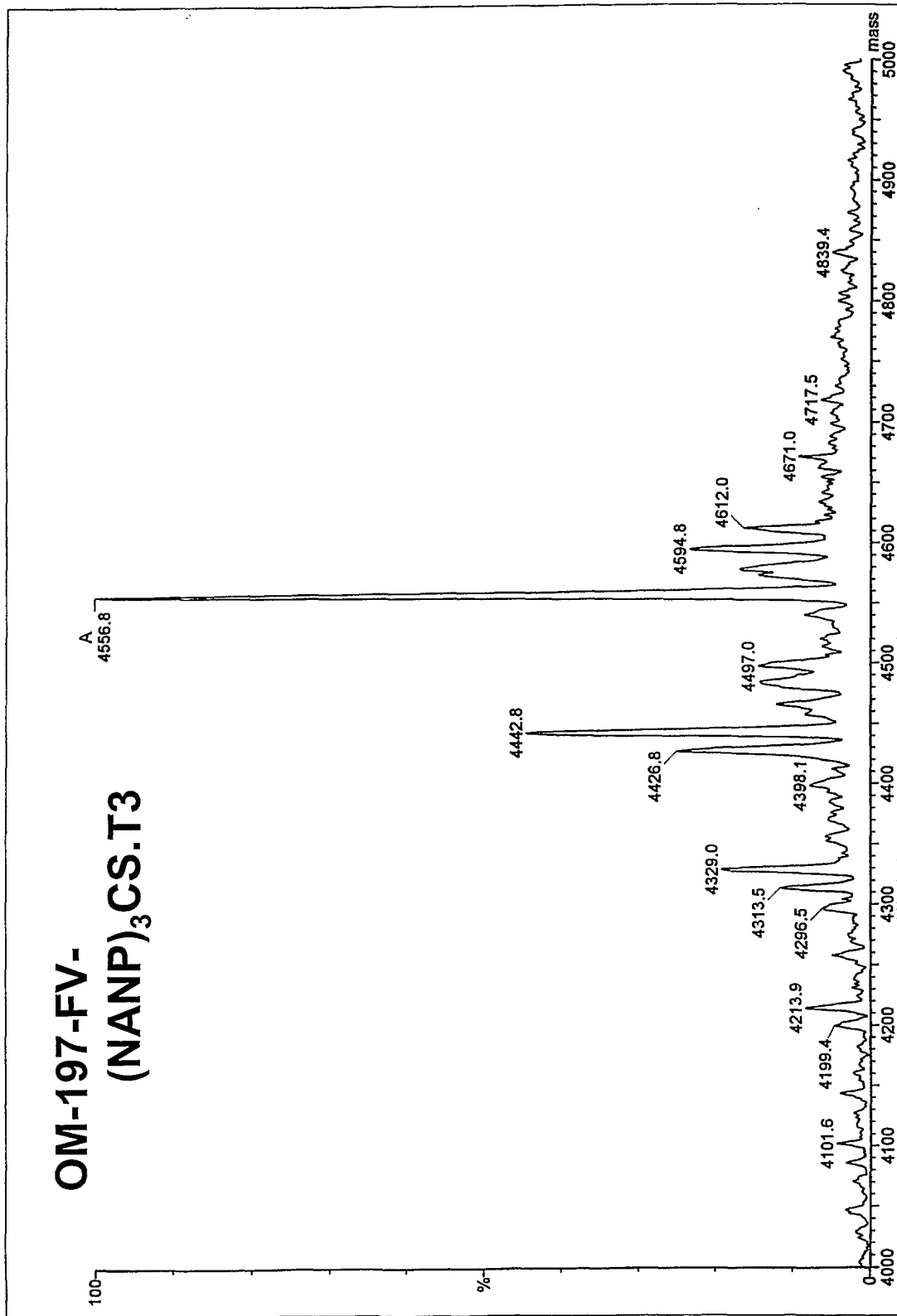


FIGURE 42

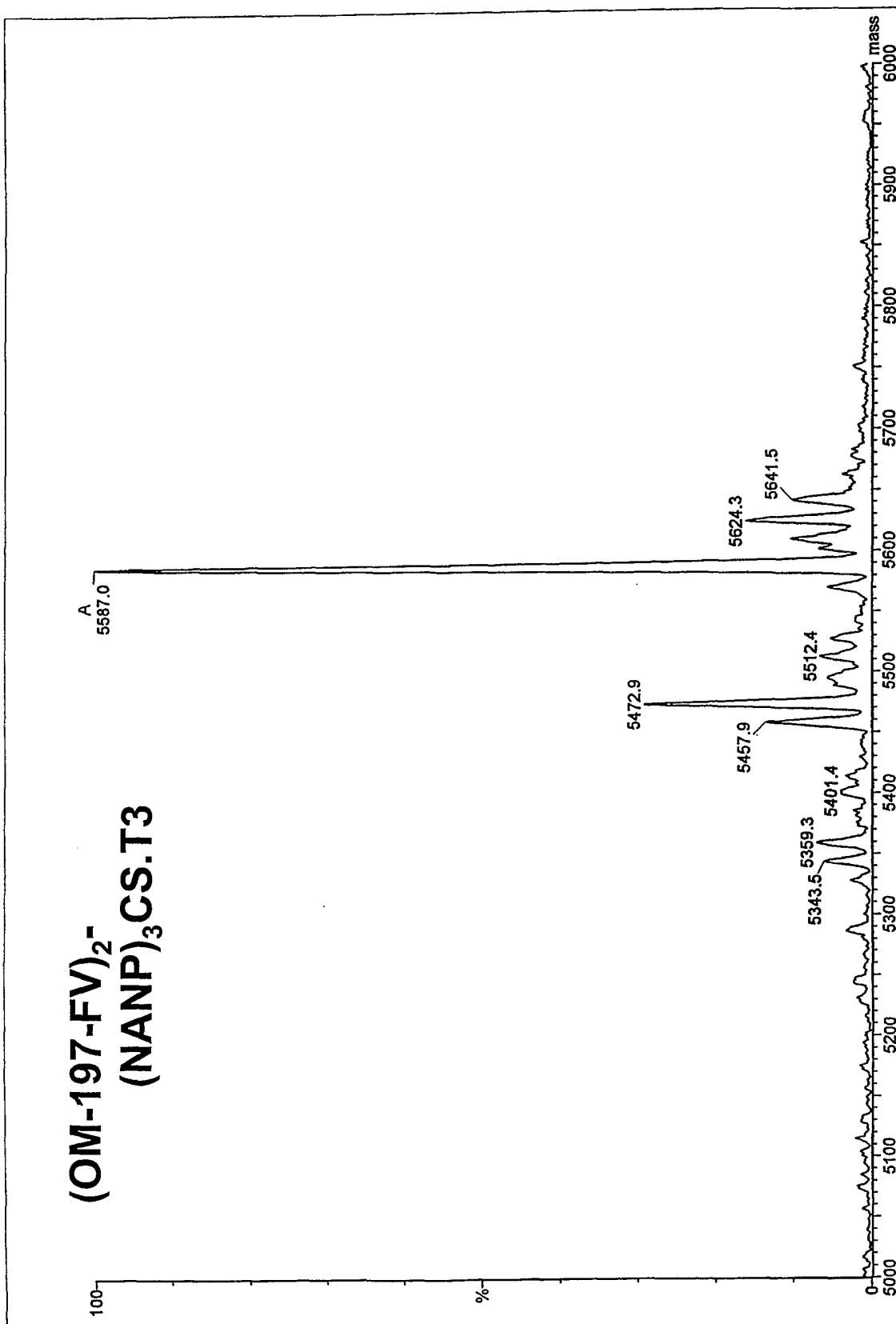


FIGURE 43

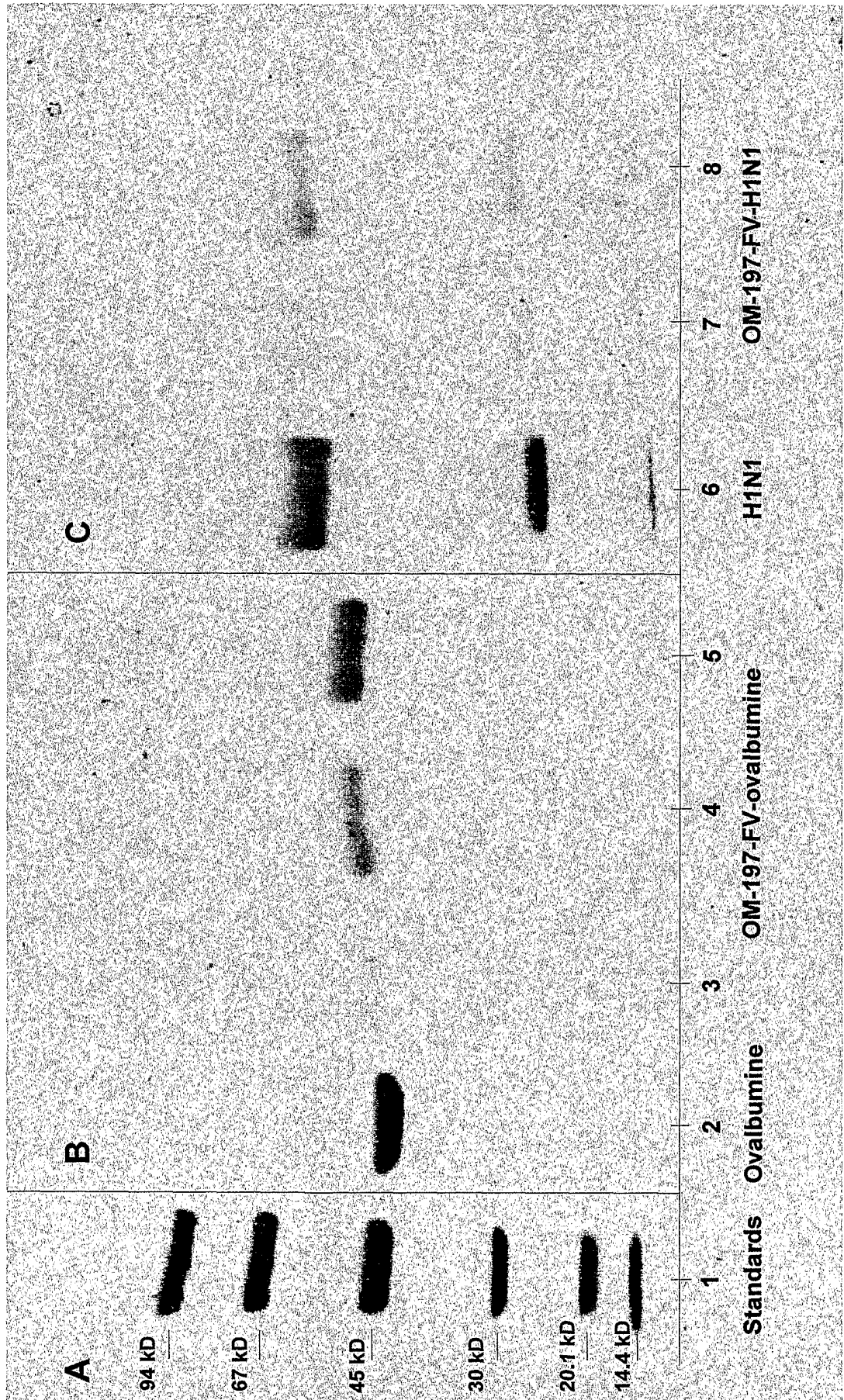


FIGURE 44

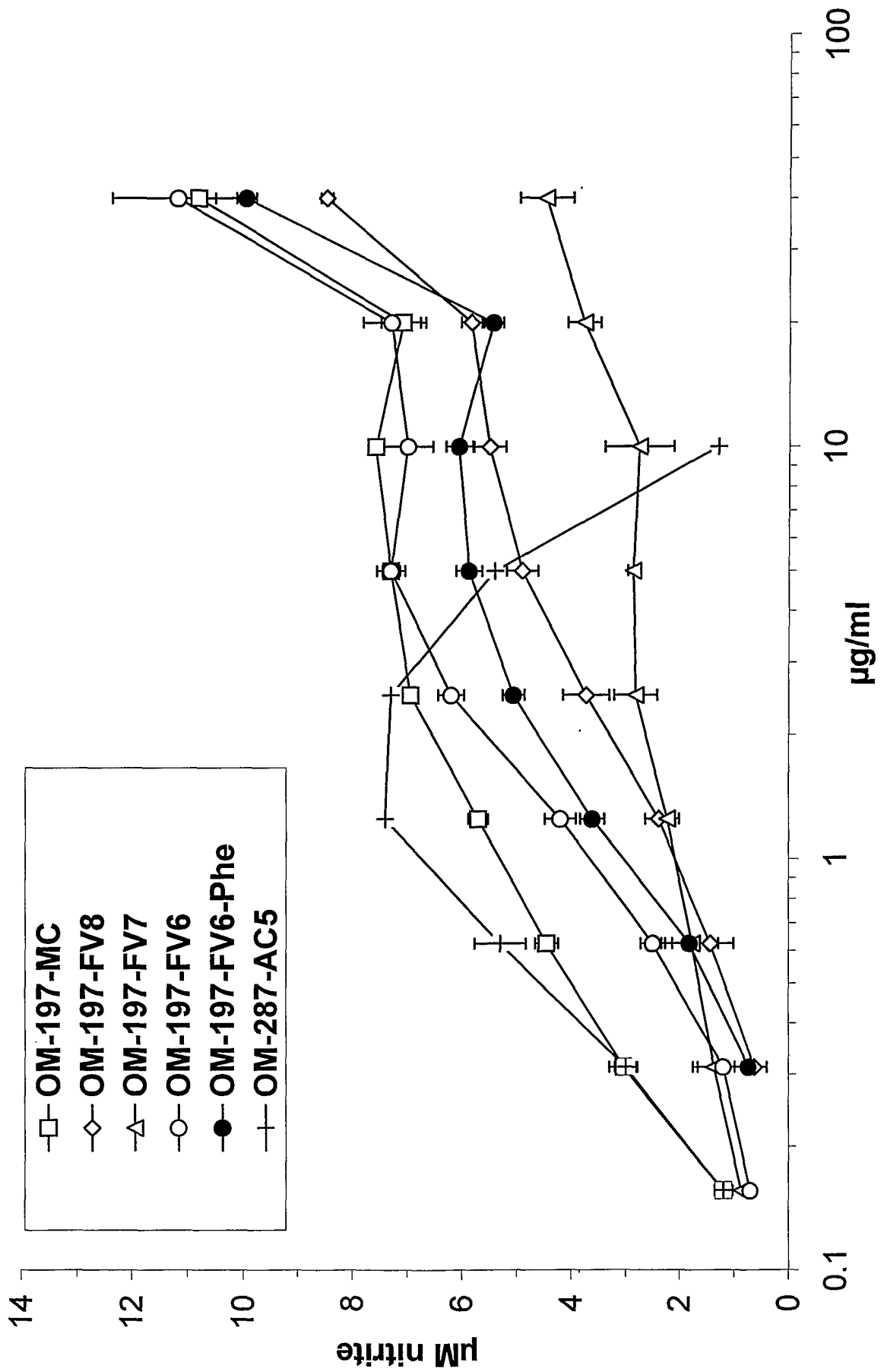


FIGURE 45

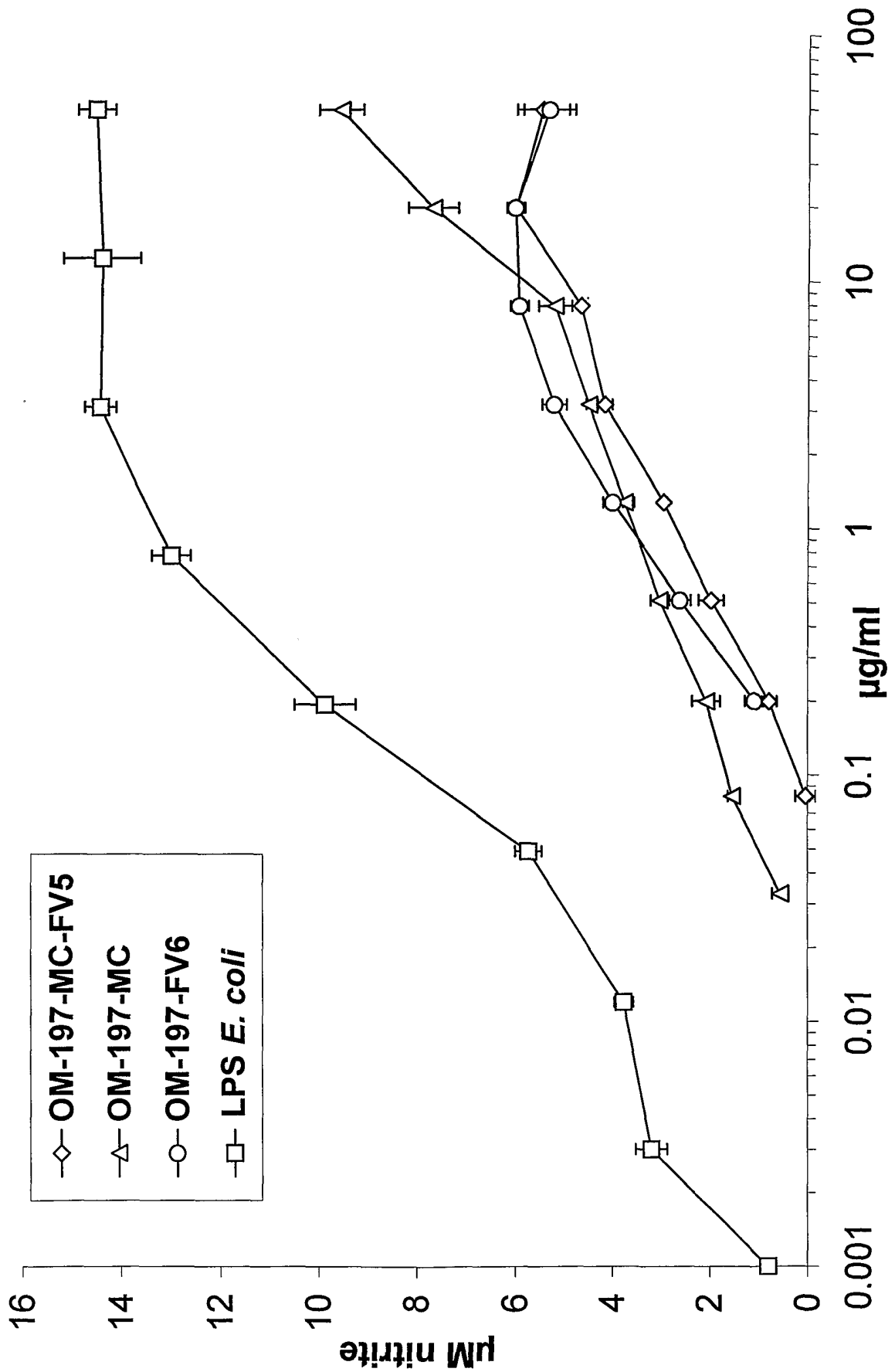
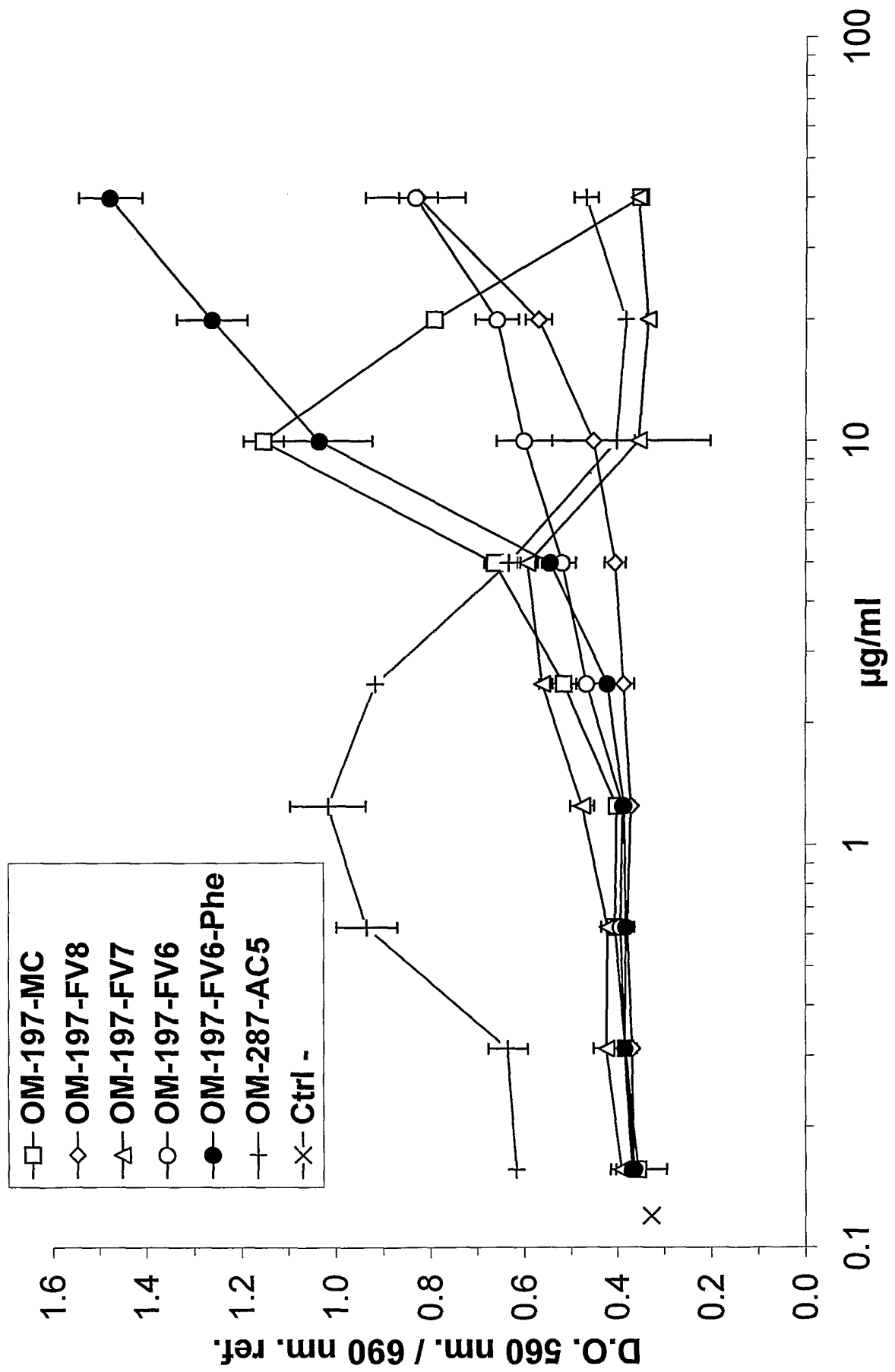
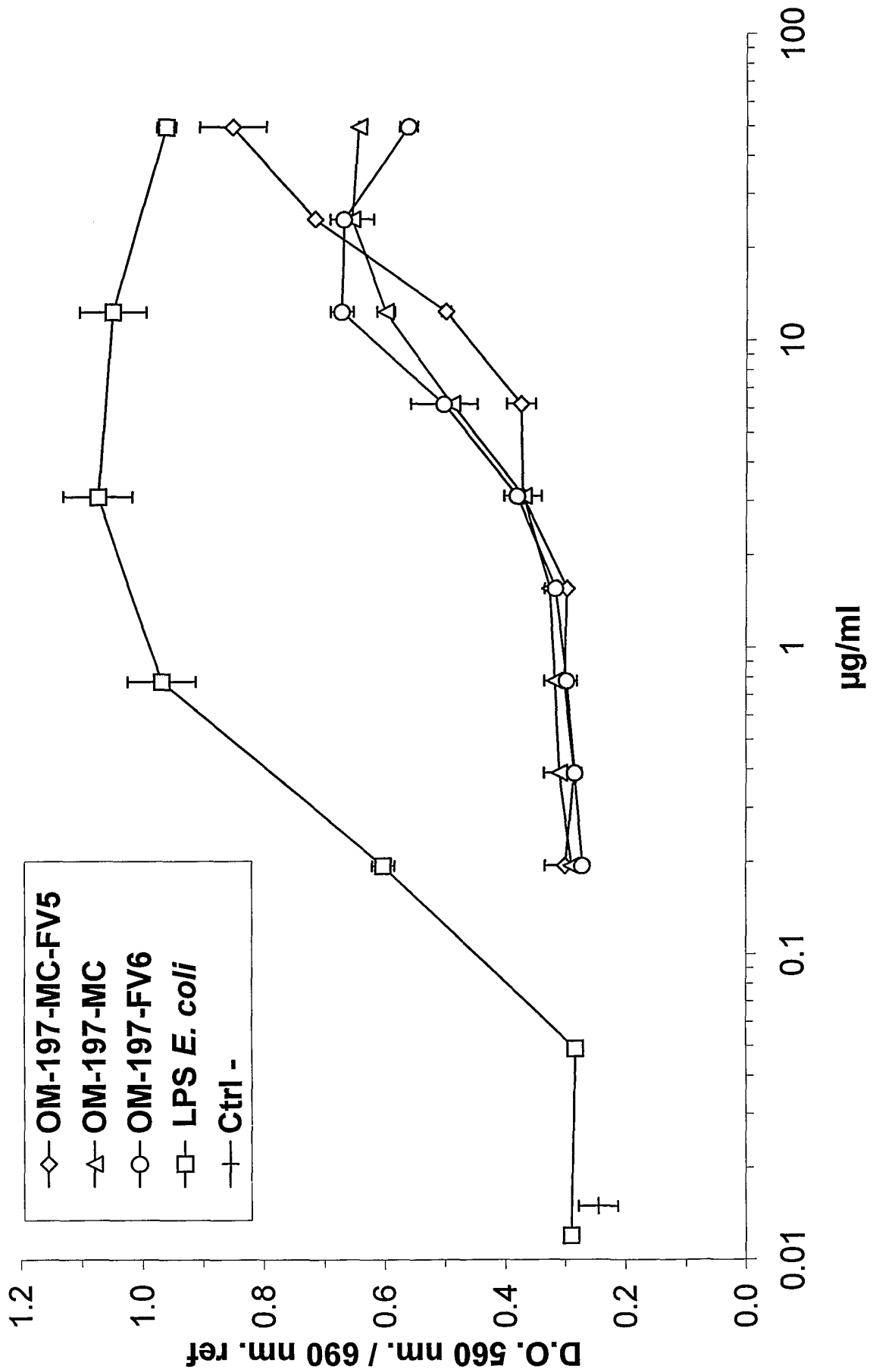


FIGURE 46



47/56

FIGURE 47



48/56

FIGURE 48

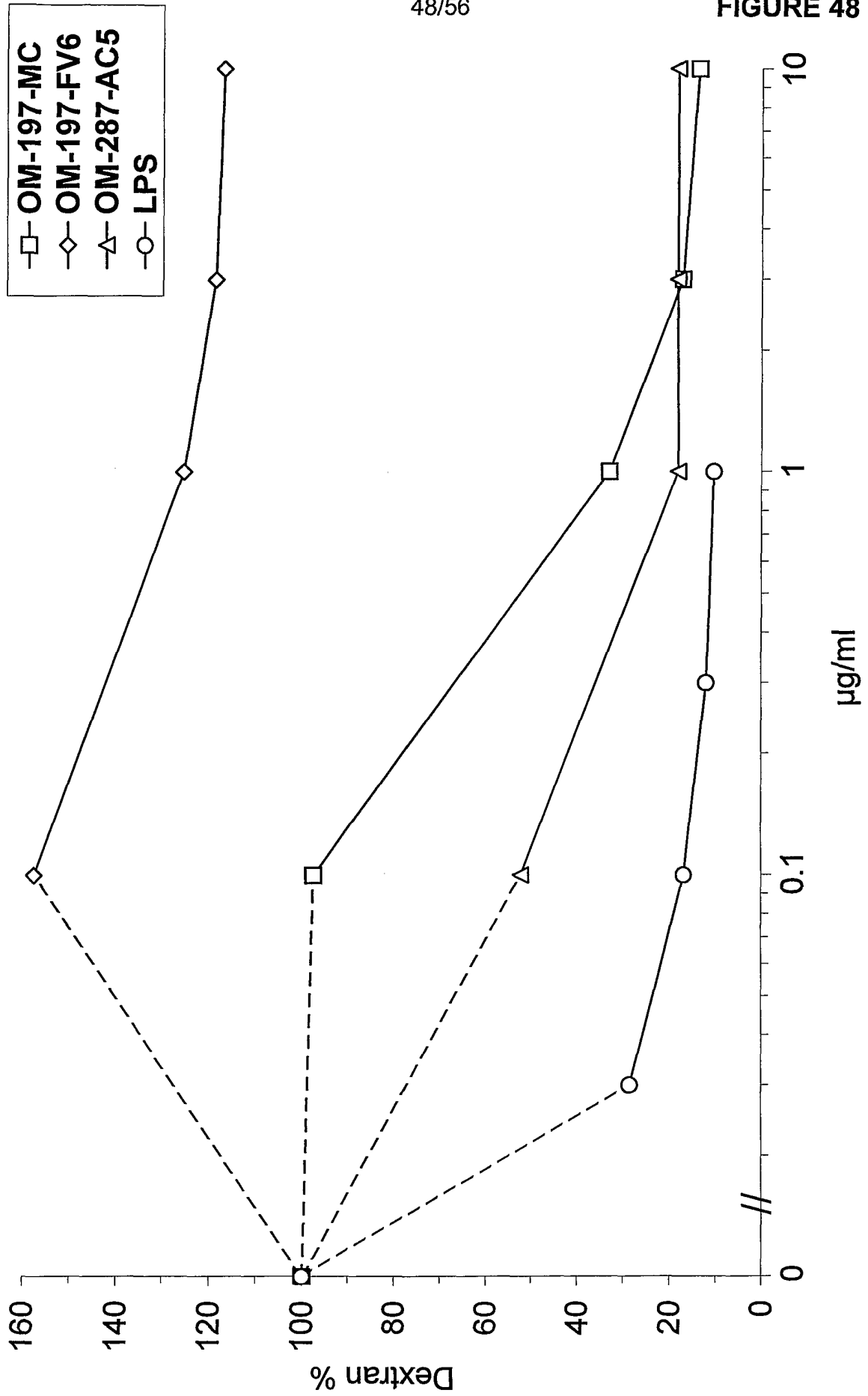
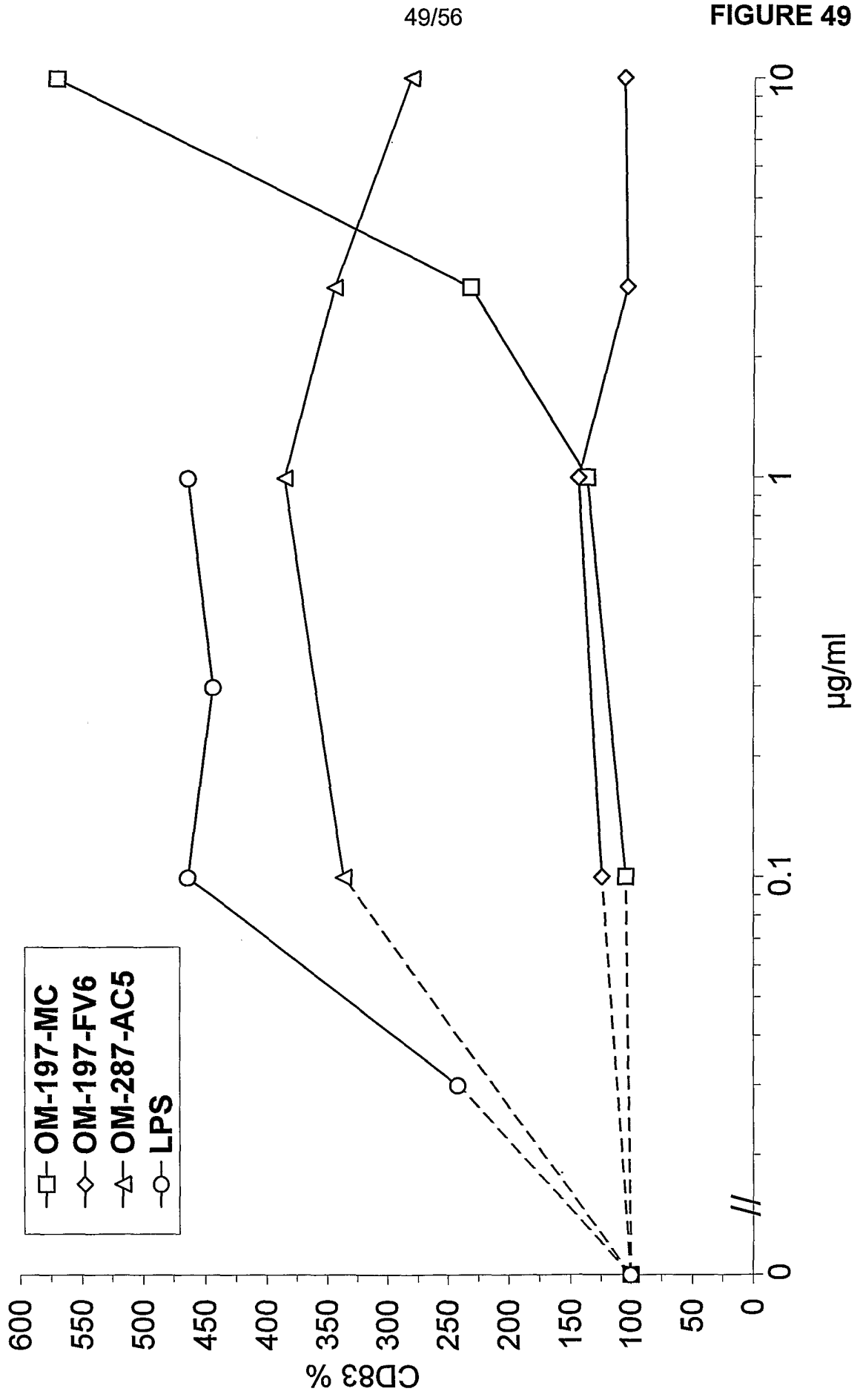


FIGURE 49



50/56

FIGURE 50

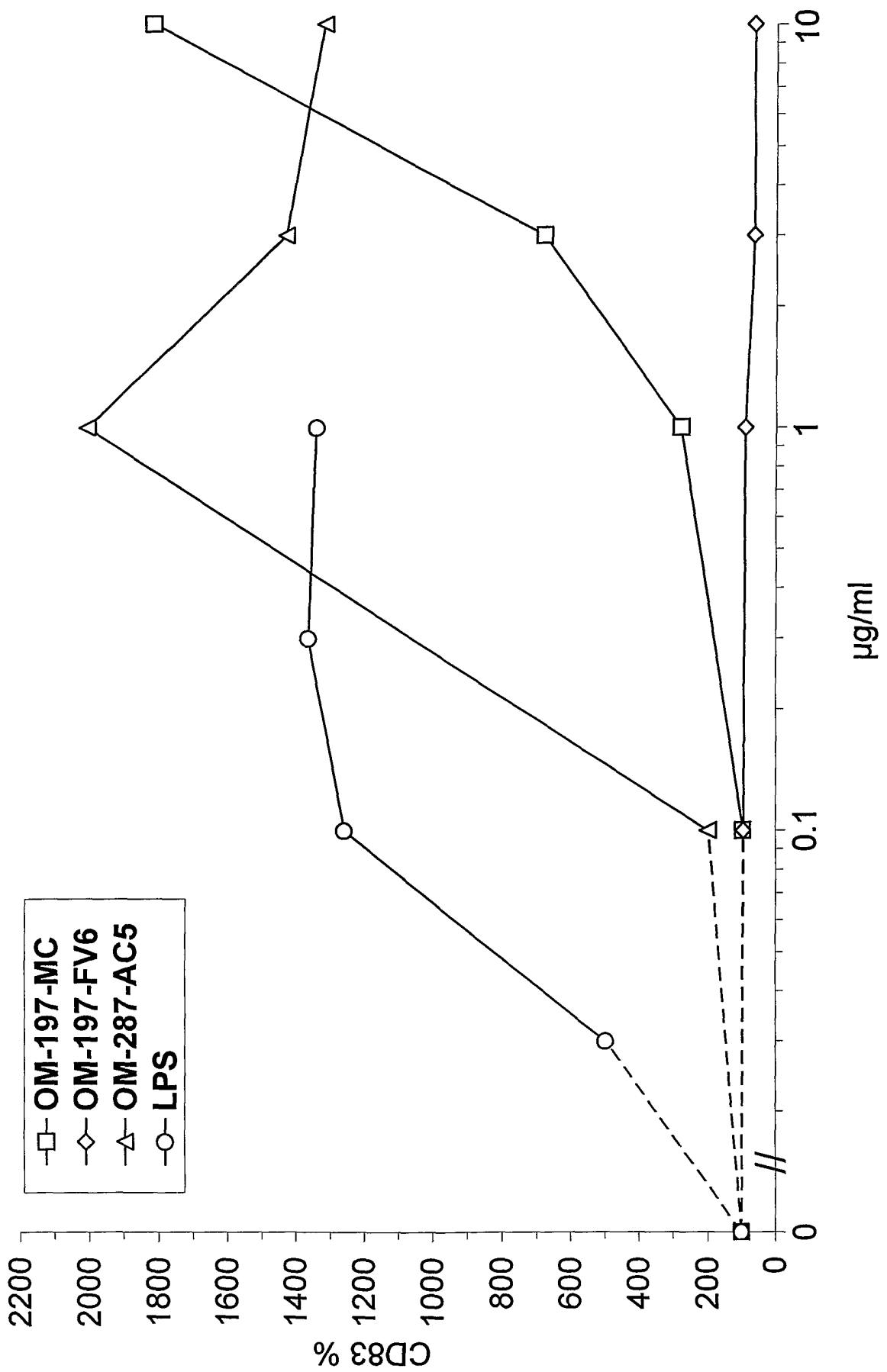


FIGURE 51

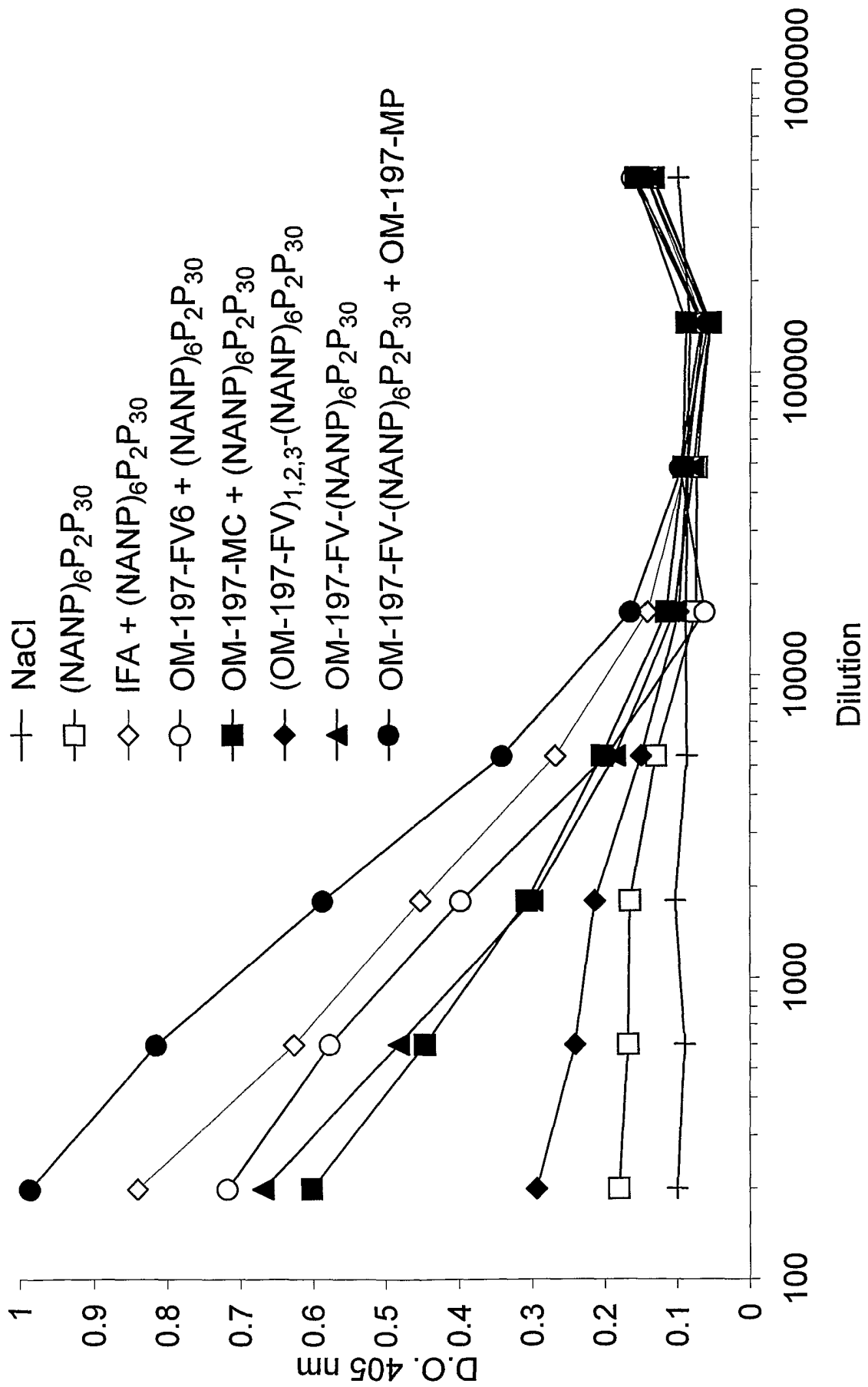


FIGURE 53

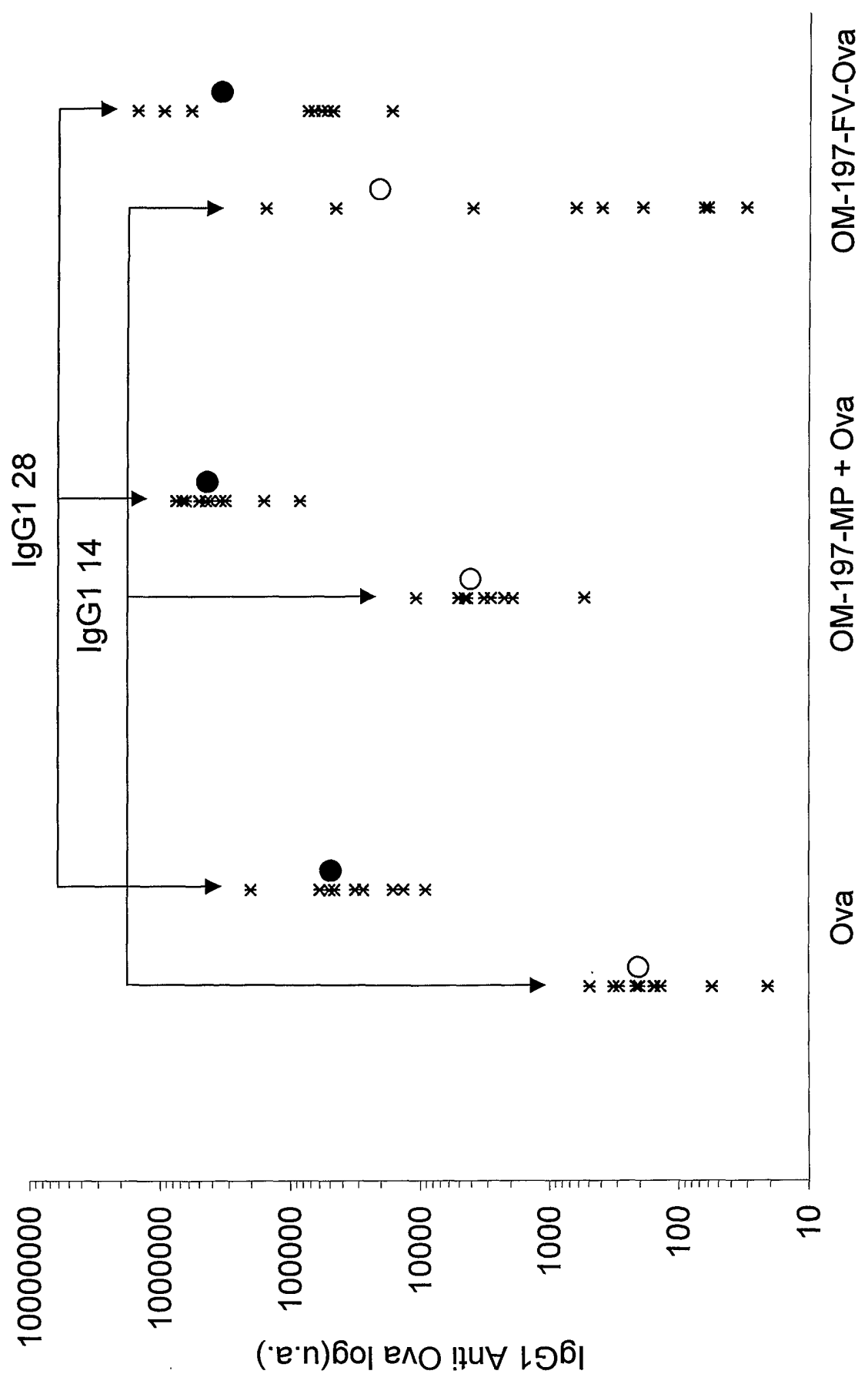


FIGURE 55

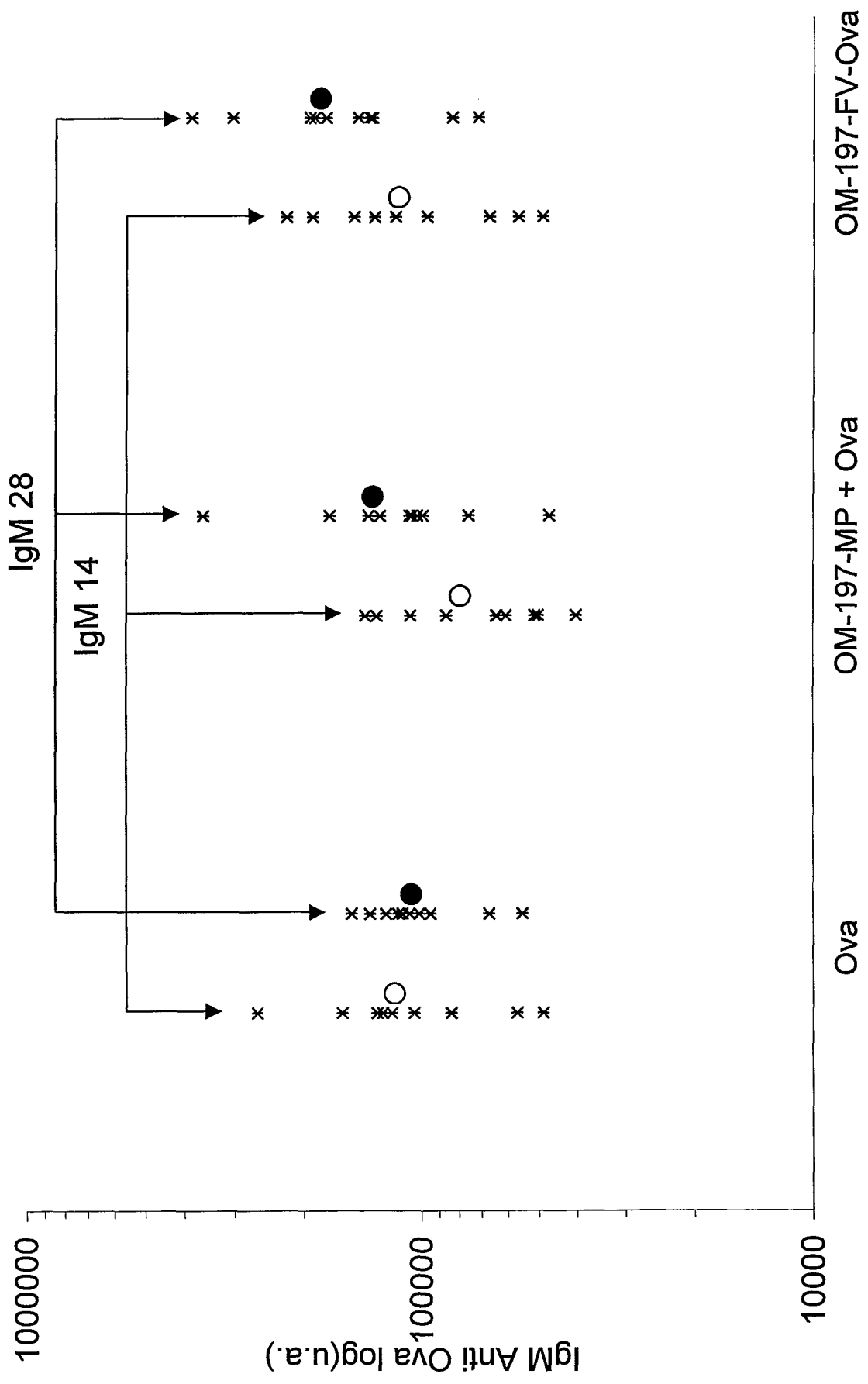
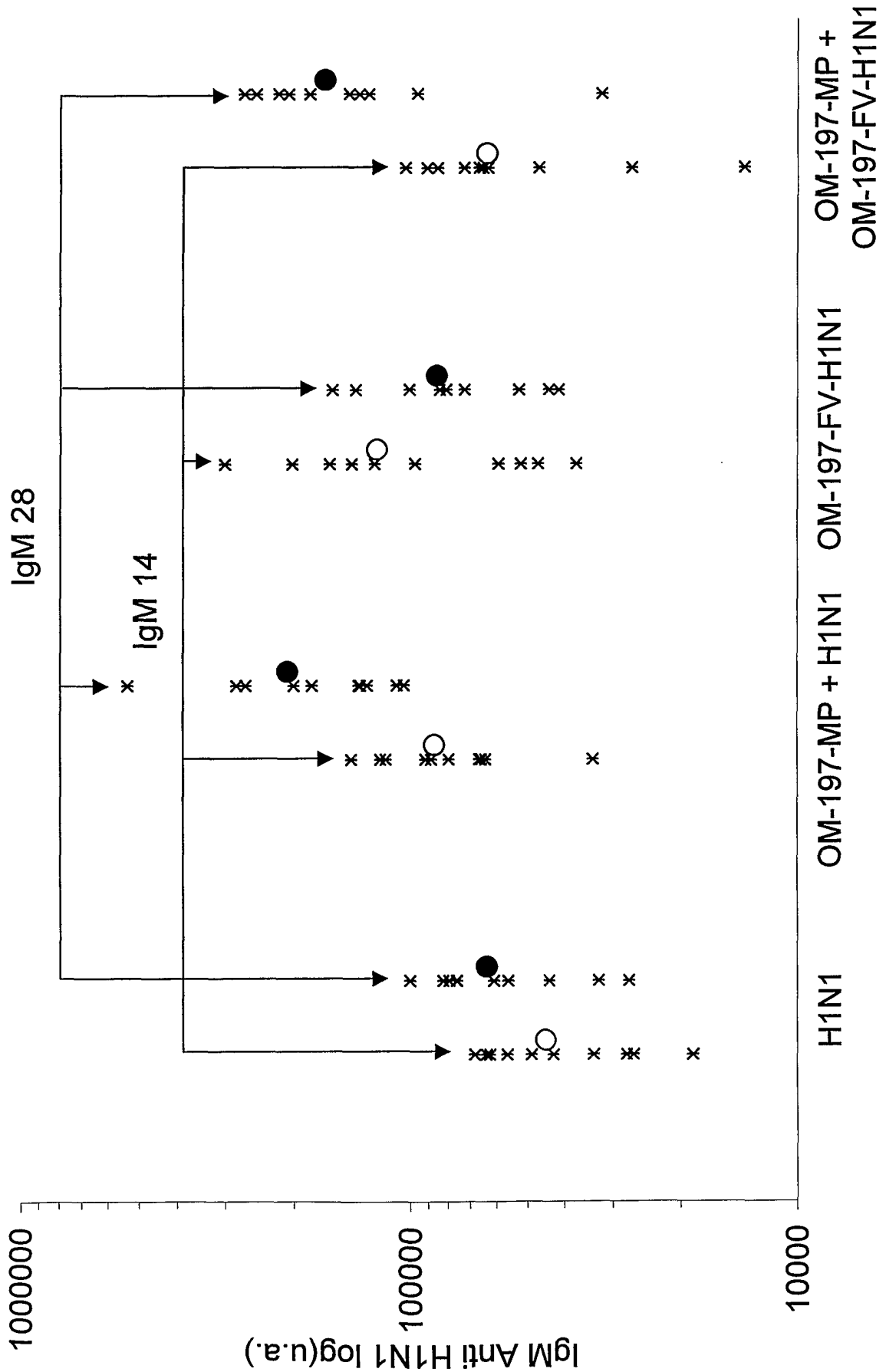


FIGURE 56



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int: onal Application No

PCT/IB 99/02038

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07C237/22 C07C323/60 C07F9/09 A61K39/39 A61K31/66
A61P37/02

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)

IPC 7 C07F C07C A61K A61P

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 practical, search terms used)

CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 14026 A (LABORATOIRES OM S.A.) 26 May 1995 (1995-05-26) the whole document ---	1-36
A	EP 0 668 289 A (SUNTORY KK) 23 August 1995 (1995-08-23) the whole document ---	1-36
A	EP 0 519 327 A (HOECHST AG) 23 December 1992 (1992-12-23) ---	
T	WO 00 00462 A (OM PHARMA) 6 January 2000 (2000-01-06) the whole document -----	1-36

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in 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 document 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

23 August 2000

Date of mailing of the international search report

06/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Beslier, L

Continuation of Box I.2

Claims 1-6 and 9-36 of the present application concern a very wide variety of compounds. However, a support basis as defined by PCT Article 6 and/or a disclosure as defined by PCT Article 5 can only be found for a very limited number of said compounds/products/devices/methods claimed. In the present case, the claims are so lacking in support basis and the disclosure of the invention in the description is so limited that it not possible to carry out any meaningful search covering the whole claimed spectrum. Consequently, the search was limited to those parts of the claims which are supported and disclosed, that is the parts concerning compounds specifically mentioned by name on pages 7-9 and Claims 7 and 8. A limited search was carried out on the other claims.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, concerning inventions in respect of which no search reports has been established need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO acting in its capacity as International Preliminary Examining Authority is not to proceed with the preliminary examination of a subject matter in respect of which no search has been carried out. This attitude will remain unchanged, notwithstanding whether the claims have been modified or not, either after the report has been received, or during any procedure under Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/IB 99/02038

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9514026	A	26-05-1995	AU 700485	B 07-01-1999
			AU 1219495	A 06-06-1995
			BR 9408071	A 24-12-1996
			CA 2175375	A 26-05-1995
			CN 1137799	A 11-12-1996
			CZ 9601418	A 16-10-1996
			EP 0729473	A 04-09-1996
			HU 74738	A 28-02-1997
			JP 9505071	T 20-05-1997
			PL 314494	A 16-09-1996
			SK 61396	A 06-11-1996
			US 6005099	A 21-12-1999
			EP 668289	A
AU 679970	B 17-07-1997			
AU 6219694	A 27-03-1995			
US 5654289	A 05-08-1997			
CA 2148824	A 16-03-1995			
WO 9507285	A 16-03-1995			
EP 519327	A	23-12-1992	DE 4119856	A 24-12-1992
			AT 184274	T 15-09-1999
			DE 59209742	D 14-10-1999
			ES 2137166	T 16-12-1999
			JP 5186419	A 27-07-1993
			US 5700910	A 23-12-1997
WO 0000462	A	06-01-2000	AU 4284899	A 17-01-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De e Internationale No

PCT/IB 99/02038

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07C237/22 C07C323/60 C07F9/09 A61K39/39 A61K31/66
A61P37/02

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)

CIB 7 C07F C07C A61K A61P

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 réalisable, termes de recherche utilisés)

CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 95 14026 A (LABORATOIRES OM S.A.) 26 mai 1995 (1995-05-26) le document en entier ----	1-36
A	EP 0 668 289 A (SUNTORY KK) 23 août 1995 (1995-08-23) le document en entier ----	1-36
A	EP 0 519 327 A (HOECHST AG) 23 décembre 1992 (1992-12-23) ----	
T	WO 00 00462 A (OM PHARMA) 6 janvier 2000 (2000-01-06) le document en entier -----	1-36

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

23 août 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/09/2000

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, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Beslier, L

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Les revendications 1-6 et 9-36 présentes ont trait à une très grande variété de composés. Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces composés/produits/dispositifs/méthodes revendiqué(e)s. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux composés cités nommément dans les pages 7-9 et les revendications 7 et 8. Une recherche limitée a été effectuée sur les autres revendications.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de 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.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l'Organisation Internationale No
PCT/IB 99/02038

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9514026 A	26-05-1995	AU 700485 B	07-01-1999
		AU 1219495 A	06-06-1995
		BR 9408071 A	24-12-1996
		CA 2175375 A	26-05-1995
		CN 1137799 A	11-12-1996
		CZ 9601418 A	16-10-1996
		EP 0729473 A	04-09-1996
		HU 74738 A	28-02-1997
		JP 9505071 T	20-05-1997
		US 6005099 A	21-12-1999
EP 668289 A	23-08-1995	JP 6206893 A	26-07-1994
		AU 679970 B	17-07-1997
		AU 6219694 A	27-03-1995
		US 5654289 A	05-08-1997
		CA 2148824 A	16-03-1995
		WO 9507285 A	16-03-1995
EP 519327 A	23-12-1992	DE 4119856 A	24-12-1992
		AT 184274 T	15-09-1999
		DE 59209742 D	14-10-1999
		ES 2137166 T	16-12-1999
		JP 5186419 A	27-07-1993
		US 5700910 A	23-12-1997
		WO 0000462 A	06-01-2000