



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2000/12/21  
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2001/06/28  
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2002/06/20  
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2000/003650  
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2001/046126  
(30) Priorité/Priority: 1999/12/22 (PCT/IB99/02038) IB

(51) Cl.Int.<sup>7</sup>/Int.Cl.<sup>7</sup> C07C 237/22, A61K 31/66, A61P 37/02,  
A61K 39/39, C07F 9/09, C07C 323/60

(71) Demandeur/Applicant:  
OM PHARMA, CH

(72) Inventeurs/Inventors:  
BAUER, JACQUES, CH;  
MARTIN, OLIVIER RICHARD, FR;  
RODRIGUEZ, SYLVAIN, CH

(74) Agent: OGILVY RENAULT

(54) Titre : PSEUDODIPEPTIDES ACYLES PORTEURS D'UN BRAS AUXILIAIRE FONCTIONNALISE  
(54) Title: ACYL PSEUDODIPEPTIDES WHICH CARRY A FUNCTIONALISED AUXILIARY ARM

(57) **Abrégé/Abstract:**

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 comme adjuvants. 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 de diagnostic.



(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 01/46126 A1(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>:  
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/FR00/03650(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, 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, MZ, 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:  
21 décembre 2000 (21.12.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:  
PCT/IB99/02038 22 décembre 1999 (22.12.1999) IB(84) États désignés (*regional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(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, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(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/Genève (CH).

## Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

(72) Inventeurs; et

(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).

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 PSEUDODIPEPTIDES WHICH CARRY A FUNCTIONALISED AUXILIARY ARM

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

(57) Abstract: The invention relates in particular to pseudodipeptides which are derived from functionalised aminoacids and which comprise fatty acid chains that are fixed on the amine functions of the pseudodipeptides in amide form, one of the ends of said pseudodipeptides having a functionalised auxiliary arm and the other end being a neutral or charged acid group. The inventive compounds have immunomodulatory properties when used as adjuvants. The inventive compounds can also be grafted onto an antigen in order to modulate the immune response or grafted onto a pharmacophore in order to improve its therapeutic action or its targeting. Finally, the inventive compounds can therefore be used in human and veterinary medicine as immunizing agents and as diagnostic tools.

(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 comme adjuvants. 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 de diagnostic.



WO 01/46126 A1

**PSEUDODIPEPTIDES ACYLES PORTEURS D'UN BRAS AUXILIAIRE FONCTIONNALISE****5 INTRODUCTION**

La présente invention se rapporte au domaine de la chimie, et plus particulièrement à celui de la chimie des peptides. Elle a plus précisément pour objet des pseudodipeptides acylés porteurs d'un bras auxiliaire fonctionnalisé, pouvant être greffés ou non sous la forme de conjugués et dont le bras auxiliaire confère à la molécule des propriétés originales en termes d'activités biologiques et en termes physico-chimiques. La nature chimique du bras auxiliaire confère une dimension supplémentaire au pseudodipeptide acylé en modulant finement ses propriétés originales et en lui donnant de nouvelles. Ces molécules porteuses d'un bras auxiliaire fonctionnalisé peuvent être conjuguées à un phamacophore, à un antigène ou à une molécule vecteur. 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 de propriétés pharmacologiques propres, peuvent ainsi être combinés entre eux pour créer de nouvelles entités aux propriétés physico-chimiques 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.

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, 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



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  
5 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  
10 pourrait s'avérer 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.

15 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  
20 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  
25 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].

30 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



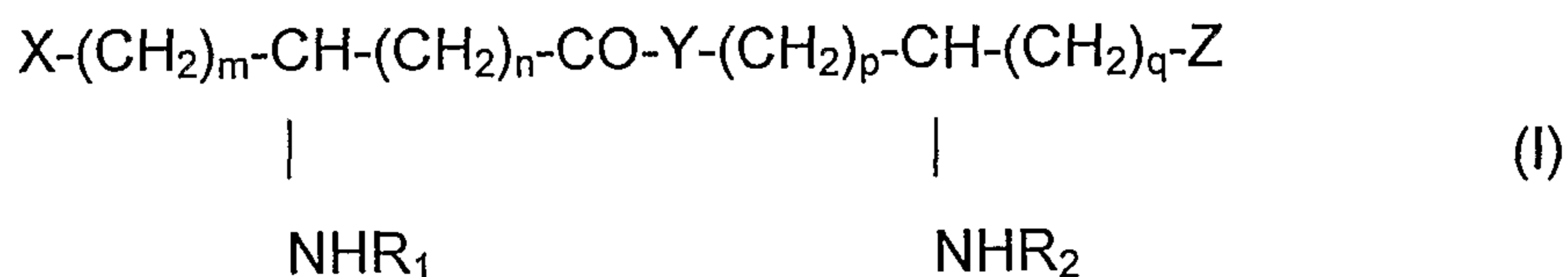
homo- ou hétérobifonctionnels disponibles et les procédures de conjugaison décrites dans une vaste littérature [Hermanson, (1996), Bioconjugate Techniques, Academic Press, New York].

- 5 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  
10 formation d'une dialkylamine très stable.

## DESCRIPTION DE L'INVENTION

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

Elle a spécifiquement pour objet des pseudodipeptides N-acylés porteurs d'un  
20 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.



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 des substituants choisis parmi les groupes

30 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

Y représente O ou NH,

X et Z représentent un bras auxiliaire fonctionnalisé ou un groupe acide sous forme neutre ou chargée choisi parmi les groupements suivants :

-carboxyle

- 5 -carboxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]  
 -carboxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]  
 -phosphono [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]  
 -phosphono [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]  
 -dihydroxyphosphoryloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]  
 10 -dihydroxyphosphoryloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]  
 -dihydroxyphosphoryloxy  
 -hydroxysulfonyloxy  
 -hydroxysulfonyl [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]  
 -hydroxysulfonyl [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]  
 15 -hydroxysulfonyloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]  
 -hydroxysulfonyloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]  
 -[carboxy(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]aminocarbonyle  
 -[dicarboxy(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]aminocarbonyle  
 -[ammonio(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]aminocarbonyle  
 20 -{carboxy[amino(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]}aminocarbonyle

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

Le groupe auxiliaire en X ou Z répond à la formule générale (II)

25



A est O, S ou NH

le descripteur r prend une valeur de 0 ou de 1

30 le descripteur s prend une valeur variant de 1 à 10

W est choisi parmi les groupements :

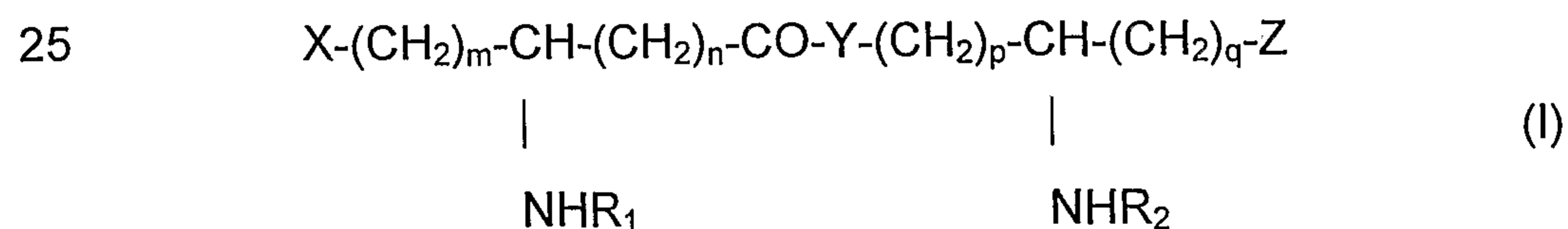
-formyle

-acétyle



- cyano
- halogéno
- amino
- bromo ou iodo-acétamido
- 5 -acylamido
- .-diacylimido
- sulfhydryle
- alkylthio
- hydroxyle
- 10 -1,2-dihydroxyéthyle
- alkoxy
- acyloxy
- vinyle
- éthynyle
- 15 -carboxyle libre
- carboxyle sous forme d'ester, d'anhydride mixte, d'amide ou d'hydrazide
- azido
- thiocyano

20 L'invention concerne tout particulièrement de nouveaux 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

30 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  $m, n$  prennent une valeur variant de 0 à 10

les descripteurs p, q prennent 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

5 auxiliaire fonctionnalisé,

Y représente O ou NH,

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

-carboxyle

-carboxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]

10 -carboxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]

-phosphono [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]

-phosphono [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]

-dihydroxyphosphoryloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]

-dihydroxyphosphoryloxy

15 -hydroxysulfonyloxy

-hydroxysulfonyl [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]

-hydroxysulfonyl [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]

-hydroxysulfonyloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]

-hydroxysulfonyloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]

20 et le groupe auxiliaire en X ou en Z répond à la formule générale II à l'exception du radical dihydroxyéthyle.

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.

25 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.

30

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 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.

5

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

10

Lorsque m est égal à 1 et n est égal à 0, la molécule dérive notamment de la sérine ou de l'acide aspartique. Lorsque m est égal à 2 et n est égal à 0, la molécule dérive notamment 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, de l'ornithine ou de l'arginine.

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

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

20 
$$\text{O-CO-(CH}_2\text{)}_s\text{-W} \quad \text{(III)}$$

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

W sera choisi de préférence parmi les groupements :

- formyle

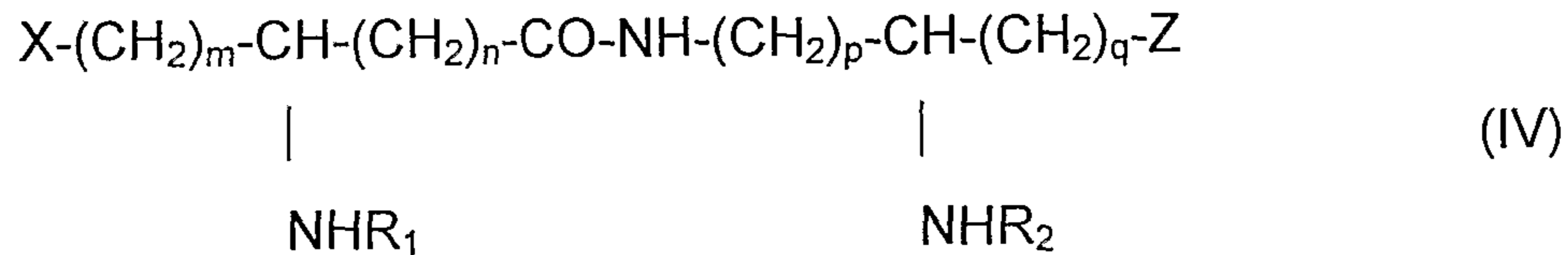
25 - amino

- hydroxyle

-1,2-dihydroxyéthyle

-carboxyle

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



- 5 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 (alkyl en  $C_1$  -  $C_{24}$ ) thio
- 10 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 un des substituants  $X$  ou  $Z$  est un carboxyle ou un radical dihydroxyphosphoryloxy ou un groupe carboxy [( $C_1$ - $C_5$ )alkoxy] ou carboxy [( $C_1$ - $C_5$ )alkylthio] ou un groupe [carboxy( $C_1$ - $C_5$ )alkyl]aminocarbonyle ou un groupe
- 15 [dicarboxy( $C_1$ - $C_5$ )alkyl]aminocarbonyle ou {carboxy[amino( $C_1$ - $C_5$ )alkyl]}aminocarbonyle et dans laquelle l'autre substituant est un radical acyloxy choisi parmi les groupes 6-aminohexanoyloxy, 6-oxohexanoyloxy, 6-hydroxyhexanoyloxy, 6,7-dihydroxyheptanoyloxy ou 3-carboxypropanoyloxy.
- 20 La définition de  $R_1$  et  $R_2$  englobe des dérivés acylés 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. Parmi les groupements acyle concernés, ceux dérivés de l'acide
- 25 laurique, de l'acide 2-hydroxyoctanoïque, de l'acide 3-hydroxymyristique, de l'acide 2-décanoyloxyoctanoïque, de l'acide 3-lauryloxy myristique, de l'acide 3-myristyloxy myristique et de l'acide 3-palmityloxy myristique sont ceux actuellement préférés.
- L'invention concerne en particulier à titre de composés préférés les
- 30 pseudodipeptides présentés dans le Tableau suivant:





Ex. #	X	*, **, *	Y	m, n, p, q	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	A	r	s	W
2.15	(HO) <sub>2</sub> P(O)-O	RS, R	NH	2, 0, 3, 1	3(HO)C <sub>14</sub>	3(C <sub>12</sub> O)C <sub>14</sub>	-	O	1	4	CHO
2.16	HOOC	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C <sub>12</sub> O)C <sub>14</sub>	3(HO)C <sub>14</sub>	-	O	1	5	NH <sub>2</sub>
2.17	HOOC	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C <sub>12</sub> O)C <sub>14</sub>	3(HO)C <sub>14</sub>	-	O	1	5	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH
2.18	HOOC	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C <sub>12</sub> O)C <sub>14</sub>	3(HO)C <sub>14</sub>	-	O	1	1	NH <sub>2</sub>
2.19	HOOC	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C <sub>12</sub> O)C <sub>14</sub>	3(HO)C <sub>14</sub>	-	O	1	2	COOH
2.20	H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCO	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C <sub>12</sub> O)C <sub>14</sub>	3(HO)C <sub>14</sub>	H	-	-	-	-
2.21	H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH(COOH) -NHCO	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C <sub>12</sub> O)C <sub>14</sub>	3(HO)C <sub>14</sub>	H	-	-	-	-
2.22	H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH(COOH) -NHCO	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C <sub>12</sub> O)C <sub>14</sub>	3(HO)C <sub>14</sub>	-	O	1	5	NH <sub>2</sub>
2.23	HOOCCH <sub>2</sub> CH(COOH) -NHCO	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C <sub>12</sub> O)C <sub>14</sub>	3(HO)C <sub>14</sub>	H	-	-	-	-
2.24	HOOCCH <sub>2</sub> CH(COOH) -NHCO	R, R	NH	1, 0, 3, 1	3(C <sub>12</sub> O)C <sub>14</sub>	3(HO)C <sub>14</sub>	-	O	1	5	NH <sub>2</sub>
2.25	HOOC	R, R	NH	1, 0, 3, 1	C <sub>2</sub>	3(HO)C <sub>14</sub>	-	O	1	5	NH <sub>2</sub>
2.26	HOOC	R, R	NH	1, 0, 3, 1	2(C <sub>10</sub> O)C <sub>8</sub>	3(HO)C <sub>14</sub>	-	O	1	5	NH <sub>2</sub>



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

- l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétra-decanoylamino] pentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique (Ex. 1.2)

5

- le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxy-tétradécanoylamino]-décan-1,10-diol-1-dihydrogénophosphate 10-(6,7-dihydroxyheptanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique (Ex. 2.1)

10

- 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 (Ex. 2.2)

15

- l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide 5-O-(6, 7-dihydroxy-heptanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique (Ex. 2.3)

20

- l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide 5-O-(6-oxohexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique (Ex. 2.4)

25

- les (3RS, 9R), (3R, 9R) et (3S, 9R)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogénéo-phosphate 10-(6-aminohexanoate) et leurs sels d'addition avec une base minérale ou organique (Ex. 2.6, 2.7 et 2.8)

30

- le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétra décanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogénéo-phosphate 10-(6-hydroxyhexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique (Ex. 2.9)

- 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 (Ex. 2.10)

5 - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique (Ex. 2.16)

10 - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-succinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique (Ex. 2.19)

15 - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1-carboxy-5-aminopentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique (Ex.2.22)

20 - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1,2-dicarboxyethyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique (Ex. 2.24)

25 Ces composés se distinguent par des propriétés pharmacologiques intéressantes et originales, notamment immunomodulatrices. Ils trouvent un intérêt particulier dans la préparation de compositions vaccinales dans des formulations par mélange ou 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 protozoaire ou dans la thérapie de certaines maladies autoimmunes.

30 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. Leurs propriétés chimiques qui permettent de les coupler avec des molécules d'intérêt 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  
5 une molécule d'intérêt thérapeutique par voie orale, parentérale, rectale, topique, 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  
10 réinoculer *in vivo* par voie parentérale.

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 molécules, conjuguées ou non, peuvent être en outre  
15 utilisées dans la thérapie de certaines maladies autoimmunes.

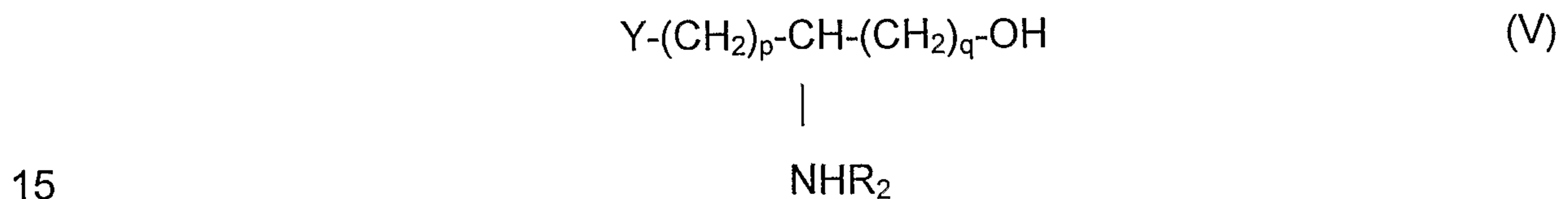
Par contre, certains des composés selon l'invention, après association covalente ou non, montrent des propriétés différentes dans leur capacité à induire la production de cytokines ou la maturation des cellules souches immunocompétentes provenant des organes hématopoïétiques et lymphoïdes.

20 Certains des composés selon l'invention sont susceptibles de favoriser 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 cellulaire.

Certains des composés favorisent la différenciation des cellules du système  
25 hématopoïétique notamment de la moelle osseuse et permettent d'améliorer ou de corriger certains dysfonctionnements du système immunitaire. Ils montrent en particulier des propriétés antivirales.

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  
30 dans la prévention ou la thérapie de maladies infectieuses chez l'homme et chez 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 et en fonction du poids des sujets.

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 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  $\omega$  d'un acide aminé  $\omega$ -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, en ce qu'on libère la fonction amine en position (q+1) que l'on acyle à l'aide d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule R<sub>2</sub>OH dans laquelle R<sub>2</sub> est défini comme précédemment, puis libère la fonction terminale pour obtenir l'amino alcool fonctionnalisé de formule générale V



15

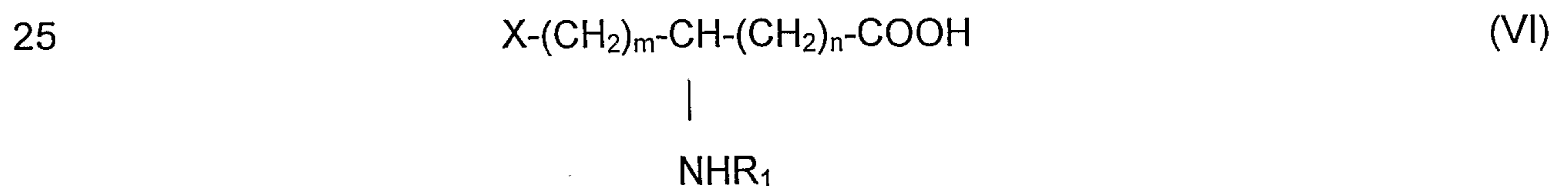
dans laquelle Y représente HO ou de préférence NH<sub>2</sub>,

R<sub>2</sub> représente le 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 ci-dessus,

20

p et q représentent chacun 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  $\omega$ -fonctionnalisé de formule générale VI



25

dans laquelle R<sub>1</sub> 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,

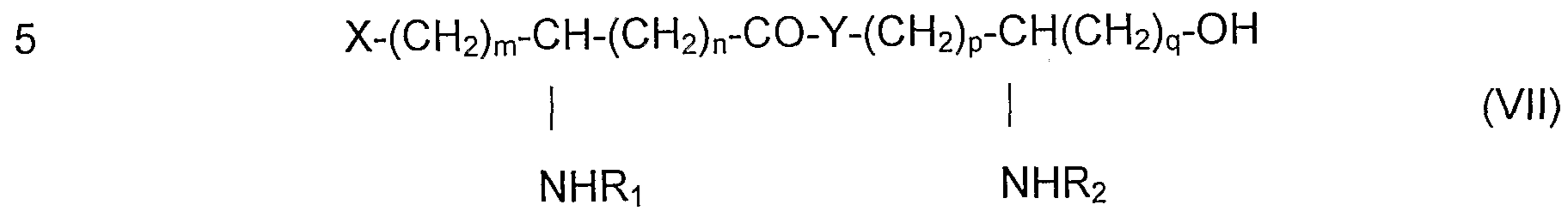
30

m et n sont un nombre entier variant de 0 à 10



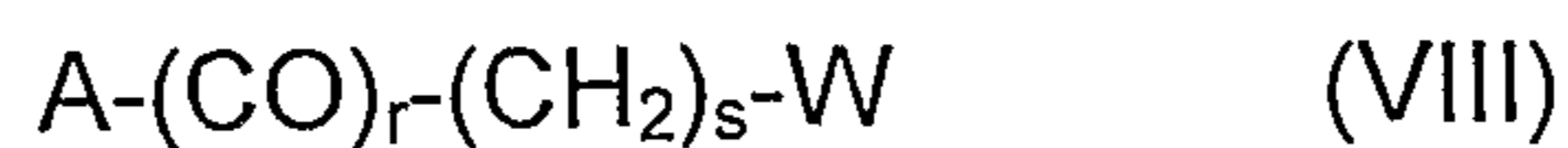
et X est un groupe acide défini comme précédemment qui peut être sous forme estérifiée,

pour former le pseudodipeptide de formule générale VII

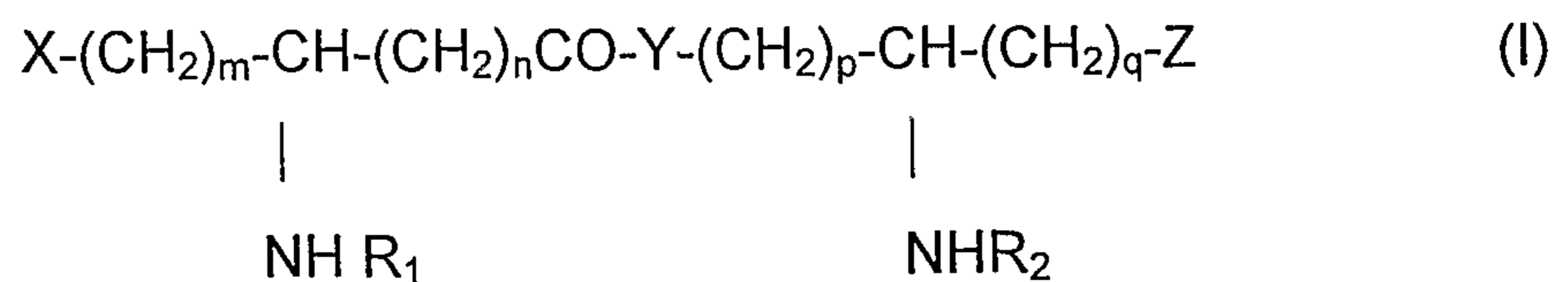


dans laquelle les substituants  $R_1$ ,  $R_2$ , et les descripteurs  $m$ ,  $n$ ,  $p$  et  $q$  sont définis  
10 comme précédemment,

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,



15 A pouvant être un groupe partant, une fonction OH, SH ou  $NH_2$   
le descripteur  $r$  est de préférence 1, mais prend également la valeur de 0  
le descripteur  $s$  varie de préférence de 2 à 6, mais prend en général une valeur variant de 1 à 10,  
W est choisi de préférence parmi l'un des groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -  
20 halogéno, -amino, -bromo ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -sulfhydryle, -alkylthio, -hydroxyle, -1,2-dihydroxyéthyle, -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  
25 hydrogénation catalytique ou à un autre processus de déprotection de façon à obtenir le dérivé de formule générale I

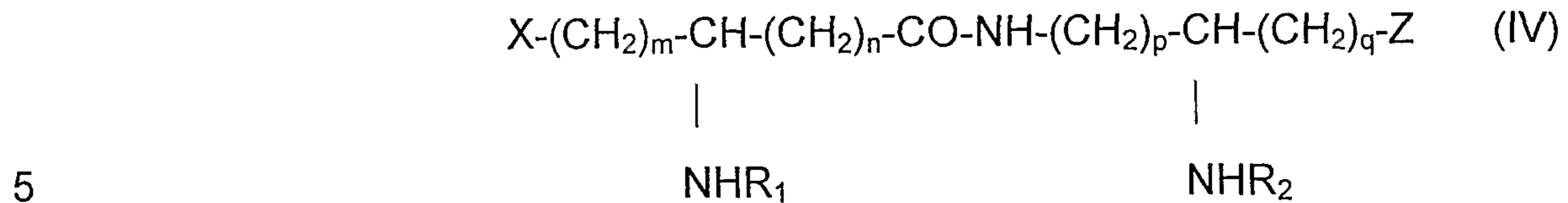


30

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



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



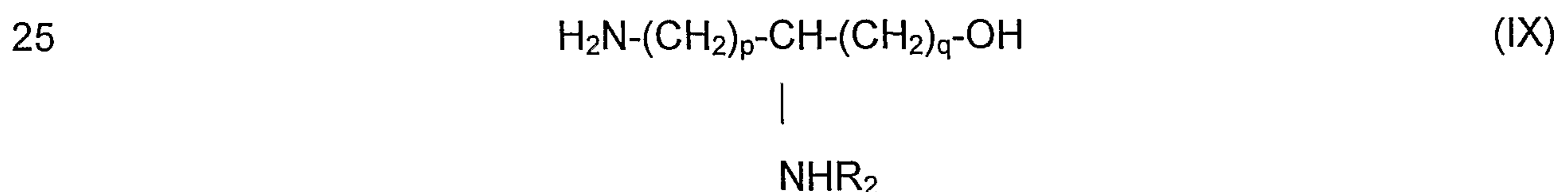
dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino,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

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

le descripteur  $n$  prend une valeur allant de 0 à 10

$X$  et  $Z$  représentent chacun un groupement acide sous forme neutre ou chargée ou un bras auxiliaire fonctionnalisé,

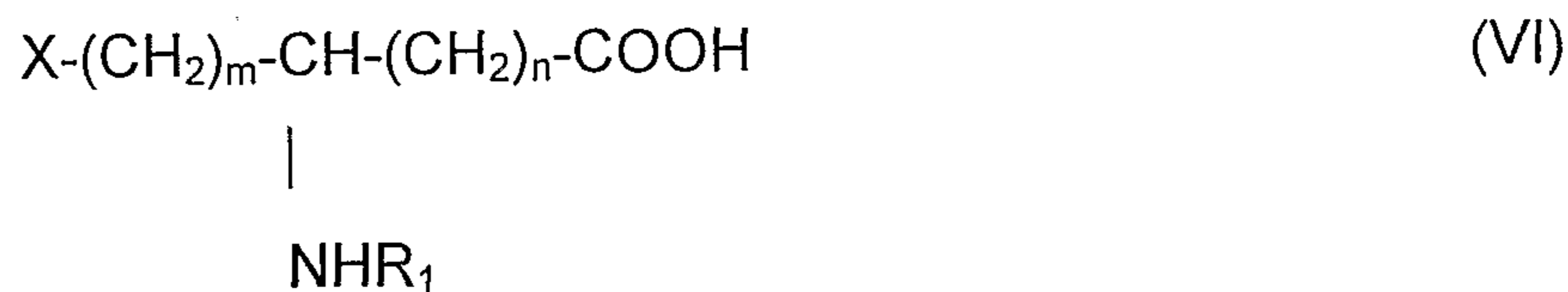
caractérisé en ce qu'on bloque les fonctions amine en position  $(q+1)$  et en  $\omega$  d'un acide diaminé de formule  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_p\text{CHNH}_2(\text{CH}_2)_{q-1}\text{COOH}$  par des réactifs de blocage labiles par acidolyse et hydrogénolyse, respectivement, soumet la fonction 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  $\text{R}_2\text{OH}$  dans laquelle  $\text{R}_2$  est défini comme précédemment, puis libère la fonction amine terminale par hydrogénolyse pour obtenir l'amino alcool de formule générale IX



dans laquelle  $\text{R}_2$  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  $\omega$ -hydroxylé de formule générale VI



5

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

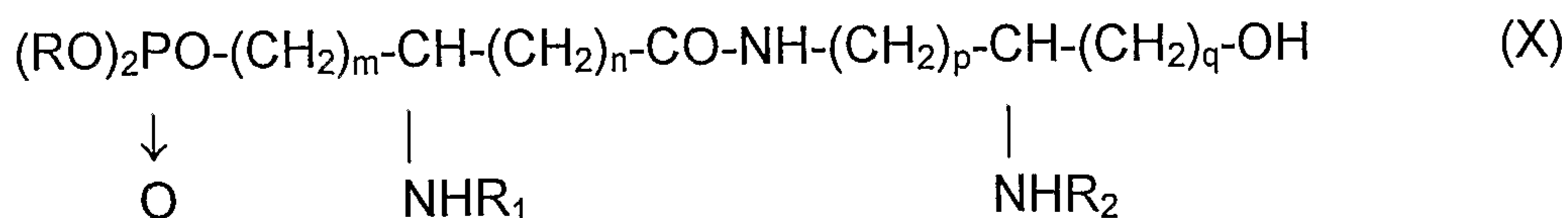
$m$  est un nombre entier variant de 1 à 10

10  $n$  est un nombre entier variant de 0 à 10

et  $X$  est un groupe dialkyloxy- ou diaryloxy-phosphoryloxy de formule  $(\text{RO})_2 \text{P}-\text{O}$   
 $\downarrow$   
 $\text{O}$

pour former le pseudodipeptide de formule générale  $X$

15



20 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 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,

25



$A$  pouvant être un groupe partant, une fonction  $\text{OH}$ ,  $\text{SH}$  ou  $\text{NH}_2$

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

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

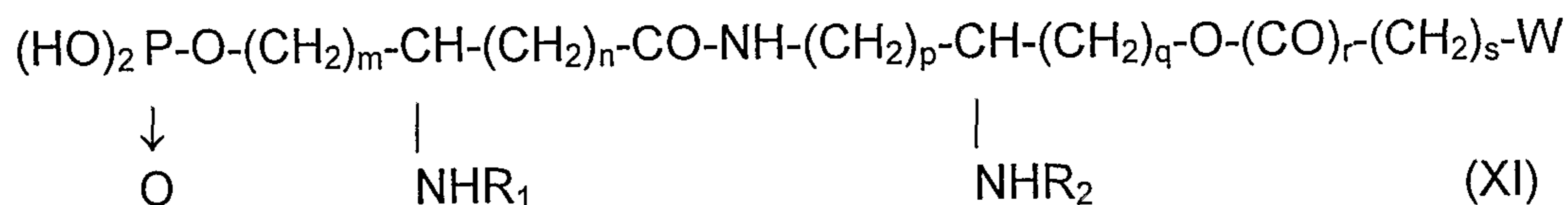
$W$  étant choisi de préférence parmi les groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -amino, -bromo- ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -sulfhydryle, -alkylthio,, -hydroxyle, -1,2-dihydroxyéthyle,-acyloxy, -vinyle, -ethynyle, -carboxyle



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

5 obtenir le dérivé de formule générale XI

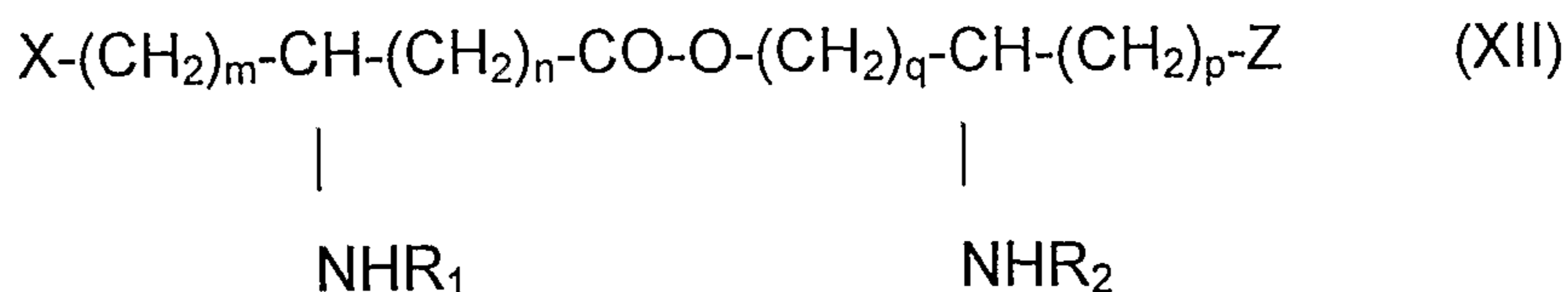


10

dans laquelle les substituants W, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, m, n, p, q, r, s ont les significations fournies antérieurement.

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

15 formule générale XII



20 dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> 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 C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>) thio

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

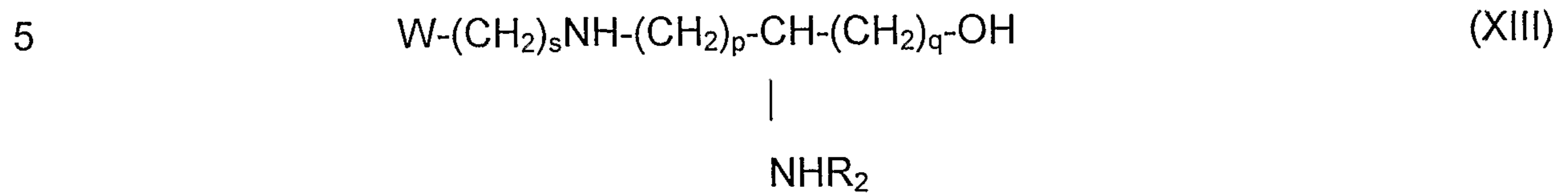
le descripteur n prend une valeur allant de 0 à 10

et dans laquelle X et Z représentent chacun un groupement acide ou un bras 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 H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>CHNH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>q-1</sub>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 R<sub>2</sub>OH dans laquelle R<sub>2</sub> est défini



comme précédemment, libère la fonction amine terminale par hydrogénolyse puis alkyle la fonction amine avec un ester réactif d'alkyle  $\omega$ -fonctionnalisé comme un triflate pour obtenir l'amino alcool de formule générale XIII

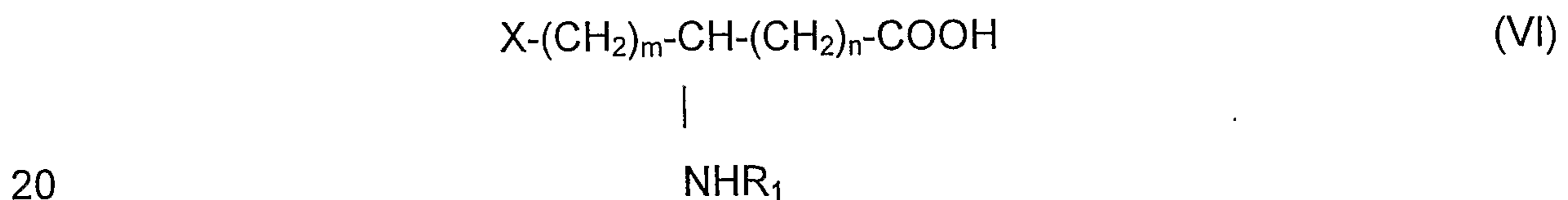


dans laquelle  $R_2$  représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2  
 10 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus,

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

le descripteur  $s$  étant compris de préférence entre 2 et 7, mais prend une valeur variant de 1 à 10

15 que l'on condense en présence d'un agent de condensation dans un solvant inerte avec un dérivé d'acide aminé  $\omega$ -hydroxylé 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

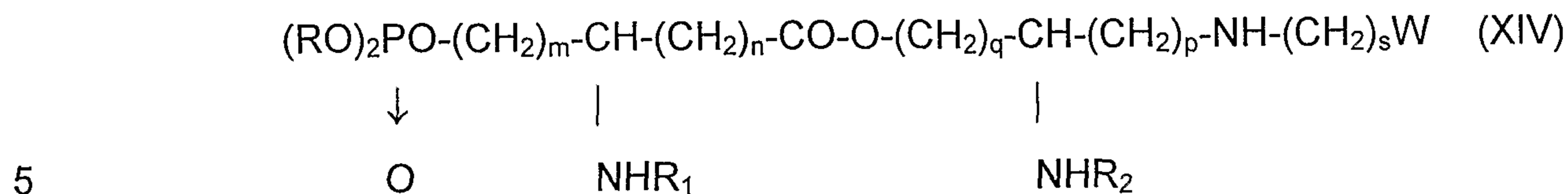
25  $m$  est un nombre entier variant de 1 à 10

$n$  est un nombre entier variant de 0 à 10

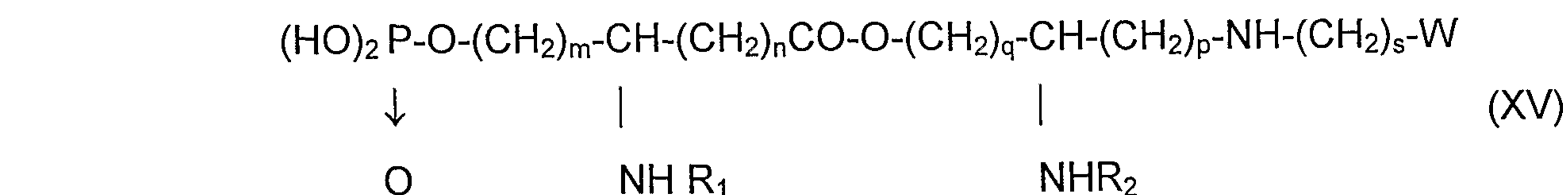
et  $X$  est un groupe dialkyloxy- ou diaryloxy-phosphoryloxy de formule  $(RO)_2 P-O$



pour former le pseudodipeptide de formule générale XIV



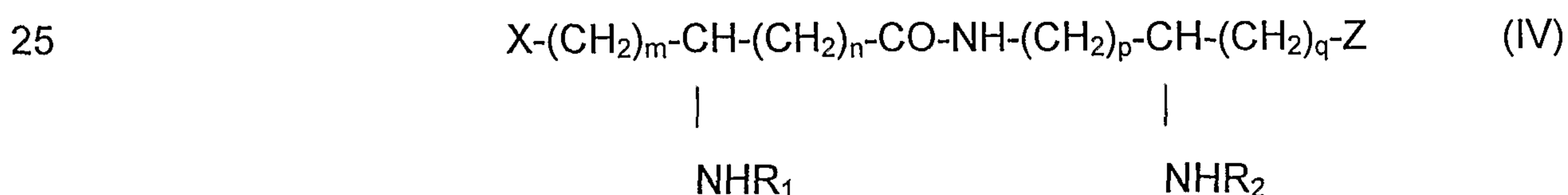
dans laquelle les substituants  $R_1$ ,  $R_2$  et les descripteurs  $m$ ,  $n$ ,  $p$ ,  $q$  et  $s$  sont définis comme précédemment, et  $R$  est un radical labile par hydrogénolyse, puis en ce qu'on le soumette à une hydrogénation catalytique ou à un processus de  
 10 déprotection de façon à obtenir le dérivé de formule générale XV



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

$W$  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  
 20 d'hydrazide, -azido, -thiocyano ou leurs précurseurs.

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



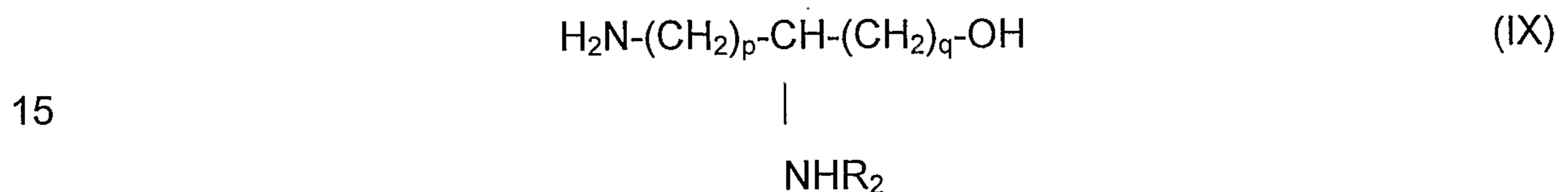
dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide  
 30 carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyl en  $\text{C}_1-\text{C}_{24}$ ) 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

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

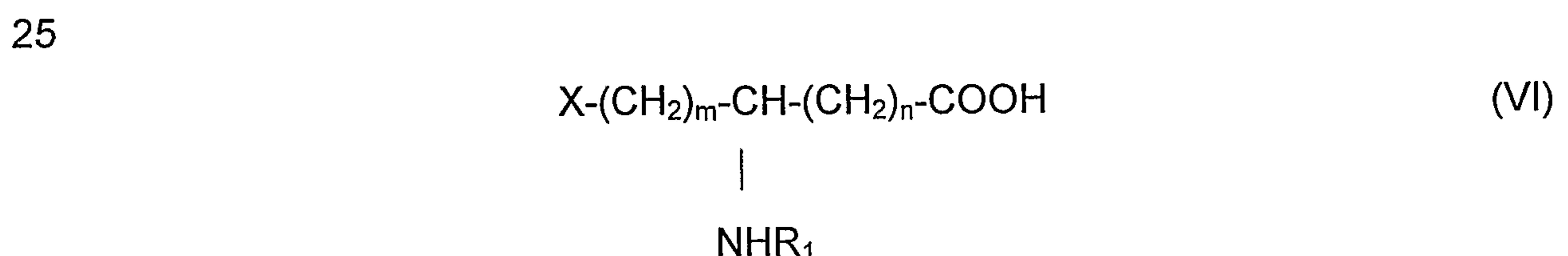
- 5 qui consiste en ce qu'on bloque les fonctions amine en position (q+1) et en  $\omega$  d'un acide diaminé de formule  $H_2N(CH_2)_pCHNH_2(CH_2)_{q-1}COOH$  par des réactifs de blocage labiles par acidolyse et hydrogénéolyse, respectivement, soumet la fonction carboxylique restée libre à l'action 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  
 10 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  
 20 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' $\omega$ -carboxy amino acide 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

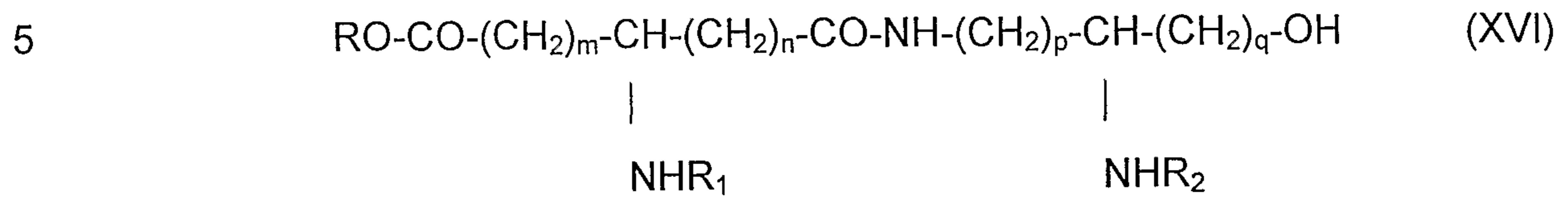
m est un nombre entier variant de 1 à 10



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  
 10 comme précédemment, et R est un groupe labile par hydrogénolyse, comme par  
 exemple le groupe benzyle,

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 est un groupe partant, une fonction OH, SH ou  $\text{NH}_2$

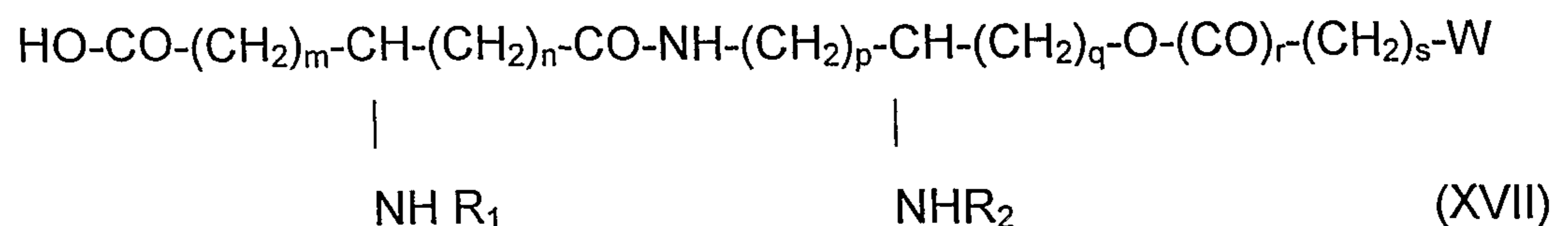
le descripteur  $r$  étant de préférence 1, mais pouvant prendre également une valeur  
 de 0

le descripteur  $s$  étant compris de préférence entre 2 et 6, mais pouvant prendre une  
 20 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, -1,2-dihydroxyéthyle, -acyloxy, -vinyle, -ethynyle, -carboxyle  
 25 libre ou sous forme d'ester, d'anhydride mixte, d'amide ou d'hydrazide, -azido, -  
 thiocyno ou leurs précurseurs,

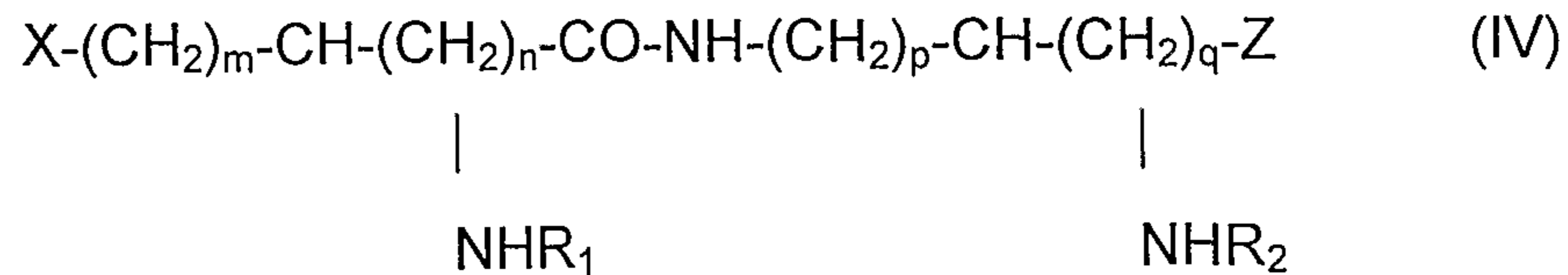
si nécessaire en présence d'un agent de couplage, et de le soumettre à une  
 hydrogénation catalytique ou à un processus de déprotection, de façon à obtenir le  
 dérivé de formule générale XVII

30



dans laquelle les substituants W, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, m, n, p, q, r, s ont les significations fournies antérieurement.

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



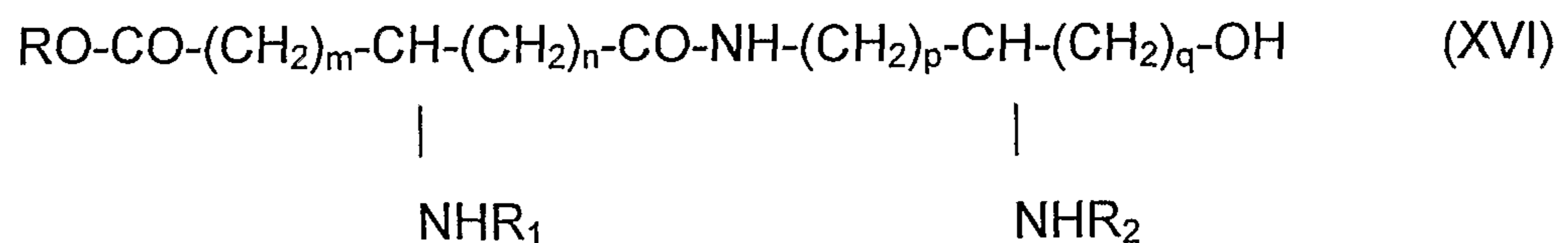
10 dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyl en C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>) thio

15 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

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

20 qui consiste en ce que l'on bloque la fonction hydroxyle libre d'un pseudodipeptide de formule générale XVI



25

dans laquelle les substituants R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et les descripteurs m, n, p et q sont définis comme précédemment, et R est un groupe labile par hydrogénéolyse comme par exemple le groupe benzyle,

30

avec un groupe protecteur labile par acidolyse, libère la fonction carboxyle présente sous forme d'ester, soumet cette fonction carboxylique éventuellement sous forme activée à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool primaire correspondant,



convertit cette fonction alcool en ester phosphorique par traitement avec un agent de phosphorylation ; la fonction hydroxyle protégée est libérée par traitement avec un acide, puis soumise à une réaction de substitution, d'acylation ou d'alkylation avec un réactif de formule générale VIII

5



A pouvant être un groupe partant, une fonction OH, SH ou NH<sub>2</sub>

le descripteur r est de préférence 1, mais prend également une valeur de 0

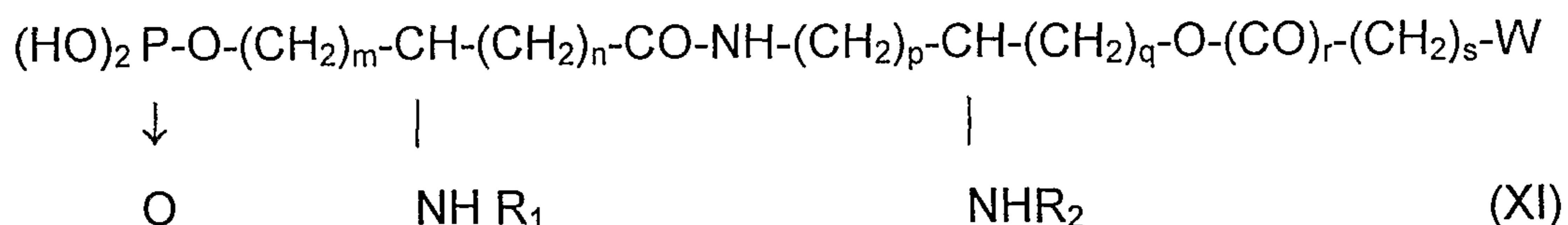
10 le descripteur s varie de préférence de 2 à 6, mais prend en général une valeur variant de 1 à 10

W étant choisi de préférence parmi l'un des groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -amino, -bromo- ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -sulfhydryle, -alkylthio, -hydroxyle, -1,2-dihydroxyéthyle, -acyloxy, -vinyle, -ethynyle, -carboxyle

15 libre ou présent sous forme d'ester ou d'un autre dérivé

si nécessaire en présence d'un agent de couplage, et le produit ainsi formé est déprotégé, par exemple par hydrogénolyse, de façon à obtenir le produit de formule générale XI

20

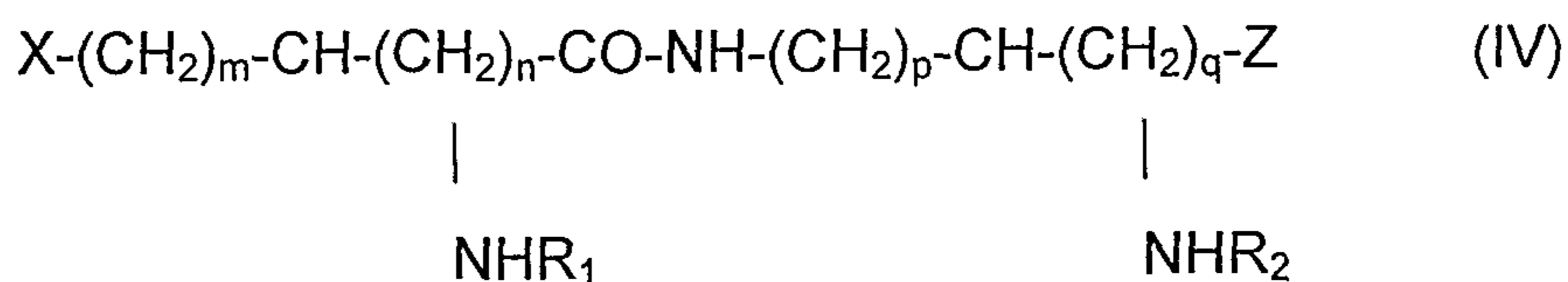


25

dans laquelle les substituants W, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, m, n, p, q, r, s ont les significations fournies antérieurement.

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

30



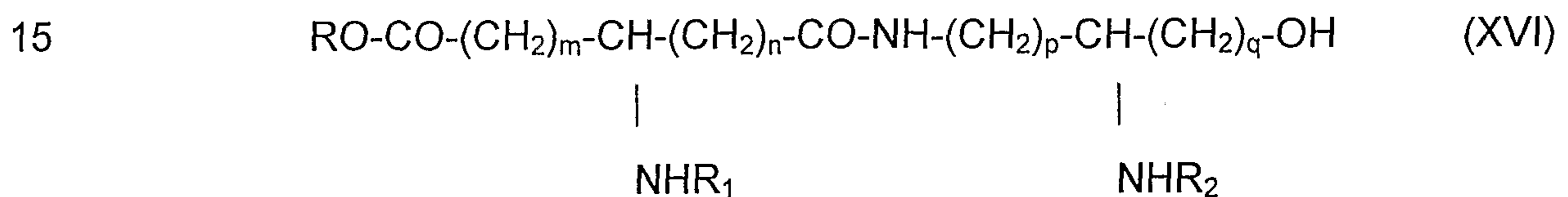
dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe  
5 formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy,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

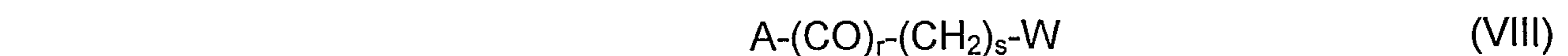
et dans laquelle  $X$  et  $Z$  représentent chacun un groupement acide ou un bras  
10 auxiliaire fonctionnalisé

qui consiste en ce que l'on déprotège la fonction carboxyle présente sous forme d'ester dans un pseudodipeptide de formule générale XVI



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

puis soumet l'acide ainsi formé à une réaction de couplage peptidique avec un diamino alcane ou un acide aminé partiellement protégés tel que, par exemple, le 3-benzyloxycarbonylamino-1-aminopropane, le L-aspartate de dibenzyle ou l'ester  
25 benzylique de la  $\epsilon$ -N-benzyloxycarbonyl-L-lysine, en présence d'un agent de couplage peptidique, puis soumet, si désiré, le produit de couplage à une réaction de substitution, d'acylation ou d'alkylation avec un réactif de formule générale VIII



A pouvant être un groupe partant, une fonction OH, SH ou  $\text{NH}_2$

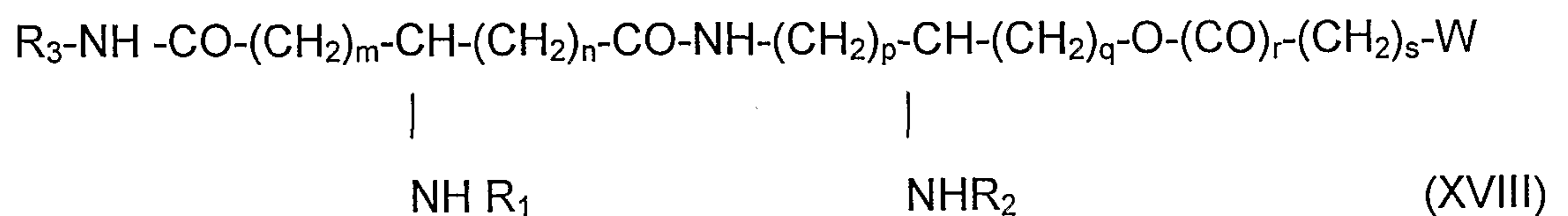
le descripteur  $r$  est de préférence 1, mais prend également une valeur de 0



le descripteur s varie de préférence de 2 à 6, mais prend en général une valeur variant de 1 à 10

W étant choisi de préférence parmi l'un des groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -amino, -bromo- ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -sulfhydryle, -alkylthio, -hydroxyle, -1,2-dihydroxyéthyle, -acyloxy, -vinyle, -ethynyle, -carboxyle libre ou présent sous forme d'ester ou d'un autre dérivé

si nécessaire en présence d'un agent d'activation, et le produit ainsi formé est déprotégé, par exemple par hydrogénolyse, de façon à obtenir le produit de formule générale XVIII



15

dans laquelle les substituants W, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, m, n, p, q, r, s ont les significations fournies antérieurement et le groupe R<sub>3</sub> représente un groupe aminoalkyle, carboxyalkyle, dicarboxyalkyle ou aminocarboxyalkyle.

20

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 les énantiomères ou diastéréoisomères des composés de formule générale I ou IV ou XII ou XVI, font partie de l'invention.

De façon générale, les composés de l'invention sont préparés par 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 d'introduire un bras auxiliaire fonctionnalisé, qui peut être éventuellement modifié

30

après accrochage afin de libérer une fonction réactive. La déprotection du produit final libère une fonction acide.

Dans une méthode actuellement préférée pour préparer les composés de l'invention (Figure 1), l'acide aminé  $\omega$ -fonctionnalisé est un acide  $\alpha$ -aminé  $\omega$ -hydroxylé tel que la sérine ou l'homosérine, qui est soumis à une séquence de réactions de N-protection (par exemple sous la forme de dérivé t-butoxycarbone), formation d'un ester benzylique par O-alkylation du carboxylate et phosphorylation de la fonction OH afin 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-butoxycarbone avec 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-dodécanoyloxytétradécanoïque. La forme activée peut être un chlorure d'acyle, un ester activé, un anhydride mixte ou toute autre forme chimique permettant la formation de la liaison amide. L'ester benzylique éventuellement présent est ensuite éliminé par hydrogénolyse sélective pour donner un acide carboxylique portant un groupe acylamido en position  $\alpha$  et un groupe  $(RO)_2P(O)O^-$  en position  $\omega$ .

Le partenaire de la réaction de couplage peptidique est obtenu de préférence à partir d'un  $\alpha,\omega$ -diaminoacide tel que l'ornithine ou la lysine par une séquence de réactions de protection sélective de la fonction amine en position  $\omega$ , par exemple sous la forme de dérivé benzyloxycarbone, par l'intermédiaire d'un complexe de cuivre selon une méthode décrite dans Organic Preparations [Organic Preparations and Procedures International (1992), 23, 191-194], élimination du complexe de cuivre et protection de la fonction amine en position  $\alpha$ , par exemple sous forme de dérivé t-butoxycarbone. D'autres groupes protecteurs peuvent être utilisés. La fonction carboxylique libre est réduite en alcool primaire en utilisant par exemple le complexe borane sulfure de diméthyl ou par le traitement d'un anhydride mixte préformé par le borohydrure de sodium, selon la méthode décrite dans [Tetrahedron Letters (1991), 32, 923-92]. La fonction amine en position  $\alpha$  est libérée en milieu acide (par exemple par traitement avec l'acide 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  $\omega$ -amino est libérée par traitement avec un réactif inerte vis à vis des autres groupes protecteurs présents, comme par exemple par hydrogénolyse sélective dans un solvant hydroxylique contenant de la triéthylamine si le groupe protecteur est un benzyloxycarbone.

Dans la méthode de synthèse actuellement préférée, l'amine ainsi obtenue est couplée avec l'acide carboxylique  $\alpha$ -acylaminé  $\omega$ -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  $\omega$ -fonctionnalisé tel que l'acide 6-hepténoïque en présence de EDCI ou d'un autre agent d'esterification. (Figure 5). La fonction alcène de cet ester est soumise à une réaction de dihydroxylation en présence de tétraoxyde 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 (Ex. 2.1). Dans une dernière étape, le diol vicinal est soumis à une oxydation comme par exemple par l'acide periodique pour donner naissance à une fonction aldéhyde réactive (Ex. 2.2). La réduction de la fonction aldéhyde en alcool primaire conduit au dérivé porteur d'un groupe  $\omega$ -hydroxyacyle (Ex. 2.9).

Dans une variante du procédé, le produit de couplage peptidique est O-acylé par un dérivé d'un acide  $\omega$ -aminoalkanoïque, tel que l'acide 6-benzyloxycarbonylaminohexanoïque (Figure 11). Le produit ainsi obtenu est soumis à une réaction de déprotection complète par hydrogénolyse en présence d'un catalyseur ce qui fournit un pseudodipeptide portant un bras auxiliaire aminoalkanoyle (Ex. 2.6).

30

Dans une seconde méthode préférée, le partenaire acide de la réaction de couplage peptidique est dérivé de l'acide D ou L-aspartique ou le cas échéant de l'acide D ou L-glutamique (Figure 2). Le dérivé de l'acide aspartique est obtenu par N-acylation

de la fonction amine de l'ester  $\beta$ -benzylique de cet acide aminé avec un acide gras, de préférence un dérivé d'un acide gras 3-hydroxylé tel que l'acide 3-dodécanoyloxytétradécanoïque, en présence d'un agent d'acylation. Ce produit est couplé avec un amino alcool du type décrit ci-dessus, puis le pseudodipeptide ainsi obtenu est soumis à une réaction d'hydrogénolyse en présence de catalyseur tel le charbon palladié ou le platine sur support, pour produire le pseudodipeptide portant une fonction acide carboxylique (Ex. 1.2), ou à une réaction de phosphorylation, par exemple par la méthode au phosphoramidite, suivie d'une réaction d'hydrogénolyse pour donner le pseudodipeptide portant une fonction carboxylique et une fonction phosphorique (Ex. 1.3).

Dans une variante, la fonction hydroxyle du pseudodipeptide obtenu précédemment (Figure 2) est acylée avec un acide  $\omega$ -fonctionnalisé. De préférence, l'acide  $\omega$ -fonctionnalisé est un acide  $\omega$ -alcénoïque ou un acide  $\omega$ -aminoalkanoïque. Dans le cas de l'acide hepténoïque (Figure 8), le pseudodipeptide conduit au dérivé O-hepténoyle qui est soumis successivement aux réactions de dihydroxylation en présence de tétr oxyde d'osmium, puis de déprotection (Ex 2.3) et d'oxydation périodique (Ex. 2.4) ; la réduction de la fonction aldéhyde ainsi formée avec un agent réducteur comme par exemple le borohydrure de sodium donne le pseudodipeptide porteur d'une fonction  $\omega$ -hydroxyalkanoyle (Ex. 2.5). Dans le cas d'un acide  $\omega$ -aminoalkanoïque comme le dérivé N-benzyloxycarbonyle de l'acide 6-aminohexanoïque ou de la glycine (Figure 24), l'acylation du pseudodipeptide conduit aux dérivés O-aminoacylés protégés qui sont ensuite soumis à une réaction de déprotection par hydrogénolyse (Ex. 2.16 et 2.18).

25

Dans une deuxième variante (Figure 13), le pseudodipeptide intermédiaire décrit dans la Figure 2 est soumis à une réaction de protection de la fonction hydroxyle libre, de préférence sous la forme d'un éther de tétrahydropyranyle, puis la fonction carboxyle présente sous forme d'ester est déprotégée par hydrogénolyse ou par une autre méthode de déprotection, puis réduite, de préférence après activation sous forme d'anhydride mixte, avec un agent de réduction comme le borohydrure de sodium ; la fonction hydroxyle ainsi formée est soumise à une réaction de phosphorylation, de préférence par la méthode au phosphoramidite, puis l'éther de

30



tétrahydropyranyle est hydrolysé en milieu acide et la fonction hydroxyle ainsi régénérée soumise à une réaction d'acylation avec un acide carboxylique  $\omega$ -fonctionnalisé. De préférence, l'acide  $\omega$ -fonctionnalisé est un acide  $\omega$ -alcénoïque ou un acide  $\omega$ -aminoalkanoïque. Dans le cas de l'acide 6-benzyloxycarbonyl-aminohexanoïque, le pseudodipeptide conduit au dérivé O-aminoacylé protégé qui est ensuite soumis à une réaction d'hydrogénolyse (Ex. 2.7, Ex 2.8). Alternativement, l'intermédiaire monophosphorylé du paragraphe précédent peut être obtenu (Figure 15) par le couplage peptidique d'un dérivé N-acylé du  $\beta$ -benzyl ester de l'acide aspartique (Figure 2) avec une forme protégée, par exemple sous forme d'éther de benzyloxyméthyle, de tétrahydropyranyle, ou de silyle de l'aminoalcool dérivé de l'ornithine (Figure 1), suivi de la libération de la fonction acide présente sous forme d'ester de benzyle, de sa réduction en alcool primaire, de la phosphorylation de cette fonction et de la déprotection de la fonction alcool protégée sous forme d'éther de benzyloxyméthyle, de tétrahydropyranyle, ou de silyle.

Dans une troisième variante, le pseudodipeptide intermédiaire décrit dans la Figure 2 est soumis à une réaction d'O-acylation (Figure 27) avec un dérivé d'un acide dicarboxylique, préféablement l'anhydride succinique, en présence d'une base ou d'un agent de couplage, puis le nouvel ester ainsi formé est soumis à une réaction de déprotection par hydrogénolyse (Ex. 2. 19). Le traitement des dérivés O-aminoacylé déprotégés avec l'anhydride succinique donne des pseudodipeptides porteurs d'un groupe succinylaminoacyle (Ex . 2.17).

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' $\omega$ -alcényle, comme le triflate de hept-6-ényle (Figure 17). Le couplage de cet amino alcool portant une amine secondaire, avec l'acide  $\alpha$ -acylaminé  $\omega$ -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 tétroxyde d'osmium, puis les groupes protecteurs sont éliminés par hydrogénolyse en présence de catalyseurs appropriés, et la fonction diol vicinal est oxydée par le periodate de sodium pour produire une fonction aldéhyde réactive (Ex. 2.10).



Dans une quatrième méthode préférée (Figure 19), le dérivé N-protégé de la sérine, par exemple le dérivé p-méthoxybenzyloxycarbonyle 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  
5 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  
10 (Figure 1) en présence d'un agent de couplage peptidique tel que le IIDQ, puis la fonction OH libre est acylée avec un acide alkanoïque  $\omega$ -fonctionnalisé en présence d'un réactif d'activation comme un carbodiimide. De préférence, cet acide fonctionnalisé est un acide  $\omega$ -alcénoïque ou un dérivé d'un acide  $\omega$ -aminoalkanoïque. Par exemple, avec l'acide hept-6-énoïque, le pseudodipeptide  
15 conduit au dérivé O-(6-hepténoyle) qui est soumis successivement aux réactions de dihydroxylation en présence de tétroxyde d'osmium, puis de déprotection par hydrogénolyse et d'oxydation périodique (Ex. 2.11)

Dans une cinquième méthode actuellement préférée, l'acide aminé de départ est la cystéine ou l'homocystéine (Figure 20). Par exemple, la cystéine est S-alkylée avec  
20 le bromoacétate de p-méthoxybenzyle, puis N-acylée, de préférence 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 un halogénure d'acide ou une 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  
25 en présence de IIDQ ou d'un agent de couplage peptidique. La fonction libre OH primaire est ensuite O-acylée avec un acide alkanoïque  $\omega$ -fonctionnalisé, utilisé sous la forme d'un ester activé comme un ester O-benzotriazolyle. De préférence, cet acide est un acide  $\omega$ -aminoalkanoïque tel que l'acide 7-(p-méthoxybenzyloxycarbonylamino)heptanoïque. Le produit ainsi obtenu est soumis à  
30 une réaction de déprotection complète en milieu acide aqueux ce qui fournit un pseudodipeptide portant un bras auxiliaire 7-aminoheptanoyle (Ex. 2.12).

Dans une autre méthode préférée (Figure 21), le dérivé N-p-méthoxybenzyloxycarbonylé de la sérine 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, de préférence par un dérivé d'un acide gras 3-acyl-hydroxylé tel que l'acide 3-dodécanoyloxytétradécanoïque, en présence d'un agent d'acylation ou en  
5 utilisant un dérivé fonctionnel d'acide gras tel que le chlorure d'acide ou toute autre forme activée de l'acide gras. Le dérivé N-acylé O-alkylé de la sérine 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 alcanoïque  $\omega$ -fonctionnalisé. De préférence, cet  
10 acide est un acide  $\omega$ -alcénoïque ou un dérivé d'un acide  $\omega$ -aminoalkanoïque, par exemple, l'acide hept-6-énoïque, et ainsi le pseudodipeptide conduit au dérivé O-(6-hepténoyle) qui est soumis successivement aux réactions de dihydroxylation en présence de tétroxyde d'osmium, puis de déprotection par hydrogénolyse et d'oxydation périodique, pour conduire au dérivé portant un bras auxiliaire 6-  
15 oxohexanoyle et un groupe malonyle (Ex. 2.13).

Dans une méthode alternative également préférée (Figure 22), le dérivé 6-aminohexanoyle décrit plus haut (Figure 11) 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  
20 bras auxiliaire 6-(bromoacétamido)hexanoyle (Ex. 2.14).

Dans une huitième méthode préférée (Figure 23), l'ester benzylique de l'homosérine O-phosphorylée (voir Figure 1) est N-acylé avec l'acide 3-benzyloxytétradécanoïque, de préférence en utilisant l'anhydride mixte préparé à partir de l'acide 3-benzyloxytétradécanoïque et du chloroformiate d'isobutyle. L'ester de benzyle est  
25 ensuite hydrogénolysé de façon sélective comme décrit plus haut. Le dérivé  $\omega$ -N-benzyloxycarbonyle du diamino alcool dérivé de l'ornithine (voir Figure 1) est N $_{\alpha}$ -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  $\omega$ -amino est libérée par hydrogénolyse sélective. Cette amine est couplée  
30 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 alcanoïque  $\omega$ -fonctionnalisé par exemple en présence d'un carbodiimide. De préférence, cet acide est un acide

$\omega$ -alcénoïque ou un dérivé d'un acide  $\omega$ -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 tétr oxyde 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 (Ex. 2.15).

Dans une neuvième méthode préférée (Figures 29, 31 et 34), le pseudodipeptide intermédiaire décrit dans la Figure 2 est soumis à une réaction de déprotection de la fonction carboxyle présente sous forme d'ester, puis cette fonction carboxyle est couplée avec un aminoalcane fonctionnalisé, en présence d'un agent de couplage. De préférence l'aminoalcane fonctionnalisé est un dérivé d'un  $\alpha,\omega$ -diaminoalcane ou d'un acide aminé. Dans le cas du 1-amino-3-benzyloxycarbonylaminopropane (Figure 29), le produit de couplage est ensuite soumis à une réaction d'hydrogénolyse (Ex. 2.20). Dans le cas de l'ester benzylique de la N<sup>E</sup>-Z-lysine (Figure 31) et de l'aspartate de  $\alpha,\beta$ -dibenzyle (Figure 34), le produit de couplage est soit soumis à une réaction de déprotection, de préférence par hydrogénolyse (Ex. 2.21 et 2.23), soit soumis à une réaction de O-acylation avec un acide alcanoïque  $\omega$ -fonctionnalisé, de préférence le dérivé N-benzyloxycarbonylé de l'acide 6-aminohexanoïque. L'ester ainsi formé est ensuite déprotégé par hydrogénolyse ou une autre méthode de déprotection (Ex. 2.22 et 2.24).

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

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.

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.



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.

5

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  
10 solutés pénétrants.

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  
15 utilisés de préférence par la voie injectable sous forme de conjugués sous forme de solutions ou de suspensions aqueuses, éventuellement neutralisées par une amine ou une hydroxyalkylamine. A titre d'exemple on pourra citer l'antigène H1N1, l'antigène nonapeptide SYVPSAEQI de Plasmodium et les pharmacophores tels que l'AZT, le d4T, ainsi que des antibiotiques comme les macrolides et les substances  
20 possédant une action sur le SNC.

Les exemples suivants, présentés dans les Figures 1 à 86, illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

## EXEMPLES

### 1<sup>ère</sup> série d'exemples: préparation des intermédiaires de synthèse

#### EXEMPLE 1.1.

5 **1-(Diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétra-décanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-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 H<sub>2</sub>O (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 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 heures. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu est épuisé avec de l'acétate  
25 d'éthyle (2x20 ml). La phase organique est lavée avec H<sub>2</sub>O (20 ml) puis avec une solution saline (20 ml). Après séchage sur MgSO<sub>4</sub>, le solvant est évaporé et le résidu est utilisé tel quel pour l'étape suivante.

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

30 A une solution du résidu sec de l'étape précédente dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (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), H<sub>2</sub>O (30 ml) puis avec une solution saline (30 ml). La phase organique est séchée sur  
5 MgSO<sub>4</sub>, 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.

10 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/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 10/1) permet de  
15 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

20 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  
25 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/Et<sub>3</sub>N (30 ml/5 ml). Après agitation pendant 18 heures à température ambiante, le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est dilué avec H<sub>2</sub>O (20 ml) et est extrait avec de l'acétate d'éthyle (2 x 30 ml). Les phases organiques sont combinées,  
30 lavées successivement avec de l'eau (20 ml) et avec de la saumure (20 ml), puis séchées sur MgSO<sub>4</sub> 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. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz), δ en ppm : 7.4-7,1 (m, 15H) ; 6.90 (2d, 1H, <sup>3</sup>J = 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). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 63 MHz), δ en ppm : 173.01 ; 171.08 ; 169.66 ; 150.18 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,C</sub>=7.1 Hz) ; 135.01 ;  
 5 129.60 ; 128.33 ; 128.14 ; 127.96 ; 125.21 ; 119.80 (d, <sup>3</sup>J<sub>P,C</sub>=5.0 Hz) ; 70.69 ; 67.05 ;  
 65.19 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,C</sub>=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-dodécanoyloxytétradécanoyl  
 10 amino] 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,  
 15 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<sub>f</sub> = 0.75 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N 10/1/0.5). <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 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  
 20 (m, 4H) ; 1.4-1.1 (m, 34H) ; 0.9 (t, 6H). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 63 MHz), δ en ppm: 173.35 ; 173.30 (2 diast.) ; 172.75 ; 170.37 ; 150.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,C</sub>=7.5 Hz) ; 129.55 ; 125.28 ; 119.71 (d, <sup>3</sup>J<sub>P,C</sub>=4.4 Hz) ; 70.78 ; 65.65 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,C</sub>=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.

25

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

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  
 30 ajoutée une solution de sulfate cuivrique pentahydraté (3.814 g ; 15.3 mmol) dans H<sub>2</sub>O (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

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

5 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  
10 ml), H<sub>2</sub>O (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).

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

15 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  
20 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  
25 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 H<sub>2</sub>O (30 ml) et avec une solution saline (30 ml), puis évaporées sous vide. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20/1) permet de  
30 recueillir le produit attendu sous forme d'une huile incolore (Rdt : 8.42g en deux étapes soit 76.7 % de la théorie) (R<sub>f</sub> = 0.19 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20/1).

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  
5 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 H<sub>2</sub>O (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 H<sub>2</sub>O (50 ml), une solution saline  
10 (60 ml), puis séchées sur MgSO<sub>4</sub>. 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.

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

15 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/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 10/1) permet de recueillir le sel trifluoroacétique sous forme  
20 d'une huile (5.45 g ; 82.7 %). Le chlorhydrate fond à 133.0 - 134.3° C (recristallisation du méthanol).

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

25 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)  
30 dans un mélange THF/Et<sub>3</sub>N (30 ml/1.44 ml). L'agitation est poursuivie à température ambiante pendant 16 heures puis le mélange réactionnel est dilué avec H<sub>2</sub>O (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 H<sub>2</sub>O (30 ml)



et avec une solution saline (30 ml) puis séchées sur MgSO<sub>4</sub> 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. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 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). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 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.

10

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/Et<sub>3</sub>N (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 ; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N 5/1/0.5. PF = 47 - 48°C.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 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). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 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.

25

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 ; 1.2 éq) est additionné à une solution d'acide (2RS)-4-(diphényloxyphosphoryloxy)-2-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]butanoïque (850 mg ; 1.0 mmol ; 1 éq) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 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, 1 éq) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

30

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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acétone 5/2) permet de recueillir le pseudopeptide phosphorylé (620 mg ; 53%) sous forme d'un solide amorphe (R<sub>f</sub> = 0.49, dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N 10/1/0.5). <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 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, 3CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 63 MHz), δ en ppm: 173.11, 171.68, 170.52 (2 diast.), 169.94 (2 diast.), 150.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,C</sub>=7.2 Hz), 138.20 (2diast.), 129.58, 127.99, 127.49, 127.26, 125.24, 119.73 (t, <sup>3</sup>J<sub>P,C</sub>: 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.

## EXEMPLE 1.2.

15 **Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyle]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyle]amide (= OM-197-MC) (Figure 2)**

1.2.1. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyle]-D-aspartique, β-benzyle 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 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 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 3.5/1 (85 ml) contenant Et<sub>3</sub>N (3.7 ml) est alors 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 MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée.  
 30 Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution éther de pétrole/AcOEt 2/1 contenant 2% d'acide acétique) suivi d'une coévaporation au toluène permet de recueillir le β-benzyle ester de l'acide N-[(R)-3-dodécanoyle]-



oxytétradécanoylamino]-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.

5 1.2.2. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino] pentyl]amide  $\beta$ -benzyl ester (ASM-1)

A une solution du  $\beta$ -benzyl ester obtenu ci-dessus (363 mg ; 0.57 mmol) et de (2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxy-tétradécanoylamino]pentan-1-ol (Section 1.1.2) (250  
10 mg ; 0.57 mmol ; 1.0 éq) dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre (6 ml) à 0°C (bain eau-glace) et sous argon sont successivement ajoutés HOAt commercial (1-hydroxy-7-azabenzotriazole) (94 mg, 0.69 mmol, 1.2 éq) puis le N,N'-diisopropylcarbodiimide commercial (109  $\mu\text{l}$ , 0.69 mmol, 1.2 éq). Le mélange réactionnel est agité 1 heure à  
15 0°C puis une nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite lavé avec de l'eau, une solution HCl 1N, une solution de  $\text{NaHCO}_3$  saturée puis les phases sont séparées. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /acétone 3:1) permet de recueillir le produit de couplage (436 mg ; 72%) sous  
20 forme d'un solide cristallin blanc ( $R_f=0.27$  dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /acétone 5:1 ; révélateurs U.V. et phosphomolybdique). PF = 106-108°C;  $^{13}\text{C}$ -RMN (62.89 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  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.

25

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

Une solution du  $\beta$ -benzyl ester de l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-  
30 aspartique,  $\alpha$ -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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/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 (R<sub>f</sub>=0.30 dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 9/1 contenant 0.5% d'acide acétique; révélateur phosphomolybdique). PF = 135-137°C.

5 ES/MS: *m/z* 868.7 [M+H]<sup>+</sup>, 890.7 [M+Na]<sup>+</sup>, 868.7 [M+K]<sup>+</sup>, 912.7 [M-H+2Na]<sup>+</sup> (Figure 3).

1.2.4 Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-L-aspartique, α-N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide

10 La même séquence de réactions appliquée au H-L-Asp(OBn)-OH commercial (Fluka, Buchs, Suisse) conduit au produit épimère en série L-aspartique.

**EXEMPLE 1.3.**

15 ***Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-dihydroxyphosphoryloxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoyl-amino]pentyl]amide (= OM-197-MC-MP) (Figure 2)***

1.3.1. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-dibenzyloxyphosphoryloxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]

20 pentyl]amide β-benzyl ester

A une solution de l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino] pentyl]amide β-benzyl ester obtenu précédemment (300 mg ; 0.29 mmol) et de 1H-tétrazole (60 mg ; 0.86 mmol) dans du THF anhydre (12 ml) à température ambiante et sous argon est additionné  
 25 le dibenzyl-diéthyl phosphoramidite à 85% (231 μl ; 0.66 mmol). 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% ; 183 mg ; 1.06 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 ml) est additionnée. On observe la disparition des cristaux. Après 45 minutes d'agitation à température  
 30 ambiante, une solution de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> saturée 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 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> saturée (5x), une solution de



NaHCO<sub>3</sub> saturée (2x) et une solution de HCl 1M (1x). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone 5/1) permet de recueillir le phosphotriester (294 mg ; 79%) sous forme d'un solide blanc. (R<sub>f</sub>=0.27 dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone 5/1; 5 révélateur U.V. et phosphomolybdique); <sup>13</sup>C-RMN (62,89 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ en ppm :173.26 ; 171.37 ; 171.01 ; 170.60 ; 170.03 ; 138.22 ; 135.50 ; 135.40 ; 135.28 ; 128.40 ; 128.33 ; 128.16 ; 128.08 ; 127.94 ; 127.82 ; 127.76 ; 127.53 ; 127.41 ; 76.43 ; 71.03 ; 70.90 ; 69.28 ; 66.47 ; 49.09 ; 48.37 ; 41.62 ; 41.35 ; 41.24 ; 39.02 ; 38.88 ; 25.05 ; 24.94 ; 24.82 ; 22.48 ; 13.90.

10

1.3.2. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-dihydroxyphosphoryloxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl] amide (= OM-197-MC-MP)

Une solution du dibenzylphosphate préparé ci-dessus (249 mg ; 190 μmol) dans 15 EtOH de qualité HPLC (12 ml) est hydrogénée en présence de Pd sur charbon à 10% (30 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 4 heures. Le catalyseur est éliminé par filtration sur millipore. Le filtrat est évaporé à sec puis le résidu est séché à la pompe à palettes pour obtenir le phosphate libre brut (180 mg ; 100%). ES/MS: m/z 850.7 [M+H-P(O)(OH)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 948.5 20 [M+H]<sup>+</sup>, 970.5 [M+Na]<sup>+</sup> (Figure 4).

#### EXEMPLE 1.4.

##### *Détermination du degré d'épimérisation des intermédiaires de synthèse.*

25 La stéréochimie de centres porteurs de groupes acylamino est déterminée par la configuration des acides aminés de départ. Cependant, le couplage peptidique réalisé entre le dérivé de l'acide aspartique ou glutamique et l' amino alcool obtenu à partir de l'ornithine ou la lysine peut conduire, sous certaines conditions, à un phénomène d'épimérisation en C-alpha du partenaire acide de la réaction de 30 couplage. Afin de montrer de degré d'épimérisation de cette réaction, la méthode suivante a été appliquée pour les composés dérivant de l'acide aspartique.

L'échantillon (30 µg) est évaporé dans un microvial, puis resolubilisé dans 40 µl de HCl 6M. L'hydrolyse est poursuivie pendant 24 heures à 110°C sous argon. L'échantillon est ensuite évaporé à sec, puis redissout dans 100 ml de tampon tétraborate 0.1M, pH 9.2. Une dérivation pré-colonne est ensuite réalisée avec le

5 réactif OPA-IBLC (o-phthaldialdéhyde – N-isobutyryl-L-cystéine) dans les proportions suivantes:

5 µl d'une solution tampon tétraborate de sodium 0.1M, pH 9.2

2 µl d'une solution méthanolique 170 mM OPA, 260 mM IBLC

2 µl de la solution à analyser

10

Une séparation HPLC sur colonne Hypersil ODS (250 x 4.6 mm, 5 µm, Supelco) permet de quantifier les deux dérivés provenant des formes L- et D- de l'acide aspartique présent dans l'échantillon de départ (Brückner *et al.* 1995, J. Chromatogr. A 711, 201-215). Les conditions HPLC utilisées sont les suivantes:

15

Colonne: Hypersil ODS (250 x 4.6 mm, 5 µm, Supelco)

Phase mobile: A: 23 mM acétate de sodium, pH 5.9

B: méthanol – acétonitrile (12:1)

Injection: 5 µl

20 Débit: 1 ml/min

Elution: Gradient A:B : 96:4 à 80:20 en 25 minutes

Détection: UV : 338 nm

Dans ces conditions chromatographiques, des temps de rétention de 16.1 et 17.2

25 minutes sont observés pour les dérivés des acides L- et D-aspartique, respectivement.



## 2<sup>ème</sup> série d'exemples: Préparation des pseudodipeptides porteurs d'un bras auxiliaire fonctionnalisé

### EXEMPLE 2.1.

5 **3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxy-tétradécanoylamino]-décan-1,10-diol-1-dihydrogénophosphate 10-(6,7-dihydroxyheptanoate) (=OM-197-FV6) (Figure 5)**

2.1.1. 1-(Diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétra-  
décanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-  
 10 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 (Ex. 1.1)  
 (875 mg ; 0.74 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (25 ml), est ajouté l'acide 6-  
 hepténoïque (141 µl ; 1.04 mmol ; 1.4éq). La solution est refroidie à 0°C. Sont  
 15 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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la phase organique est lavée  
 successivement avec H<sub>2</sub>O, une solution de HCl 1N et H<sub>2</sub>O. La phase organique est  
 ensuite séchée sur MgSO<sub>4</sub>, puis évaporée à 40°C sous vide. Une purification par  
 20 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  
 1/1; révélateur acide phosphomolybdique). <sup>13</sup>C-RMN (62.89 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ en ppm:  
 25 173.30 ; 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)

A une solution contenant  $K_3Fe(CN)_6$  (373 mg ; 1.13 mmol ; 3 éq),  $K_2CO_3$  (157 mg ;  
5 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  $\mu$ l ; 4.75  $\mu$ mol ; 0.0125 éq). Le milieu réactionnel est  
vigoureusement agité pendant 16 heures à température ambiante (27°C). Du  
10  $Na_2S_2O_5$  (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  
sur  $MgSO_4$ , puis évaporées à 40°C sous vide. Le diol attendu brut est ainsi obtenu  
15 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-(diphényl-  
oxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-  
3-benzyloxytétradécanoylamino]-10-ol 6,7- dihydroxyheptanoate pur (198 mg ; 40%)  
sous forme d'un solide amorphe ( $R_f$ = 0.24 dans  $CH_2Cl_2$ /Acétone 5/2 ; révélateur  
20 acide phosphomolybdique).  $^{13}C$ -RMN (62.89 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  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 ; 28.51 ; 25.50 ; 25.07 ; 24.87 ; 24.77 ; 24.66 ; 22.54 ; 13.99. HPLC (210 nm) :  
25  $T_R$  = 32.535 min. ES/MS:  $m/z$  1343.0 ( $M+Na^+$ ) ; 1321.0 ( $M+H^+$ ) ; 1071.0 ( $M+H^+$   
monophényl phosphate).

2.1.3. 1-(Diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétra-  
décanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-10-ol  
30 (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. <sup>13</sup>C-RMN (62.89 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ en ppm : 173.15 ; 173.51 ; 172.82 ; 171.04 ; 170.49 ; 170.35 ;  
 5 150.05 ; 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<sub>R</sub> = 30.7 min. ES/MS: *m/z* 1253.0 [M+Na]<sup>+</sup> ; 1231.0 [M+H]<sup>+</sup>.

10

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)

15 A une suspension d'oxyde de platine PtO<sub>2</sub> (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.  
 20 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<sub>R</sub> = 23.6 min. ES/MS: *m/z* 1078.9 [M+H]<sup>+</sup>, 1100.8 [M+Na]<sup>+</sup>, 1116.8 [M+K]<sup>+</sup> (Figure 6).

25

**EXEMPLE 2.2.**

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

- 5 2.2.1. 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 NaIO<sub>4</sub> 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 periodique (Figure 7) atteste de la réaction attendue. Sur ce spectre, des adducts de sodium à *m/z* 1068.8 ([M+Na]<sup>+</sup>) et de potassium à *m/z* 1084.8 ([M+K]<sup>+</sup>) 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. Le produit peut être purifié par SPE sur support C18 avec une rendement de 90% (échelle 5 mg de diol).

20

**EXEMPLE 2.3.**

***Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide 5-O-(6, 7-dihydroxyheptanoate) (=OM-197-MC-FV5) (Figure 8)***

- 25 2.3.1. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide-β-benzyl ester, 5-O-(6-heptènoate)

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 (Section 1.2.2) (122 mg ; 0.116 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (5ml), est ajouté l'acide 6-heptènoïque (22 µl ; 0.160 mmol ; 1.4 éq). La solution est

30



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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la phase organique est lavée successivement avec H<sub>2</sub>O, HCl 1N (2x), NaHCO<sub>3</sub> (2x) et H<sub>2</sub>O (2x). L'ester hepténoïque attendu est ainsi obtenu pur (119 mg ; 89%) sous forme d'un solide blanc (R<sub>f</sub> = 0.62 dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acétone 5/1 ; révélateur acide phosphomolybdique). <sup>13</sup>C-RMN (62.89 MHz, CDCl<sub>3</sub>), 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<sub>R</sub> = 36.9 min. ES/MS: *m/z* 1159.0 [M+H]<sup>+</sup> ; 1176.0 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>. PF = 81.5 - 84°C. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +7.3 (CHCl<sub>3</sub>).

2.3.2. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α-N-  
 {(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 H<sub>2</sub>O/Acétone (5/3 ml) sont ajoutés l'oxide de N-méthylmorpholine (9 mg ; 0.076 mmol ; 1.5 éq), puis la solution d'OsO<sub>4</sub> dans le t-butanol à 2.5% (123 μl ; 0.012 mmol ; 0.23 éq) goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité pendant 24 heures à température ambiante. Du Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (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 MgSO<sub>4</sub> et concentrées. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acétone 5/2) permet de recueillir le diol attendu pur (35 mg ; 57%) sous forme d'un solide blanc (R<sub>f</sub>= 0.15 dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acétone 5/1 ; révélateur acide phosphomolybdique). <sup>13</sup>C-RMN (62.89 MHz, CDCl<sub>3</sub>), 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 ; 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<sub>R</sub> = 34.16 min. ES/MS: *m/z* 1193.0 [M+H]<sup>+</sup> ; 1212.0 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

2.3.3. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-  
 {(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl}amide 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  
 5 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,  $\alpha$ -N-  
 10 {(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.  $[\alpha]_D^{20} = +11.1$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 1:0.1). ES/MS:  $m/z$  1012.7 [M+H]<sup>+</sup> ; 1034.7  
 [M+Na]<sup>+</sup>, 1050.7 [M+K]<sup>+</sup> (Figure 9).

15 **EXEMPLE 2.4.**

***Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-  
 {(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl}amide 5-O-(6-  
 oxohexanoate) (=OM-197-MC-FV6) (Figure 8)***

2.4.1. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-  
 20 {(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl}amide 5-O-  
 (6-oxohexanoate) (=OM-197-MC-FV6)

1.98 ml NaIO<sub>4</sub> 0.1M (42.25 mg , 20 éq.) sont ajoutés à 10 mg (9.88  $\mu$ mol, 1 éq.) du  
 triol déprotégé préparé ci-dessus (Section 2.3.3) dans un mélange isopropanol-eau  
 (1:1). La solution est agitée pendant deux heures à température ambiante. La  
 25 réaction est stoppée par l'adjonction de 1-2 gouttes d'éthylène glycol. Après cette  
 étape d'oxydation périodique, un ion moléculaire [M+H]<sup>+</sup> à  $m/z$  980.6 est observé sur  
 le spectre ES/MS (Figure 10), attestant de la présence d'une fonction aldéhyde. Les  
 pics correspondants aux adducts de sodium à  $m/z$  1002.8 ([M+Na]<sup>+</sup>) et de potassium  
 à  $m/z$  1018.6 ([M+K]<sup>+</sup>) sont également visibles. La purification par SPE sur support  
 30 C18 permet de recueillir le produit OM-197-MC-FV6 avec un rendement de 90%.



**EXEMPLE 2.5.**

***Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide 5-O-(6-hydroxyhexanoate) (=OM-197-MC-FV7) (Figure 8)***

- 5 2.5.1. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide 5-O-(6-hydroxyhexanoate) (=OM-197-MC-FV7)

A une solution du dérivé 6-oxohexanoïque obtenu ci-dessus (4.5 mg, 0.0043 mmol) dans de l'isopropanol à 90% (20 ml) est ajoutée une solution (0.2 ml) de NaBH<sub>4</sub> dans du méthanol (1 mg/ml). Le mélange est agité pendant 3 min à 25°C, puis un excès d'acide acétique (0.2 ml) est ajouté. La purification par HPLC préparative sur colonne C18 permet de recueillir le produit OM-197-MC-FV7 (2.3 mg, 51%), en solution dans de l'isopropanol à 90%.

15 **EXEMPLE 2.6.**

***(3RS,9R)-3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogéné-phosphate 10-(6-aminohexanoate) (=OM-197-MP-AC-RS,R) (Figure 11)***

- 20 2.6.1. 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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (8 ml), est ajoutée 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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la phase organique est séparée et lavée successivement avec H<sub>2</sub>O, HCl 1N, H<sub>2</sub>O. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO<sub>4</sub>, puis évaporée à 40°C sous vide. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acétone 7/1.2

permet de recueillir l'ester pur (115 mg ; 41%) sous forme d'un solide amorphe ( $R_f = 0.77$  dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Acétone } 5/2$  ; révélateur acide phosphomolybdique).  $^{13}\text{C}$ -RMN (62.89 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  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  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ; 1174.0  $[\text{M}+\text{H}-(\text{PhO})_2\text{OPOH}]^+$ .

10 2.6.2. 1-(Diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétra-  
décanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-  
10-ol 10-(6-aminohexanoate)

Une solution du produit obtenu ci-dessus (115 mg ; 81  $\mu\text{mol}$ ) dans un mélange EtOH qualité HPLC (15 ml)/acide acétique glacial (0,4 ml) est hydrogénée en présence de  
 15 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  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ; 952.0  $[\text{M}+\text{H}-(\text{PhO})_2\text{OPOH}]^+$ .  
 20

2.6.3. 3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-  
hydroxytétradécanoylamino]-1,10-diol-1-dihydrogénophosphate 10-(6-  
aminohexanoate).(=OM-197-MP-AC)

25 A une solution d'oxyde de platine  $\text{PtO}_2$  (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  $\mu\text{mol}$ ) dans un mélange mélange EtOH qualité HPLC (5 ml)/HCl 1N (0.1 ml). La solution est hydrogénée à température ambiante, sous pression atmosphérique  
 30 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  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ; 1069.6  $(\text{M}+\text{Na}^+)$ , 949.6  $[\text{M}+\text{H}-(\text{HO})_2\text{OPOH}]^+$  (Figure 12).



## EXEMPLE 2.7.

**(3R,9R)-3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogène-phosphate 10-(6-aminohexanoate) (=OM-197-MP-AC-R,R) (Figure 13)**

2.7.1. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(2-tetrahydropyranyl)oxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide  $\beta$ -benzyl ester (ASM-1-O-THP)

A une solution du  $\beta$ -benzyl ester de l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide (1.5 g ; 1.43 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (30 ml) à température ambiante et sous argon sont ajoutés successivement le 3,4-Dihydro-2 H-pyran (DHP) (327  $\mu$ l, 3.58 mmol) puis le pyridinium *p*-toluenesulfonate (PPTS) (108 mg, 429  $\mu$ mol). Après 18 heures d'agitation à température ambiante, on ajoute de nouveau du 3,4-Dihydro-2 H-pyran (DHP) (130  $\mu$ l, 1.43 mmol). La solution est ensuite agitée 9 heures supplémentaires à température ambiante puis diluée avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, lavée avec une solution de NaHCO<sub>3</sub> à 5% puis H<sub>2</sub>O. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / Acétone 7/1 puis 6/1) permet de recueillir l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(2-tetrahydropyranyl)oxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide  $\beta$ -benzyl ester (1.45 g ; 90%) sous forme d'un solide cristallin blanc. (R<sub>f</sub>=0.57 dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / Acétone 5/1; révélateur U.V. et phosphomolybdique).

2.7.2. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(2-tetrahydropyranyl)oxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide

Une solution du composé préparé ci-dessus (250 mg ; 0.22 mmol) dans un mélange EtOH/EtOAc 1/1 (16 ml) contenant Et<sub>3</sub>N (0.4 ml) est hydrogénée en présence de 10% Pd sur charbon (10 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 2 heures. Le catalyseur est éliminé par filtration

et le filtrat évaporé à sec puis séché à la pompe à palettes pour donner l'acide sous forme de sel de triéthylammonium (250 mg).

5

2.7.3. 3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-10-(2-tetrahydropyranyl)oxy-décan-1-ol

A une solution de l'acide préparé ci-dessus (~250 mg) dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/THF anhydre 2/1 (3 ml) à 0°C et sous argon sont additionnés la *N*-méthylmorpholine (72 µl ; 0.66 mmol ; 3 éq) puis l'isobutyl chloroformate (86 µl ; 0.66 mmol ; 3 éq). On observe rapidement un précipité de chlorhydrate de *N*-méthylmorpholine. Suivi CCM (R<sub>f</sub>=0.90 dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ Acétone 2/1). Après 30 minutes d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est porté à 0°C puis une solution de NaBH<sub>4</sub> (33 mg ; 0.88 mmol ; 4 éq) dans H<sub>2</sub>O (1 ml) est rapidement additionnée. Dès la fin du dégagement gazeux (5 minutes), la solution est diluée avec H<sub>2</sub>O (1 ml) et du THF (1 ml) puis agitée 5 minutes à température ambiante. La solution est partiellement concentrée, puis diluée avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. Les phases sont ensuite séparées, la phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ Acétone 2/1) permet de recueillir l'alcool (138 mg ; 61% sur 2 étapes) sous forme d'un solide cristallin blanc (R<sub>f</sub>=0.33 dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ Acétone 3/1; révélateur U.V. et phosphomolybdique).

25

2.7.4. 3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-10-(2-tetrahydropyranyl)oxy-décan-1-ol dibenzyl phosphate

A une solution de l'alcool préparé ci-dessus (120 mg ; 0.12 mmol) et de 1*H*-tétrazole (25 mg ; 0.35 mmol ; 3 éq) dans du THF anhydre (5 ml) à température ambiante et sous argon est additionné le dibenzyl-diéthyl phosphoramidite à 85% (95 µl ; 0.27 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% ; 75 mg ; 0.43 mmol ; 3,7 éq) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 ml) est additionnée. On observe la disparition des cristaux. Après 45 minutes d'agitation à température ambiante, une solution de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> saturée (3 ml) est

30



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  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  saturée (5x), et avec une solution de  $\text{NaHCO}_3$  saturée (2x).

La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / acétone 4/1 puis 2/1) permet de recueillir le dibenzylphosphate (126 mg ; 84%) sous forme d'un solide amorphe. (Rf=0.53 dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / Acétone 3/1; révélateur U.V. et phosphomolybdique).

2.7.5. 3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-(dibenzyl phosphate)

A une solution de HCl 1% dans du méthanol (25 ml) à 0°C est ajoutée une solution du composé préparé ci-dessus (700 mg, 0.54 mmol) dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.5 ml). Après 45 minutes d'agitation à 0°C, le milieu réactionnel est neutralisé avec une solution de  $\text{NaHCO}_3$  à 5%, dilué avec du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  puis la phase organique est séparée. La phase aqueuse résultante est ensuite extraite avec du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x) puis les phases organiques regroupées. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et évaporée pour donner l'alcool brut (640 mg ; 98%). (Rf=0.50 dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / Acétone 3/1; révélateur U.V. et phosphomolybdique).

2.7.6. 3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-(dibenzyl phosphate) 10-(6-benzyloxycarbonylamino)hexanoate

A une solution du composé préparé ci-dessus (640 mg, 0.53 mmol) et d'acide 6-(benzyloxycarbonylamino)hexanoïque (423 mg, 1.60 mmol) dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sec (25 ml) à 0°C et sous argon sont successivement ajoutés le chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide commercial (306 mg, 1.60 mmol) et la 4-diméthylaminopyridine (20 mg, 160  $\mu\text{mol}$ ). Le mélange réactionnel est ensuite agité 30 minutes à 0°C puis une nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite lavé avec de l'eau puis une solution HCl 1N puis les phases séparées. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /acétone 4/1 puis 2/1) permet de recueillir le produit de couplage (537 mg ; 71%).  $^{13}\text{C}$ -RMN (62.89 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  en ppm: 173.18; 171.16; 170.38; 169.60; 156.30; 138.23; 136.50; 135.38; 135.28;

128.42; 128.26; 128.17; 127.79; 127.74; 127.44; 76.48; 71.15; 70.84; 69.47; 69.39; 69.31; 66.25; 65.62; 64.43; 64.37; 49.78; 47.76; 41.41; 41.34; 40.57; 38.97; 34.22; 34.16; 33.96; 33.57; 32.95; 31.70; 29.43; 29.15; 28.95; 28.32; 25.87; 25.46; 25.02; 24.80; 24.18; 22.49; 13.94.

5

2.7.7. 3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-(6-aminohexanoate) (=OM-197-MP-AC-R,R) (Figure 13)

Une solution du composé préparé ci-dessus (500 mg, 0.35 mmol) dans un mélange  
 10 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/éthanol 5/2 (70 ml) contenant de l'acide acétique (10 ml) est hydrogénée en  
 présence de Pd sur charbon à 10% à température ambiante et sous pression  
 atmosphérique d'hydrogène pendant 12 à 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 donner le 3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-  
 15 hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-(6-  
 aminohexanoate) (368 mg, rendement quantitatif). ES/MS: *m/z* 1047.9 [M+H]<sup>+</sup>;  
 1069.8 (M+Na<sup>+</sup>) (Figure 14).

#### EXEMPLE 2.8.

20 ***(3S,9R)-3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-  
 hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogéo-phosphate 10-(6-  
 aminohexanoate) (=OM-197-MP-AC-S,R)***

Appliquée au  $\beta$ -benzyl ester de l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-L-  
 aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide  
 25 (Section 1.2.4), la même séquence de réaction conduit au produit de l'exemple 2.8.



## EXEMPLE 2.9.

**3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogéo-phosphate 10-(6-hydroxyhexanoate) (=OM-197-FV8) (Figure 15)**

5 2.9.1. (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 (Section 1.1.2) (2.05 g ; 3.60 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (40 ml) à température ambiante et sous argon sont ajoutés successivement  
 10 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/EtOAc 2/1) permet de recueillir le dérivé O-benzyloxyméthyl (2.28 g ; 92%) sous  
 15 forme d'un solide cristallin blanc. (R<sub>f</sub>=0.70 dans éther de pétrole/EtOAc 1/3; révélateur U.V. et acide phosphomolybdique). PF= 97-100°C. Une solution de ce produit (2.00 g ; 2.90 mmol) dans EtOH de qualité HPLC (220 ml) contenant Et<sub>3</sub>N (4 ml) est hydrogénée en présence de 20% Pd(OH)<sub>2</sub> sur charbon (200 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 3  
 20 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 d'un solide amorphe. [α]<sub>D</sub> -1° (C=1.20 ; CHCl<sub>3</sub>) ; <sup>1</sup>H-RMN (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ en ppm : 7.45-7.21 (m, 10H, Ar), 6.52 (d, 1H, NH), 4.80-4.45 (m, 6H, 2 x CH<sub>2</sub>-ph, O-CH<sub>2</sub>-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),  
 25 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', NH<sub>2</sub>), 1.40-1.20 (m, 18H, 9 x CH<sub>2</sub>), 0.88 (t, 3H, CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C-RMN (62.89 MHz, CDCl<sub>3</sub>), 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.

2.9.2. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-L-aspartique,  $\alpha$ -N-  
{(4R)- 5-(benzyloxymethoxy)-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-  
pentyl}amide  $\beta$ -benzyl ester

L'amine préparée comme décrit ci-dessus est couplée avec le  $\beta$ -benzyl ester de  
5 l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-L-aspartique (préparé à partir du  
 $\beta$ -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 ( $[M+H]^+$ ).

10

2.9.3 (3S, 9R)-3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-  
3-benzyloxytétradécanoylamino]-décane-1,10-diol 1-dibenzyolphosphate

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 Et<sub>3</sub>N (1.5 ml) est hydrogénée en  
15 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/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1/1 (50 ml) et agité pendant 10 minutes  
à température ambiante avec une résine Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>) (3 ml). La résine est  
20 éliminée par filtration et le filtrat évaporé à sec pour donner l'acide libre (956 mg ;  
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  $\mu$ l ;  
0.79 mmol ; 1 éq) puis l'isobutyl chloroformate (103  $\mu$ l ; 0.79 mmol ; 1 éq). On  
25 observe rapidement un précipité de chlorhydrate de *N*-méthylmorpholine. Après 30  
minutes d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est porté à 0°C  
puis une solution de NaBH<sub>4</sub> (60 mg ; 1.58 mmol ; 2 éq) dans H<sub>2</sub>O (2 ml) est  
rapidement additionnée. Dès la fin du dégagement gazeux (5 minutes), la solution  
est diluée avec H<sub>2</sub>O (2 ml) et THF (2 ml) puis agitée 5 minutes à température  
30 ambiante. La solution est concentrée, diluée avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O, neutralisée  
avec une solution de HCl 1M puis les phases séparées. La phase organique est  
séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash



sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ 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 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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 ml) est additionnée. On observe la disparition des cristaux. Après 45 minutes d'agitation à température ambiante, une solution de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 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 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> saturée (5x), une solution de NaHCO<sub>3</sub> saturée (2x) et une solution de HCl 1M (1x). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ 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 (3*S*, 9*R*)-3-[(*R*)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(*R*)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-décane-1,10-diol 1-dibenzylphosphate.

2.9.4 (3*S*,9*R*)-[(*R*)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(*R*)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décane-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-(6,7-dihydroxyheptanoate)

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 2.3.1). Cet ester hepténoïque est ensuite soumis à une réaction d'hydroxylation en présence de tétroxyde d'osmium (catalytique) et d'oxyde de *N*-méthylmorpholine (voir section 2.3.2), ce qui fournit le diol correspondant (ester 6,7-dihydroxyheptanoïque). Ce produit est déprotégé par hydrogénolyse dans l'éthanol sous pression atmosphérique d'hydrogène en présence de charbon palladié (voir section 2.3.3).

2.9.5. (3S,9R)-3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-(6-oxohexanoate)

5 Le diol déprotégé obtenu ci-dessus est soumis à une réaction d'oxydation periodique dans un mélange isopropanol-eau (mode opératoire, voir section 2.2.1).

2.9.6 (3S,9R)-3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-(6-hydroxyhexanoate) (=OM-197-FV8)

10 A une solution du dérivé 6-oxohexanoïque obtenu ci-dessus (4.5 mg, 0.0043 mmol) dans de l'isopropanol à 90% (20 ml) est ajouté une solution (0.2 ml) de NaBH<sub>4</sub> dans du méthanol (1 mg/ml). Le mélange est agité pendant 3 min à 25°C, puis un excès d'acide acétique (0.2 ml) est ajouté. La purification par HPLC préparative sur  
15 colonne C18 permet de recueillir le produit OM-197-FV8 (2mg, 44%), en solution dans de l'isopropanol à 90%. ES/MS: *m/z* 1048.5 [M+H]<sup>+</sup>; 950.5 [M+H-(HO)<sub>2</sub>OPOH]<sup>+</sup> (Figure 16).

#### EXEMPLE 2.10.

20 ***2-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-(dihydroxyphosphoryloxy)butanoate de {2-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-5-(6-oxohexyl)amino}pentyle (=OM-144-FP9) (Figure 17)***

2.10.1. Trifluorométhanesulfonate de hept-6-ényle

25 L'anhydride triflique Tf<sub>2</sub>O ((CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>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<sub>3</sub>N (627 µl ; 4.51 mmol) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (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<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et lavé successivement avec H<sub>2</sub>O, avec une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub>, une solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique  
30 ainsi obtenue est séchée sur MgSO<sub>4</sub> 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



5 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/éther de pétrole, 1/2.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz);  $\delta$  en ppm: 5.7 ; 5.0 ; 4.45 ; 2.0 ; 1.8 ; 1.4.  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 62.89 MHz);  $\delta$  en ppm : 138.21 ; 114.95 ; 77.68 ; 33.40 ; 29.13 ; 28.10 ; 24.53.

2.10.2. (2R)-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-5-(hept-6-ényl)amino-pentan-1-ol

10 Une solution du triflate fraîchement préparé ci-dessus (956 mg, 3.88 mmol), dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) est additionnée goutte à goutte à une solution de (2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol (Section 1.1.2) (1.69 g ; 3.88 mmol) dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) et le mélange est agité 4 heures à température ambiante sous argon. Après dilution au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , le milieu réactionnel est lavé avec une solution aqueuse saturée en  $\text{NaHCO}_3$  puis avec  $\text{H}_2\text{O}$ . La phase organique ainsi obtenue est  
15 séchée sur  $\text{MgSO}_4$  et concentrée sous vide. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  15/1) permet de recueillir l'amine secondaire attendue (862 mg ; 43%). Rf : 0,3 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  8/1). ES/MS :  $m/z$  532.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz);  $\delta$  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  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 62.89 MHz);  $\delta$  en  
20 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  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz);  $\delta$  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  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 62.89 MHz);  $\delta$  en ppm : 171.77 ; 138.68 ; 138.14 ; 128.23 ;  
25 127.72 ; 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).

30 2.10.3. 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 ; 1éq) et d'acide 4-(diphényloxyphosphoryloxy)-2-[(R)3-dodécanoyloxytétradécanoyl-

amino]butanoïque (Section 1.1.1) (278 mg ; 0.368 mmol ; 1.2 éq) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (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 5 0°C puis 90 heures à température ambiante. La solution est alors lavée avec H<sub>2</sub>O et la phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporée sous vide à 40°C. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15/1) permet de recueillir le produit de O-acylation (126 mg ; 32%).

10 2.10.4. 2-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-(diphényloxyphosphoryl-  
oxy)butanoate de {2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]-5-(6,7-  
dihydroxyheptyl)amino}pentyle

Une solution fraîchement préparée d'OsO<sub>4</sub> 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 15 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 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> et enfin dilué au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, lavé successivement avec H<sub>2</sub>O, avec une solution aqueuse HCl 1N et à nouveau avec H<sub>2</sub>O. La phase organique résultante est séchée 20 sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée, évaporée et le résidu obtenu est soumis à une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15/1 à 10/1) qui permet de recueillir le diol attendu (27 mg ; 38%). HPLC (210 nm) : T<sub>R</sub> = 37.25 min. ES/MS : *m/z* 1307.0 [M+H]<sup>+</sup>.

25 2.10.5. 2-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-(dihydroxy-phosphoryl-  
oxy)butanoate de {2-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-5-(6,7-dihydroxy-  
heptyl)amino}pentyle (=OM-144-FP8)

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 30 mélange réactionnel est agité 4 heures sous H<sub>2</sub> (pression atmosphérique) à température ambiante. Le catalyseur est éliminé par filtration sur filtre millipores et le 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 :

Le catalyseur ( $PtO_2$ ) (25 mg ; 3.8 eq) en suspension dans EtOH qualité HPLC (0.5  
5 ml) est préactivé sous  $H_2$  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  $H_2$  à température ambiante. Le  
catalyseur est filtré sur filtre millipores et le filtrat évaporé pour conduire, sans autre  
10 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  $[M+H]^+$ ,  
1086.8  $[M+Na]^+$ , 1108.8  $[M-H+2Na]^+$  (Figure 18).

2.10.6. 2-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-(dihydroxy-phosphoryloxy)  
15 butanoate de {2-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-5-(6-oxohexyl)amino}  
pentyle (=OM-144-FP9)

1.87 ml  $NaIO_4$  0.1M (40.17 mg , 20 éq.) sont ajoutés à 10 mg (9.39  $\mu$ mol, 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  
20 stoppée par l'adjonction de 1-2 gouttes d'éthylène glycol.  $T_R = 30.0$  et  $31.5$  min  
(observation de deux diastéréoisomères). ES/MS :  $m/z$  1032.8  $[M+H]^+$ , 1054.8  
 $[M+Na]^+$ .

25 **EXEMPLE 2.11.**

***(2R, 8R)-2-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-  
hydroxytétradécanoylamino]-nonane-1,9-diol 1-O-carboxy-méthyl éther 9-O-(6-  
oxohexanoate) (=OM-112-FV7) (Figure 19)***

La D-sérine est protégée sous forme de dérivé N-(p-methoxybenzyloxycarbonyl)  
30 [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  
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-  
 5 aza-8-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]nonane-1,9-diol 1-O-benzyloxycarbonyl-méthyl 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 tétroxyde d'osmium (catalytique, en présence de N-méthylmorpholine N-oxyde), puis le diol déprotégé par hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon dans  
 10 l'éthanol. Le produit OM-112-FV-7 est obtenu par traitement avec du periodate de sodium dans un mélange isopropanol-eau. C<sub>65</sub>H<sub>103</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>. MM: 1010.45.

#### EXEMPLE 2.12.

*(2S,8R)-1-(Carboxyméthyl)thio-2-[(R)-3-tétradécanoyloxytétra-décanoylamino]-*  
 15 *3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-nonan-9-ol 9-O-(7-amino-heptanoate) (=OM-212-AH1) (Figure 20)*

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-  
 20 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-  
 25 methoxybenzyloxy-carbonylamino)heptanoïque. Les deux groupes p-méthoxybenzyle sont ensuite éliminés par traitement de l'ester avec de l'acide trifluoroacétique aqueux. C<sub>59</sub>H<sub>112</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>S. MM :1069.64.



**EXEMPLE 2.13.**

***(2R, 8R)-2-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-nonane-1,9-diol 1-O-(2,2-di-carboxyéthyl) éther 9-O-(6-oxohexanoate) (=OM-312-FV7) (Figure 21)***

5 Le dérivé N-(p-methoxybenzyloxycarbonyl) 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-dodéca-noyloxytétradécanoïque en présence de triéthylamine. Le dérivé de la serine ainsi obtenu est couplé avec l'amine (2R)-5-  
10 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)éthyl] 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  
15 tétroxyde 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<sub>58</sub>H<sub>105</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub>. MM: 1068.49.

20

**EXEMPLE 2.14.**

***3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-1,10-diol-1-dihydrogénophosphate 10-(6-bromoacetamidohexanoate) (=OM-412-BA7) (Figure 22)***

25 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<sub>57</sub>H<sub>108</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>13</sub>P. MM: 1168.4.

30

**EXEMPLE 2.15.**

***(3RS, 9R)-3-[(R)-3-Hydroxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-décane-1,10-diol 1-dihydrogénéophosphate 10-O-(6-oxohexanoate) (OM-512-FV7) (Figure 23)***

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 le (2R)-5-amino-2-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]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 tétroxyde d'osmium ; le groupe benzyle est ensuite éliminé par hydrogénolyse sur charbon palladié et le phosphate libéré par hydrogénolyse sur noir de platine. La fonction diol est soumise à une réaction d'oxydation périodique pour générer le dérivé 6-oxohexanoyle OM-512-FV7.

$C_{55}H_{104}N_3O_{13}P$ . MM: 1046.42.

**EXEMPLE 2.16.**

***Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide (= OM-197-MC-AC) (Figure 24)***

2.16.1. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-[6-(benzyloxycarbonylamino)hexanoyloxy]-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide  $\beta$ -benzyl ester

A une solution d'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino] pentyl]amide  $\beta$ -benzyl ester (400 mg, 0.38 mmol) et d'acide 6-(benzyloxycarbonylamino)hexanoïque (220 mg,



0.83 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sec (15 ml) à 0°C et sous argon sont successivement ajoutés le chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide commercial (162 mg, 0.85 mmol) et la 4-diméthylaminopyridine (12 mg, 98 μmol). Le mélange réactionnel est ensuite agité 30 minutes à 0°C puis une nuit à température  
5 ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite lavé avec de l'eau puis une solution HCl 1N puis les phases séparées. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone 9/1 puis 4/1) permet de recueillir le produit de couplage (395 mg ; 81%) sous forme d'un solide blanc. <sup>13</sup>C-RMN (62.89 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ en ppm 173.46 ;  
10 173.29 ; 171.83 ; 171.14 ; 170.12 ; 156.38 ; 138.19 ; 136.60 ; 133.30 ; 128.51 ; 128.42 ; 128.31 ; 127.99 ; 127.70 ; 127.58 ; 119.97 ; 76.49 ; 71.23 ; 71.06 ; 66.73 ; 66.47 ; 49.21 ; 47.83 ; 41.42 ; 40.73 ; 39.14 ; 35.46 ; 34.38 ; 33.86 ; 33.70 ; 31.84 ; 29.57 ; 29.46 ; 29.28 ; 29.10 ; 26.01 ; 25.54 ; 25.17 ; 25.08 ; 24.94 ; 24.31 ; 22.61 ; 14.05.

15

2.16.2. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide

Une solution du composé préparé ci-dessus (340 mg, 0.26 mmol) dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/méthanol 5/1 (24 ml) contenant de l'acide acétique (2 ml) est hydrogénée en  
20 présence de Pd sur charbon à 10% (40 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 12 à 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 donner l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique, α-  
-N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide  
25 (238 mg, rendement quantitatif). C<sub>55</sub>H<sub>104</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>. ES/MS : m/z 981.9 ([M+H]<sup>+</sup>) (Figure 25).

**EXEMPLE 2.17.**

**Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-succinylamidohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide (= OM-197-MC-AC-Succ) (Figure 24)**

A une solution du produit de l'exemple 2.16 (Section 2.16.2) (50 mg; 0.051 mmol) dans la pyridine (3 ml) sont ajoutés successivement l'anhydride succinique (11 mg, 0.11 mmol) et la 4-N,N-diméthylaminopyridine (7 mg; 0.57 mmol). Après 6h d'agitation à 50°C sous Ar, du méthanol (2 ml) est ajouté et le milieu réactionnel est encore agité 15 min à temp. ambiante. Le solvant est évaporé et le produit purifié par chromatographie flash sur gel de silice (éluant: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 7:1 puis 5:1); le produit est obtenu sous la forme d'un solide blanc (42 mg; 74%). C<sub>59</sub>H<sub>108</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub> ES/MS: m/z 1082 ([M+H]<sup>+</sup>). Rf = 0.1 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:1).

**EXEMPLE 2.18.**

**Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-glycinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide (= OM-197-MC-Gly) (Figure 24)**

2.18.1 Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-benzyloxycarbonylaminoacétoxy]-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide  $\beta$ -benzyl ester

A une solution d'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino] pentyl]amide  $\beta$ -benzyl ester (300 mg, 0.29 mmol) et de N-benzyloxycarbonylglycine commerciale (101 mg, 0.49 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sec (10 ml) à 0°C et sous argon sont successivement ajoutés le chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide commercial (93 mg, 0.48 mmol) et la 4-diméthylaminopyridine (6 mg, 49  $\mu$ mol). Le mélange réactionnel est ensuite agité 30 minutes à 0°C puis une nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite lavé avec de l'eau puis une solution HCl 1N puis les phases séparées. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone 8/1 puis 6/1) permet de recueillir le produit de couplage (313 mg ; 88%) sous forme d'un solide blanc. <sup>13</sup>C-RMN (62.89 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  en ppm 173.71 ; 173.49 ; 171.80 ; 171.68 ; 171.21 ; 170.21 ; 170.06 ; 169.94 ; 169.84 ; 156.41 ; 138.18 ; 136.16 ;



135.26 ; 128.46 ; 128.40 ; 128.33 ; 128.26 ; 128.04 ; 127.93 ; 127.65 ; 127.55 ;  
 76.49 ; 71.14 ; 71.07 ; 70.93 ; 66.90 ; 66.67 ; 66.38 ; 66.26 ; 49.21 ; 49.03 ; 47.72 ;  
 47.66 ; 42.58 ; 41.83 ; 41.68 ; 41.32 ; 39.02 ; 35.58 ; 35.39 ; 34.34 ; 33.84 ; 31.80 ;  
 29.52 ; 29.24 ; 29.06 ; 28.31 ; 28.13 ; 25.34 ; 25.12 ; 25.03 ; 24.89 ; 22.57 ; 14.01.

5

2.18.2. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-glycinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide  
 (= OM-197-MC-Gly) (Figure 24)

Une solution du composé préparé ci-dessus (268 mg, 0.22 mmol) dans un mélange  
 10 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/éthanol 5/1 (12 ml) contenant de l'acide acétique (2 ml) est hydrogénée en  
 présence de Pd sur charbon à 10% (30 mg) à température ambiante et sous  
 pression atmosphérique d'hydrogène pendant 12 à 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 donner l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$   
 15 -N-[(4R)-5-glycinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide (200 mg,  
 rendement quantitatif). C<sub>51</sub>H<sub>96</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>. ES/MS :  $m/z$  925.7 ([M+H]<sup>+</sup>), 947.8 ([M+Na]<sup>+</sup>).  
 (Figure 26).

## 20 EXEMPLE 2.19.

***Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-succinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide***  
 (= OM-197-MC-Succ) (Figure 27)

2.19.1. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-succinyloxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide  $\beta$ -benzyl  
 25 ester

A une solution d'anhydride succinique (25 mg, 0.25 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sec (2  
 ml) en présence de Et<sub>3</sub>N (40  $\mu$ l, 0.29 mmol) à 0°C est additionnée une solution de  
 l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-  
 30 (R)-3-benzyloxytétradécanoylamino] pentyl]amide  $\beta$ -benzyl ester (Section 1.2.2)  
 (150 mg, 0.14 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sec (5 ml). Le milieu réactionnel est agité 10

minutes à 0°C puis une nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite dilué avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, lavé avec une solution de HCl 1N puis les phases séparées. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acétone = 9/1 contenant 2% d'acide acétique) permet de recueillir l'acide (148 mg, 90%) sous forme d'un solide blanc ; <sup>13</sup>C-RMN (62.89 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ en ppm 175.03; 173.55; 173.35; 171.92; 171.72; 171.36; 170.97; 170.60; 170.46; 170.41; 138.05; 135.24; 128.85; 128.76; 128.41; 128.27; 128.20; 128.03; 127.59; 76.48; 71.31; 70.77; 66.67; 65.08; 49.20; 48.11; 41.48; 41.31; 39.02; 35.80; 34.26; 34.13; 33.84; 31.77; 29.50; 29.21; 29.03; 25.05; 24.99; 24.83; 22.54; 13.98.

2.19.2. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-succinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide (= OM-197-MC-Succ) (Figure 27)

15 Une solution du composé obtenu ci-dessus (124 mg, 0.11 mmol) est dissous à chaud dans de l'EtOH (qualité HPLC) (12 ml) contenant de l'acide acétique (1 ml) puis hydrogénée en présence de 10% Pd sur charbon (15 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 10 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 di-acide (102 mg ; 97%). C<sub>53</sub>H<sub>97</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>. ES/MS : m/z 968.6 ([M+H]<sup>+</sup>), 990.7 ([M+Na]<sup>+</sup>). (Figure 28).

**EXEMPLE 2.20.**

25 **Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide β-N-(3-aminopropyl)amide (= OM-197-AP) (Figure 29)**

2.20.1 Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide

30 Une solution du β-benzyl ester de l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxy-tétradécanoylamino]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétra-



decanoylamino] pentyl}amide (Section 1.2.2) (2.53 g ; 2.4 mmol) dans un mélange EtOH/EtOAc 1/1 (150 ml) contenant Et<sub>3</sub>N (4 ml) est hydrogénée en présence de 10% Pd sur charbon (120 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 2 heures. 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/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1/1 (100 ml) et agité pendant 10 minutes à température ambiante avec une résine Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>) (5 ml). La résine est éliminée par filtration et le filtrat évaporé à sec pour donner l'acide libre (2.25 g ; 97%) sous forme d'un solide cristallin blanc. (Rf=0,45 dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 9/1 contenant 1% d'acide acétique; révélateur U.V. et phosphomolybdique). PF = 115-117°C.

2.20.2 Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl}amide  $\beta$ -N-(3-benzyloxycarbonylaminopropyl)amide

Une solution de IIDQ (2-isobutoxy-1-isobutoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoléine) (98 mg, 0.32 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (3 ml) est additionné à une solution du composé préparé ci-dessus (250 mg, 0.26 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (15 ml) à 0°C et sous argon. Le mélange réactionnel est agité 15 minutes à 0°C puis une solution de chlorhydrate de 3-benzyloxycarbonylamino-propylamine commercial (70 mg, 0.29 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (7 ml) contenant de la triéthylamine (40  $\mu$ l, 0.29 mmol) est additionnée. Après 18 heures d'agitation, la solution est évaporée à sec. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20/1) permet de recueillir le produit de couplage (217 mg ; 78%) sous forme d'un solide blanc.

2.20.3 Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl}amide  $\beta$ -N-(3-aminopropyl)amide (= OM-197-AP)

Une solution du composé préparé ci-dessus (50 mg, 44  $\mu$ mol) dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Isopropanol 1/1 (8 ml) contenant de l'acide acétique (1 ml) est hydrogénée en présence de Pd sur charbon à 10% (10 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 6 à 8 heures. Le catalyseur est

éliminé par filtration. Le filtrat est évaporé à sec puis le résidu est séché à la pompe à palettes pour donner l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide  $\beta$ -N-(3-aminopropyl)amide (32 mg, 80%). C<sub>52</sub>H<sub>101</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>. ES/MS : m/z 924.8 ([M+H]<sup>+</sup>), 1848.8 ([2M+H]<sup>+</sup>). (Figure 30).

### EXEMPLE 2.21.

**Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1-carboxy-5-aminopentyl]amide (= OM-197-Lys) (Figure 31)**

2.21.1 Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1-benzyloxycarbonyl-5-benzyloxycarbonylaminopentyl]amide

Une solution de IIDQ (2-isobutoxy-1-isobutoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoléine) (114 mg, 0.38 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (5 ml) est additionné à une solution de l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide (Section 2.20.1) (300 mg, 0.31 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (20 ml) à température ambiante et sous argon. Le mélange réactionnel est agité 15 minutes à température ambiante puis une solution de chlorhydrate de  $\epsilon$ -N-benzyloxycarbonyl-L-lysine benzyl ester commercial (140 mg, 0.34 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (5 ml) contenant de la triéthylamine (48  $\mu$ l, 0.34 mmol) est additionnée. Après 18 heures d'agitation, la solution est évaporée à sec. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 30/1 puis 20/1) permet de recueillir le produit de couplage (317 mg, 77%) sous forme d'un solide blanc. <sup>13</sup>C-RMN (62,89 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  en ppm : 173.68; 172.35; 171.92; 170.74; 170.62; 170.54; 156.75; 156.52; 138.31; 136.54; 135.12; 128.54; 128.40; 128.28; 128.21; 127.96; 127.577; 127.59; 76.67; 71.40; 71.18; 67.20; 67.09; 66.48; 64.67; 52.30; 51.19; 41.64; 40.34; 39.24; 37.58 ; 34.40; 34.10; 31.83; 29.58; 29.27; 29.09; 25.16; 25.11; 24.93; 22.60; 14.04.



2.21.2 Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1-carboxy-5-aminopentyl]amide (= OM-197-Lys)

Une solution du composé préparé ci-dessus (93 mg, 71  $\mu$ mol) dans un mélange  
 5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/éthanol 1/1 (20 ml) contenant de l'acide acétique (0.5 ml) est hydrogénée en  
 présence de Pd sur charbon à 10% (17 mg) à température ambiante et sous  
 pression atmosphérique d'hydrogène pendant 12 à 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 donner l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$   
 10 -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1-  
 carboxy-5-aminopentyl]amide (71 mg, rendement quantitatif). C<sub>55</sub>H<sub>105</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>. ES/MS :  
 m/z 996.9 ([M+H]<sup>+</sup>), 1018.9 ([M+Na]<sup>+</sup>). (Figure 32).

## 15 EXEMPLE 2.22.

***Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1-carboxy-5-aminopentyl]amide (= OM-197-Lys-AC) (Figure 31)***

2.22.1 Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-  
 20 benzyloxycarbonylaminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoyl  
 amino]pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1-benzyloxycarbonyl-5-benzyloxycarbonyl-  
 aminopentyl]amide

A une solution d'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-  
 {(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1-  
 25 benzyloxycarbonyl-5-benzyloxycarbonylamino]pentyl]amide (Section 2.21.1) (317 mg,  
 0.24 mmol) et d'acide 6-(benzyloxycarbonylamino)hexanoïque (128 mg, 0.48 mmol)  
 dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sec (15 ml) à 0°C et sous argon sont successivement ajoutés le  
 chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide commercial (93 mg,  
 0.48 mmol) et la 4-diméthylaminopyridine (12 mg, 98  $\mu$ mol). Le mélange réactionnel  
 30 est ensuite agité 30 minutes à 0°C puis une nuit à température ambiante. Le milieu  
 réactionnel est ensuite lavé avec de l'eau puis une solution HCl 1N puis les phases  
 séparées. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Une

purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone 5/1) permet de recueillir le produit de couplage (266 mg ; 71%) sous forme d'un solide blanc.

5 2.22.2 Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide - N-[(1S)-1-carboxy-5-aminopentyl]amide (= OM-197-Lys-AC)

Une solution du composé préparé ci-dessus (236 mg, 151  $\mu$ mol) dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/isopropanol 1/1 (20 ml) contenant de l'acide acétique (1 ml) est hydrogénée  
 10 en présence de Pd sur charbon à 10% (100 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 12 à 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 donner l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide -  
 15 N-[(1S)-1-carboxy-5-aminopentyl]amide (140 mg, 83%). C<sub>61</sub>H<sub>116</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>. ES/MS : *m/z* 555.5 ([M+H]<sup>+2</sup>), 1110.0 ([M+H]<sup>+</sup>) (Figure 33).

**EXEMPLE 2.23.**

20 ***Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1,2-dicarboxy-ethyl]amide (= OM-197-Asp) (Figure 34)***

2.23.1 Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-  
 25 1,2-bis(benzyloxycarbonyl)ethyl]amide

Une solution de IIDQ (2-isobutoxy-1-isobutoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoléine) (96 mg, 0.32 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (5 ml) est additionné à une solution d'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide (Section 2.20.1) (252 mg, 0.26 mmol)  
 30 dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (20 ml) à température ambiante et sous argon. Le mélange réactionnel est agité 15 minutes à température ambiante puis une solution du sel de paratoluènesulfonate de l'acide L-aspartique dibenzyl ester commercial (141 mg,



0.29 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (5 ml) contenant de la triéthylamine (40 µl, 0.29 mmol) est additionnée. Après 18 heures d'agitation, la solution est évaporée à sec. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20/1) permet de recueillir le produit de couplage (260 mg ; 78%). <sup>13</sup>C-RMN (62,89 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ en ppm : 173.68 ; 171.92 ; 171.17 ; 170.60 ; 170.46 ; 170.37 ; 170.18 ; 170.06 ; 138.31 ; 138.19 ; 135.20 ; 135.12 ; 134.87 ; 128.48 ; 128.26 ; 128.18 ; 127.75 ; 127.63 ; 127.56 ; 76.66 ; 71.40 ; 71.19 ; 70.98 ; 68.79 ; 67.59 ; 66.85 ; 65.14 ; 64.73 ; 51.25 ; 50.17 ; 48.78 ; 48.67 ; 41.70 ; 39.37 ; 39.21 ; 37.50 ; 35.94 ; 34.48 ; 34.38 ; 34.10 ; 31.81 ; 29.54 ; 29.25 ; 29.08 ; 27.93 ; 25.56 ; 25.14 ; 25.09 ; 24.91 ; 22.58 ; 14.02.

2.23.2 Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide β-N-[(1S)-1,2-dicarboxyethyl]amide (= OM-197-Asp)

Une solution du composé préparé ci-dessus (260 mg, 207 µmol) dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/isopropanol 1/1 (20 ml) est hydrogénée en présence de Pd sur charbon à 10% (50 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 donner le diacide (108 mg, 88%). C<sub>53</sub>H<sub>98</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>. ES/MS : m/z 983.7 ([M+H]<sup>+</sup>), 1005.8 ([M+Na]<sup>+</sup>). (Figure 35).

**EXEMPLE 2.24.**

***Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide β-N-[(1S)-1,2-dicarboxyethyl]amide (= OM-197-Asp-AC) (Figure 34)***

2.24.1. Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-(6-benzyloxycarbonylamino)hexanoyloxy)-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide β-N-[(1S)-1,2-bis(benzyloxycarbonyl)ethyl]amide

A une solution d'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide β-N-[(1S)-1,2-

bis(benzyloxycarbonyl)ethyl]amide (Section 2.23.1) (158 mg, 0.13 mmol) et d'acide 6-(benzyloxycarbonylamino)hexanoïque (84 mg, 0.32 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sec (6 ml) à 0°C et sous argon sont successivement ajoutés le chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide commercial (61 mg, 0.32 mmol) et la 4-diméthylaminopyridine (4 mg, 33 µmol). Le mélange réactionnel est ensuite agité 30 minutes à 0°C puis une nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite lavé avec de l'eau puis une solution HCl 1N ; les phases sont ensuite séparées. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone 6/1) permet de recueillir le produit de couplage (83 mg ; 44%). <sup>13</sup>C-RMN (62,89 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ en ppm : 173.69, 173.53, 173.26, 171.21, 171.11, 170.61, 170.38, 170.31, 170.22, 156.36, 138.26, 136.58, 135.20, 134.87, 128.48, 128.38, 128.31, 128.27, 128.19, 127.95, 127.55, 76.50, 71.24, 71.10, 67.58, 67.48, 66.79, 66.42, 65.69, 49.99, 48.77, 47.86, 41.70, 41.49, 40.70, 39.15, 37.50, 35.94, 34.44, 34.37, 33.97, 33.67, 31.80, 29.54, 29.24, 29.07, 28.37, 25.98, 25.55, 25.13, 25.08, 24.91, 24.28, 22.58, 14.02.

2.24.2 Acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide β-N-[(1S)-1,2-dicarboxyethyl]amide (= OM-197-Asp-AC)

Une solution du composé préparé ci-dessus (80 mg, 0.053 mmol) dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/éthanol 1/4 (10 ml) contenant de l'acide acétique (1 ml) est hydrogénée en présence de Pd sur charbon à 10% (50 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 12 à 24 heures. Le catalyseur est ensuite éliminé par filtration. Le filtrat est évaporé à sec puis le résidu est séché à la pompe à palettes pour donner le diacide (61 mg, rendement quantitatif) ; SM : Calc. pour C<sub>59</sub>H<sub>109</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub> 1095.8 ; Trouvé : m/z 1097.0 ([M+H]<sup>+</sup>). (Figure 36).



**EXEMPLE 2.25.*****Acide N-acétyl-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide (= OM-197-N'C2-AC) (Figure 37)*****2.25.1. Acide N-acétyl-D-aspartique,  $\beta$ -benzyl ester**

5 A une solution d'anhydride acétique (85  $\mu$ l, 0.90 mmol) dans l'acétonitrile (1 ml) est ajoutée une solution de H-D-Asp(OBn)-OH commercial (Senn Chemicals, CH-Dielsdorf) (200 mg, 0.90 mmol) dans un mélange CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/Et<sub>3</sub>N (3.5/1.0/0.4 ml). Le milieu réactionnel est agité 18h à température ambiante. Le solvant organique est évaporé et la phase aqueuse résiduelle refroidie à 0°C, acidifiée avec une solution

10 aqueuse d'acide citrique à 10% jusqu'à pH=3 et extraite avec EtOAc (2 x). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées. Le  $\beta$ -benzyl ester de l'acide N-acétyl-D-aspartique obtenu sous forme d'un solide cristallin blanc (192 mg, 81%) est utilisé dans l'étape suivante sans autre purification. (Rf=0,30 dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20/1 contenant 2% d'acide acétique ; révélateur U.V.

15 et phosphomolybdique)

**2.25.2 Acide N-acétyl-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyl-oxytétradécanoylamino]pentyl]amide  $\beta$ -benzyl ester**

Une solution de IIDQ (2-isobutoxy-1-isobutoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoléine) (254

20 mg ; 0,84 mmol ; 1,2 éq) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (5 ml) est additionnée à une solution du  $\beta$ -benzyl ester de l'acide N-acétyl-D-aspartique préparé ci-dessus (185 mg ; 0,70 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (15 ml) à température ambiante et sous argon. Le mélange réactionnel est agité 15 minutes puis une solution de (2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol (Section 1.1.2) (334 mg ;

25 0,77 mmol ; 1,1 éq) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (10 ml) est ajoutée. Après 3 heures d'agitation, le solvant est évaporé. Une purification du produit résiduel par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone 5/3 puis acétone) permet de recueillir le produit de couplage (369 mg ; 78%). (Rf=0,22 dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone 5/2 ; révélateur U.V. et phosphomolybdique). <sup>13</sup>C-RMN (62,89 MHz,

30 CD<sub>3</sub>OD),  $\delta$  en ppm : 171,92 ; 171,23 ; 171,07 ; 170,61 ; 170,35 ; 138,11 ; 135,24 ; 128,40 ; 128,24 ; 128,02 ; 127,69 ; 127,59 ; 71,25 ; 67,57 ; 64,56 ; 51,03 ; 49,41 ; 41,51 ; 39,21 ; 35,90 ; 33,88 ; 31,73 ; 29,46 ; 29,17 ; 28,32 ; 28,02 ; 25,35 ; 25,24 ;

24,97 ; 22,83 ; 22,51 ; 13,97 ; SM : Calc. pour  $C_{39}H_{59}N_3O_7$  681,4 ; Trouvé : m/z 682,5 ( $[M+H]^+$ ), 704,5 ( $[M+Na]^+$ ).

2.25.3 Acide N-acétyl-D-aspartique,  $\alpha$ -N-{(4R)-5-[6-(benzyloxycarbonylamino)hexanoyloxy]-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino] pentyl}amide  $\beta$ -benzyl ester

A une solution d'acide N-acétyl-D-aspartique,  $\alpha$ -N-{(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl}amide  $\beta$ -benzyl ester (200 mg, 0.29 mmol) et d'acide 6-(benzyloxycarbonylamino)hexanoïque (156 mg, 0.59 mmol) dans du  $CH_2Cl_2$  sec (8 ml) à 0°C et sous argon sont successivement ajoutés le chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide commercial (112 mg, 0.59 mmol) et la 4-diméthylaminopyridine (7 mg, 59  $\mu$ mol). Le mélange réactionnel est ensuite agité 30 minutes à 0°C puis une nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite lavé avec de l'eau puis une solution HCl 1N ; les phases sont ensuite séparées. La phase organique est séchée sur  $MgSO_4$ , filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution  $CH_2Cl_2$ /acétone 6/1) permet de recueillir le produit de couplage (200 mg ; 73%) sous forme d'un solide blanc.  $^{13}C$ -RMN (62.89 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  en ppm 173.65, 171.71, 171.26, 170.30, 156.41, 138.16, 136.60, 135.33, 128.57, 128.46, 128.38, 128.20, 128.04, 127.76, 127.62, 71.21, 66.80, 66.53, 65.72, 65.63, 49.36, 47.80, 41.36, 40.76, 39.22, 39.13, 35.79, 33.75, 31.88, 29.61, 29.31, 28.58, 28.52, 26.04, 25.48, 25.11, 24.36, 23.13, 22.64, 14.09.

2.25.4. Acide N-acétyl-D-aspartique,  $\alpha$ -N-{(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl}amide (OM-197-N'C2-AC)

Une solution du composé préparé ci-dessus (200 mg, 0.22 mmol) dans un mélange  $CH_2Cl_2$ /éthanol 1/1 (16 ml) contenant de l'acide acétique (2 ml) est hydrogénée en présence de Pd sur charbon à 10% (40 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 12 à 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 donner l'acide N-acétyl-D-aspartique,  $\alpha$ -N-{(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl}amide (132 mg,



rendement quantitatif) ; SM : Calc. pour  $C_{31}H_{58}N_4O_8$  614.43 ; Trouvé : m/z 615.5 ( $[M+H]^+$ ), 629.5 ( $[M+NH_4]^+$ ), 637.5 ( $[M+Na]^+$ ) (Figure 38).

### EXEMPLE 2.26.

- 5 **Acide N-(2-décanoyloxyoctanoyl)-D-aspartique,  $\alpha$ -N-{(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl}amide (= OM-197-N'(C10-2OC8)-AC) (Figure 39)**

#### 2.26.1. 2-Hydroxyoctanoate de benzyle

A une solution d'acide-2-hydroxyoctanoïque racémique commercial (1,00 g, 6,2  
10 mmol) dans l'acétate d'éthyle de qualité HPLC (30 ml) sont ajoutés successivement le bromure de benzyle (2,22 ml; 18,7 mmol), la triéthylamine (2,6 ml; 18,7 mmol) et l'iodure de tétrabutylammonium (1,15 g; 3,12 mmol). La solution est agitée 18 heures à température ambiante puis le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans de l'éther puis cette phase organique est lavée avec une solution de  $NaHCO_3$   
15 saturée puis avec  $H_2O$  (2x). La phase organique est séchée sur  $MgSO_4$ , filtrée et évaporée pour donner le 2-hydroxyoctanoate de benzyle brut ( $R_f=0,57$  dans éther de pétrole/ EtOAc 3/1 ; révélateur U.V. et phosphomolybdique).

#### 2.26.2. 2-Décanoyloxyoctanoate de benzyle

20 A une solution de l'ester précédemment obtenu (780 mg ; 3,12 mmol) dans du  $CH_2Cl_2$  sec (15 ml) à 0°C sont ajoutés de la pyridine (0.9 ml) puis le chlorure de décanoyle (654 mg ; 3,43 mmol) au goutte à goutte. Le mélange est agité 20 heures à température ambiante puis le milieu réactionnel est versé dans de l'eau glacée contenant  $NaHCO_3$  (5%). La phase organique est séparée, lavée avec une solution  
25 de HCl 1N puis avec  $H_2O$  (2x). La phase organique est ensuite séchée sur  $MgSO_4$ , filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution éther de pétrole/EtOAc 30/1) permet de recueillir le 2-décanoyloxyoctanoate de benzyle pur.

2.26.3. Acide 2-décanoyloxyoctanoïque

Le 2-décanoyloxyoctanoate de benzyle obtenu ci-dessus (515 mg ; 1,27 mmol) dans de l'EtOH de qualité HPLC (40 ml) est hydrogéné en présence de Pd sur charbon à 10% (100 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 2 heures. Le catalyseur est éliminé par filtration sur membrane millipore. Le filtrat est évaporé à sec puis le résidu est séché à la pompe à palettes pour obtenir l'acide 2-décanoyloxyoctanoïque (rendement quantitatif).

2.26.4. Acide N-(2-décanoyloxyoctanoyl)-D-aspartique,  $\beta$ -benzyl ester

A une solution d'acide 2-décanoyloxyoctanoïque (317 mg ; 1.01 mmol) dans du THF anhydre (2 ml) à -15°C et sous argon sont ajoutés successivement la *N*-méthylmorpholine (111  $\mu$ l ; 1.01 mmol ; 1éq) et l'isobutyl chloroformate (131  $\mu$ l ; 1.01 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) (225 mg ; 1.01 mmol ; 1éq) dans un mélange CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 3,5/1 (9 ml) contenant Et<sub>3</sub>N (0.4 ml) est alors ajoutée. Le mélange réactionnel est ensuite agité une nuit à température ambiante. La phase organique est ensuite évaporée 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 EtOAc (2x). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution éther de pétrole/ EtOAc 2/1 contenant 2% d'acide acétique) suivi d'une coévaporation au toluène permet de recueillir le  $\beta$ -benzyl ester de l'acide N-(2-décanoyloxyoctanoyl)-D-aspartique (140 mg ; 27%).

25

2.26.5. Acide N-(2-décanoyloxyoctanoyl)-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl]amide  $\beta$ -benzyl ester

IIDQ (98 mg ; 0.32 mmol ; 1.2 éq) est additionné à une solution du  $\beta$ -benzyl ester de l'acide N-(2-décanoyloxyoctanoyl)-D-aspartique (140 mg ; 0.27 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (15 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 (Section 1.1.2) (129 mg ; 0.30 mmol ; 1.1 éq) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (5 ml) est additionnée. Après 18 heures d'agitation, la

30



solution est évaporée à sec. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acétone 5/1 puis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acétone 1/1) permet de recueillir le produit de couplage (197 mg ; 78%). (R<sub>f</sub>=0.30 dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acétone 5/1; révélateur U.V. et phosphomolybdique).

5

2.26.6. Acide N-(2-décanoyloxyoctanoyl)-D-aspartique,  $\alpha$ -N-{(4R)-5-[6-(benzyloxy-carbonylamino)hexanoyloxy]-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoyl-amino] pentyl}amide  $\beta$ -benzyl ester

A une solution du  $\beta$ -benzyl ester de l'acide N-(2-décanoyloxyoctanoyl)-D-aspartique, 10  $\alpha$ -N-{(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentyl}amide (197 mg, 0.21 mmol) et d'acide 6-(benzyloxy-carbonylamino)hexanoïque (112 mg, 0.42 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sec (8 ml) à 0°C et sous argon sont successivement ajoutés le chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide commercial (81 mg, 0.42 mmol) et la 4-diméthylaminopyridine (6 mg, 42  $\mu$ mol). Le mélange réactionnel 15 est ensuite agité 30 minutes à 0°C puis une nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite lavé avec de l'eau puis avec une solution HCl 1N ; les phases sont ensuite séparées. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Une purification par chromatographie Flash sur gel de silice (élution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone 6/1) permet de recueillir le produit de couplage (170 mg ; 68%).

20

2.26.7. Acide N-(2-décanoyloxyoctanoyl)-D-aspartique,  $\alpha$ -N-{(4R)-5-(6-amino hexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl}amide

Une solution du composé préparé ci-dessus (150 mg, 0.13 mmol) dans un mélange 25 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/éthanol 1/1 (16 ml) contenant de l'acide acétique (2 ml) est hydrogénée en présence de Pd sur charbon à 10% (40 mg) à température ambiante et sous pression atmosphérique d'hydrogène pendant 12 à 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 donner l'acide N-(2-décanoyloxyoctanoyl)-D-aspartique,  $\alpha$ -N-{(4R)-5- 30 (6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl}amide (110 mg, rendement quantitatif) ; SM : Calc. pour C<sub>47</sub>H<sub>88</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> 868.65 ; Trouvé : m/z 870.0 ([M+H]<sup>+</sup>), 884.0 ([M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>), 891.5 ([M+Na]<sup>+</sup>). (Figure 40).

**EXEMPLE 2.27.*****Purification et analyse des composées selon l'invention***

5 Les produits de synthèse et des pseudodipeptides acylés 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.

10 2.27.1. Purification

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

15 Colonne: Bondapak C18 PrepPak, 40 x 200 mm, 15-20  $\mu$ 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  
20 minutes  
Gradient A:B : 40 à 80% B en 10 minutes  
Elution isocratique 80% B, 30 minutes  
Lavage : 100% B, 10 minutes  
Détection: UV, 210 nm

25

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

30 Colonne: Kromasil C18, 21 x 250 mm, 5  $\mu$ 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  
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
- 5 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  $\mu\text{m}$ , 300 Å, Waters. Le contre ion peut ensuite être échangé par lavage au moyen d'une 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.

15 2.27.2. Suivi de la purification

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

- 20 Colonne: Supelcosil C18, 3  $\mu\text{m}$ , 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
- Débit: 1 ml/min
- 25 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-Shimadzu). Les temps de rétention selon le système utilisé peut varier d'environ une minute pour un composé donné.
- 30

### 2.27.3. Dosage et analyse de pureté des produits finaux

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

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

10 Phase mobile: A: eau - acétonitrile (1:1, v/v), 0.05% TFA  
B: eau - isopropanol (1:9, v/v), 0.05% TFA

Débit: 1 ml/min

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

Température : 40°C

15

### 2.27.4. Analyses spectroscopiques

#### Spectrométrie de masse

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

25 Les spectres <sup>1</sup>H-RMN et <sup>13</sup>C-RMN ont été mesurés sur des appareils de type Bruker DPX à 250.13 et 62.89 MHz.



### 3<sup>ème</sup> série d'exemples: préparation des conjugués

#### EXEMPLE 3.1.

##### *Conjugués avec le peptide FGFG*

5 Comme le montrent les schémas de synthèses présentés dans les Figures 5, 8, 15, 17, 19, 21 et 23, une réaction de dihydroxylation vicinale est réalisée sur les pseudodipeptides acylés portant un bras auxiliaire de type oléfinique pour conduire à la formation d'une fonction diol stable. Une réaction d'oxydation periodique est ensuite effectuée pour créer une fonction aldéhyde sur le bras auxiliaire. Cette

10 dernière permet, par une réaction d'amination réductrice, de 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 nécessaire afin d'éliminer les sels présents en solution. Cette purification de l'aldéhyde est réalisée sur phase Bondapack C18 (Waters), 15-20  $\mu\text{m}$ , 300 Å, selon la procédure suivante :

15

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

20 La réaction de couplage par amination réductrice est réalisée en solution aqueuse en respectant une stoechiométrie égale entre les fonctions aldéhyde (bras auxiliaire du pseudodipeptide acylé) et les fonctions amines disponibles sur le peptide ou la protéine à coupler.

25 Dans l'exemple du peptide FGFG, 2 mg d'OM-197-FV7 purifié (1.86  $\mu\text{mol}$ , 1 éq.) ont été ajoutés à une solution de 0.8 mg de FGFG (1.86  $\mu\text{mol}$ , 1 éq.) dissous dans 1 ml H<sub>2</sub>O-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  $\mu\text{l}$  de NaBH<sub>3</sub>CN 1M (5.77 mg, 50 éq.) pour former une liaison carbone-azote

30 particulièrement stable (Figure 41). Le conjugué est purifié dans un premier temps sur colonne Vydac C<sub>4</sub> 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 est ensuite resolubilisé dans H<sub>2</sub>O stérile 0.01% triéthanolamine (TEoA) pour satisfaire aux conditions des tests d'activités biologiques. Le spectre de masse ES/MS enregistré

5 après purification est présenté en Figure 43 et met en évidence un ion moléculaire [M+H]<sup>+</sup> 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]<sup>+</sup>, *m/z* 853.0 [2M+H]<sup>+</sup>, Figure 42) n'ont pas été

10 détectés.

### EXEMPLE 3.2.

#### **Conjugués avec le peptide (NANP)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub>**

15 Le composé OM-197-FV7 obtenu par le schéma de synthèse présenté en Figure 5 peut être couplé, par exemple, à un peptide d'intérêt pharmaceutique tel que (NANP)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> [Valmori *et al.*, 1992, J. immunol. 149, 717-721], dont la séquence est la suivante :

(NANP)<sub>6</sub>QYIKANSKFIGITEFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

20

Le peptide (NANP)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> 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)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> (1.16 μmol, 1 éq) dissous dans 1 ml H<sub>2</sub>O-isopropanol (1:1) La solution est agitée pendant 30 minutes à température

25 ambiante, puis l'étape de réduction est effectuée en ajoutant 230 μl de NaBH<sub>3</sub>CN 1M (14.43 mg, 50 éq). ) La solution est agitée pendant deux heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite dialysé contre H<sub>2</sub>O pendant 24 heures. (cassette de dialyse 3.5Kd, Slide-A-Lyzer, Pierce). L'analyse LC/ES-MS du mélange réactionnel montre la présence de trois types de molécules, comme le

30 montrent les chromatogrammes présentés en Figure 44: 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 sont présentées aux Figures 45, 46 et 47 et attestent d'une conjugaison covalente à une ou deux molécules de OM-197-FV pour le monoconjugué et le biconjugué, respectivement.

5 Figure 45 : **Peptide (NANP)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> (peptide libre)**. PM: 6451

ions à *m/z* 1076.2 (A6), 1291.2 (A5), 1613.7 (A4).

Figure 46 : **Monoconjugué OM-197-FV-(NANP)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub>**. PM: 7481

ions à *m/z* 1247.8 (B6), 1497.4 (B5), 1871.2 (B4).

Figure 47 : **Biconjugué (OM-197-FV)<sub>2</sub>-(NANP)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub>**. PM: 8511

10 ions à *m/z* 1419.6 (C6), 1703.3 (C5), 2129.1 (C4).

L'analyse par SDS-PAGE des conjugués OM-197-FV-(NANP)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> a permis de mettre en évidence différentes bandes distinctes correspondant au peptide n'ayant pas réagi, au monoconjugué et au biconjugué. Dans les conditions  
15 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.

20

### EXEMPLE 3.3.

#### *Conjugués avec le peptide P<sub>2</sub>P<sub>30</sub>*

D'autres peptides peuvent également être couplés par amination réductrice aux composés portant un bras auxiliaire de type aldéhyde. On présentera par exemple le  
25 couplage d'OM-197-FV7 au peptide P<sub>2</sub>P<sub>30</sub>. Ce dernier correspond à la partie épitope T de la toxine tenanus toxoid et présente la séquence suivante:

**KQYIKANSKFIGITEFNFTVSWLRVPKVSASHLE**

30 Le peptide P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> présente cinq sites de conjugaison possibles (amine terminale + quatre lysines) et une masse de 4200 uma. Cinq équivalents de OM-197-FV7 ont donc été engagés. Les conditions réactionnelles décrites ci-dessus ont été appliquées. Après dialyse contre H<sub>2</sub>O (cassette de dialyse 3.5Kd, Slide-A-Lyzer,

Pierce), les spectres de masse des conjugués obtenus ont été mesurés par LC/ES-MS et comparés à ceux enregistrés pour le peptide libre P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> qui présente des ions multiples chargés  $m/z$  840.9 (A5), 1050.9 (A4) et 1401.0 (A3) qui constituent l'enveloppe ionique (Figure 48) d'un peptide de masse moléculaire de 4200 uma. Le spectre ES/MS du monoconjugué OM-197-FV-P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> présente des ions multiples chargés  $m/z$  872.8 (A6), 1047.1 (A5), 1308.6 (A4) et 1744.4 (A3) (Figure 49) qui constituent l'enveloppe ionique d'un conjugué de masse moléculaire de 5230 uma, correspondant au greffage d'une molécule de OM-197-FV sur une molécule de peptide P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> par amination réductrice.

10

De même, le spectre de masse obtenu pour le biconjugué (OM-197-FV)<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> ne laisse aucun doute quant à la présence de deux molécules de OM-197-FV par unité 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 50), qui après transformation attestent de la masse moléculaire attendue pour le biconjugué (6261 uma).

15

#### EXEMPLE 3.4.

##### *Conjugués avec le peptide (NANP)<sub>3</sub>CS.T3*

Un couplage similaire peut être réalisé sur le peptide (NANP)<sub>3</sub>CS.T3 (TNO, PM: 3527 uma), dont la séquence est la suivante :

NANPNANPNANPDIE**K**KIAKME**K**ASSVFNVVNS

Après dialyse contre H<sub>2</sub>O, 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.

#### EXEMPLE 3.5.

##### *Conjugués avec le peptide MR99B*

Le composé OM-197-MC-FV6, obtenu par le schéma de synthèse présenté en Figure 8, peut être couplé, par exemple, à un peptide d'intérêt pharmaceutique tel



que PyCS 245-253. Ce peptide, correspondant à la partie épitope T de *Plasmodium yoelii* [Franke, E.D. *et al.*, 1997, J. Immunol. 159, 3424-3433], présente la séquence suivante :

5 SYVPSAEQI (PyCS 245-253)

Afin de ne pas modifier la partie épitope-T lors de l'étape de conjugaison, les acides aminés SER ont été ajoutés pour former un peptide appelé MR99B, de séquence :

10 SERSYVPSAEQI (MR99B)

Du fait de sa séquence dépourvue de lysine, le peptide MR99B présente un site unique de conjugaison par amination réductrice (sur l'amine terminale). Ainsi, 2 mg d'OM-197-MC-FV6 purifiés (2.04  $\mu$ mol, 1.4 éq.) sont ajoutés à une solution de 2 mg  
15 de MR99B (1.47  $\mu$ mol, 1 éq.) dissous dans 1 ml H<sub>2</sub>O-isopropanol (1:1) La solution est agitée pendant 30 minutes à température ambiante, puis l'étape de réduction est effectuée en ajoutant 29.4  $\mu$ l de NaBH<sub>3</sub>CN 1M (29.4  $\mu$ mol, 20 éq.). La solution est agitée pendant deux heures à température ambiante. L'analyse LC/ES-MS du mélange réactionnel permet de mettre en évidence la formation d'un conjugué  
20 OM-197-MC-FV-MR99B de masse moléculaire attendue (2330.4 uma, Figure 51), comme l'attestent les spectres présentés en Figures 52 (enveloppe ionique) et 53 (spectre transformé).

La purification du conjugué OM-197-MC-FV-MR99B est réalisée par  
25 chromatographie liquide semi-préparative sur phase C<sub>4</sub> dans les conditions suivantes :

Colonne: Vydac C<sub>4</sub>, 250 x 10mm, 5  $\mu$ m, 300A (Vydac)  
Phase mobile: A: eau - MeCN (9:1, v/v), 0.05% TFA  
30 B: isopropanol - eau (9:1, v/v), 0.05% TFA  
Débit: 2.5 ml/min  
Elution: Elution isocratique : 65% B, 20 minutes  
Lavage : 100% B, 10 minutes  
Détection: UV, 210 nm

Système : HPLC 1050

Afin de montrer que la partie antigénique du peptide n'est pas affectée par la conjugaison, une digestion à la trypsine du conjugué OM-197-MC-FV-MR99B est  
5 réalisée. 0.5 mg de conjugué sont incubés 24 heures à 25°C avec 83 µg de trypsine (Roche, #109819) (ratio substrat-enzyme (6 :1)) dans 1 ml de tampon 50mM Tris HCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.

L'analyse LC/ES-MS après la réaction est présentée en Figure 54 et permet de  
10 mettre en évidence deux fragments dont les spectres ES-MS sont présentés en Figures 55 et 56. Le premier fragment exhibe des ions à  $m/z$  993.5 ( $[M+H]^+$ ) et 1015.6 ( $[M+Na]^+$ ) et correspond au peptide CSPy 245-253 (Figure 55). Le second fragment présente des ions à  $m/z$  678.1 ( $[M+H]^{+2}$ ) et 1355.0 ( $[M+H]^+$ ), indiquant la présence d'une structure de type OM-197-MC-FV-SER (Figure 56). Un troisième pic  
15 est également observé. Il correspond aux deux fragments SYVPS et AEQI (coéluant dans ces conditions chromatographiques). Cette réaction est également observée lors de la digestion de MR99B seul.

Ces résultats montrent clairement que la conjugaison ne modifie pas la partie  
20 épitope-T du peptide MR99B, comme l'illustre le schéma de la Figure 51.

### EXEMPLE 3.6.

#### *Conjugués avec le peptide MR99A*

25 Afin d'augmenter le degré de conjugaison de OM-197-MC-FV d'un peptide et augmenter le ratio adjuvant/antigène sans modifier la partie épitope-T, des séquences de type KGG peuvent être greffées au peptide à conjuguer. Ainsi, une séquence KGGKGGK peut, par exemple, être greffée au peptide MR99B, pour donner le peptide MR99A suivant :

30

**KGGKGGKSERSYVPSAEQ**

**MR99A**



Celui-ci présente alors quatre sites de conjugaison possibles pour une réaction d'amination réductrice (trois lysines et l'amine terminale). Ainsi, 12 mg d'OM-197-MC-FV6 purifié (12.2  $\mu\text{mol}$ , 12  $\text{éq.}$ ) ont été ajoutés à une solution de 2 mg de MR99A (1.01  $\mu\text{mol}$ , 1  $\text{éq.}$ ) dissous dans 1 ml H<sub>2</sub>O-isopropanol (1:1) La solution est  
5 agitée pendant 30 minutes à température ambiante, puis l'étape de réduction est effectuée en ajoutant 242  $\mu\text{l}$  de NaBH<sub>3</sub>CN 1M (244  $\mu\text{mol}$ , 242  $\text{éq.}$ ). La solution est agitée pendant 2 heures à température ambiante. L'analyse LC/ES-MS du mélange réactionnel permet de mettre en évidence différents pics correspondant aux différents degrés de conjugaison de molécules d'OM-197-MC-FV sur le peptide  
10 MR99A. Les spectres de masse correspondant au triconjugué (OM-197-MC-FV)<sub>3</sub>-MR99A (4870 uma) sont montrés aux Figures 57 (enveloppe ionique) et 58 (spectre transformé), alors que les spectres présentés en Figures 59 (enveloppe ionique) et 60 (spectre transformé) attestent de la formation du tétraconjugué (OM-197-MC-FV)<sub>4</sub>-MR99A (5834 uma). Des ions correspondant à une forme pentaconjuguée sont  
15 également observés. Ce résultat montre que la lysine, dans certaines conditions réactionnelles (excès d'OM-197-MC-FV), n'est pas le seul acide aminé à pouvoir réagir par amination réductrice.

La purification des tri- et tétra-conjugués (OM-197-MC-FV)<sub>3-4</sub>-MR99A est réalisée par chromatographie liquide semi-préparative sur phase C<sub>4</sub> dans les conditions  
20 suivantes :

Colonne: Vydac C<sub>4</sub>, 250 x 10mm, 5  $\mu\text{m}$ , 300A (Vydac)  
Phase mobile: A: eau - MeCN (9:1, v/v), 0.05% TFA  
B: isopropanol - eau (9:1, v/v), 0.05% TFA  
25 Débit: 2.5 ml/min  
Elution: Elution isocratique : 85% B, 20 minutes  
Lavage : 100% B, 10 minutes  
Détection: UV, 210 nm  
Système : HPLC 1050

30

Comme dans le cas du monoconjugué OM-197-MC-FV-MR99B, une digestion à la trypsine est réalisée sur les polyconjugués (OM-197-MC-FV)<sub>n</sub>-MR99A afin de déterminer si la partie antigénique (CSPy 245-253) n'est pas affectée par la

conjugaison. 1 mg de polyconjugué est incubé 24 heures à 25°C avec 166 µg de trypsine (Roche, #109819) (ratio substrat-enzyme (6 :1)) dans 1ml de tampon 50mM Tris HCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.

L'analyse LC/ES-MS après réaction permet de mettre en évidence de nombreux fragments correspondant à des clivages à divers endroits du peptide MR99A. Parmi ceux-ci, on relèvera le fragment présentant des ions à  $m/z$  993.5 ( $[M+H]^+$ ) et 1015.6 ( $[M+Na]^+$ ) et correspondant au peptide CSPy 245-253. La présence de ce dernier atteste de l'intégrité de la partie épitope-T du peptide même après une conjugaison multiple. Deux fragments, observés par leurs ions triplement chargés à  $m/z$  1621.4 ( $[M+H]^{3+}$ ) et 1942.8 ( $[M+H]^{3+}$ ), sont particulièrement intéressants. En effet, ils correspondent aux fragments (OM-197-MC-FV)<sub>4</sub>-KGGKGGKSER et (OM-197-MC-FV)<sub>5</sub>-KGGKGGKSER, respectivement. L'observation de ces derniers montre que les différentes molécules d'OM-197-MC-FV sont effectivement greffées sur la séquence ajoutée à CSPy 245-253, même dans le cas où des acides aminés autres que la lysine ont réagi lors de l'étape d'amination réductrice. On soulignera également que la présence de plusieurs molécules de OM-197-MC-FV, stériquement importante, sur un peptide n'affecte pas l'activité de protéase telle que la trypsine. Ce résultat prend dès lors une importance particulière dans le cas, par exemple, de conjugaison à une prodrogue où le principe actif peut être libéré après un clivage sélectif d'une liaison seccable.

### EXEMPLE 3.7.

#### *Conjugués avec des peptides de Ag85c*

Les structures porteuses d'un bras auxiliaire de type formylevaléryle peuvent être conjuguées à de nombreux peptides d'intérêt pharmaceutique. Nous citerons, par exemple, le greffage par amination réductrice de molécules d'OM-197-MC-FV sur l'amine terminale de peptides synthétiques dont les séquences dérivent de celle d'une protéine antigénique de *Mycobacterium tuberculosis*. Les peptides initiaux sont les suivants :

30

<b>MR100</b>	<b>YLQVPSASMGR</b>	<b>1208.4 uma</b>
MR101	MVQIPRLVANNTRIWVYC	2176.6 uma



LR72

PYAASLSGFLNPSEGWWPTLI GLAM

2676.1 uma

Après réaction avec OM-197-MC-FV, les conjugués suivants ont été observés par analyses LC/ES-MS: à titre d'exemple OM-197-MC-FV-MR100 qui montre une  
5 masse moléculaire de 2171.0 uma (Figure 61 et 62). Alternativement les conjugués OM-197-MC-FV-MR101, 3140.0 uma et OM-197-MC-FV-LR72, 3643.0 uma ont également été obtenus.

### 10 EXEMPLE 3.8.

#### *Dimère de structures de type OM-197*

La technique d'amination réductrice peut également être appliquée pour la synthèse de dimère de structures de type OM-197.

15 Par exemple, un dimère peut être formé avec deux composés porteurs d'un bras auxiliaire fonctionnalisé tels que OM-197-MC-FV et OM-197-MC-AC. Ainsi, 1 mg d'OM-197-MC-FV6 purifié (0.98  $\mu\text{mol}$ , 1 éq.) est ajoutés à une solution de 1 mg de OM-197-MC-AC (0.98  $\mu\text{mol}$ , 1 éq.) dissout dans 1 ml H<sub>2</sub>O-isopropanol (1:9) La solution est agitée pendant 1 heure à température ambiante, puis l'étape de  
20 réduction est effectuée en ajoutant 19.6  $\mu\text{l}$  de NaBH<sub>3</sub>CN 1M (19.6  $\mu\text{mol}$ , 20 éq.). ) La solution est agitée 12 heures à température ambiante. L'analyse LC/ES-MS du mélange réactionnel permet de mettre en évidence la formation d'un dimère OM-197-MC-FV-OM-197-MC-AC de masse moléculaire attendue (1945.5 uma), comme l'atteste le spectre présenté en Figure 63. Cette molécule présente ainsi deux  
25 fonctions acide carboxylique aux extrémités du squelette porteur des chaînes acyles.

Dans la structure présentée en Figure 63, un des groupes carboxyliques peut être remplacé, par exemple, par un groupe phosphoryle en réalisant cette synthèse à  
30 partir d'un composé de type OM-197-MP-AC ou OM-197-MP-FV. Par une réaction d'amination réductrice similaire à celle décrite ci-dessus entre deux composés porteurs d'un bras auxiliaire fonctionnalisé (OM-197-MP-FV et OM-197-MC-AC), un

dimère OM-197-MP-FV-OM-197-MC-AC a pu être obtenu. Le spectre ES/MS présenté en Figure 64 atteste de la masse moléculaire attendue pour ce composé (2011.9 uma).

5

### EXEMPLE 3.9.

#### *Conjugaison de composés porteurs d'un bras auxiliaire de type amino*

Les composés porteurs d'un bras auxiliaire de type amino peuvent également être conjugués à des antigènes peptidiques par une réaction d'amination réductrice. Il est en effet possible d'exploiter, par exemple, la présence d'une sérine terminale dans la séquence des peptides à conjuguer. Dans un premier temps, une oxydation périodique est réalisée sur le peptide, conduisant à la formation d'un groupement glyoxylyle (-CO-CHO) très réactif. Ce dernier peut alors réagir par amination réductrice avec une amine primaire présente sur le bras auxiliaire fonctionnalisé des composés de type OM-197.

Le peptide synthétique MR99B peut par exemple être conjugué au composé OM-197-MC-AC, comme le montre le schéma de synthèse de la Figure 65. Pour ce faire, 147  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaIO}_4$  0.1M (14.6  $\mu\text{mol}$ , 20 éq.) sont ajoutés à une solution 1 mg de peptide MR99B (0.73  $\mu\text{mol}$ , 1éq.) dissout dans 1 ml d'eau. La solution est agitée pendant deux heures à température ambiante. L'aldéhyde ainsi obtenu est purifié sur phase C18 et recueilli dans 1 ml isopropanol-eau (1 :1). 0.72 mg du composé OM-197-MC-AC (0.73  $\mu\text{mol}$ , 1éq.) est ensuite ajouté, ainsi que 1 ml de tampon borate 0.2M, pH 9.2. Après agitation à température ambiante pendant 30 minutes, la réduction est effectuée en ajoutant 14.6  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  1M (14.6  $\mu\text{mol}$ , 20 éq.). La solution est agitée pendant 24 heures à température ambiante.

L'analyse LC/ES-MS du mélange réactionnel permet de mettre en évidence la formation d'un conjugué OM-197-MC-AC-MR99B de masse moléculaire attendue (2299.1 uma, Figure 65), comme l'attestent les spectres présentés en Figures 66 (enveloppe ionique) et 67 (spectre transformé).



D'autres composés porteurs d'un bras auxiliaire de type amino peuvent être conjugués de façon similaire. On citera pour exemple, OM-197-MC-AP, OM-197-MP-AC, OM-212-AH1, OM-197-MC-Gly, OM-197-MC-Lys, OM-197-Lys-AC ou OM-197-Asp-AC.

5

### EXEMPLE 3.10.

#### *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 congaison possibles pour les pseupeptidolipides portant un bras auxiliaire fonctionnalisé avec un groupe aldéhyde. En variant la stœchiométrie de la réaction d'amination réductrice (ratio pseudodipeptide acylé / protéine), différents degrés de conjugaison peuvent être obtenus.

1 mg d'OM-197-FV7 purifié (0.928  $\mu\text{mol}$ , 10  $\text{éq}$ ) a été ajouté à une solution de 4 mg d'ovalbumine (0.09  $\mu\text{mol}$ , 1  $\text{éq}$ ) dissous dans 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . La solution est agitée pendant 30 minutes à température ambiante, puis l'étape de réduction est effectuée en ajoutant 46  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  1M (2.89 mg, 50  $\text{éq}$ ). ) La solution est agitée pendant deux heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite dialysé contre  $\text{H}_2\text{O}$  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 68 (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 C<sub>4</sub> confirment ce résultat. En effet, dans ces conditions, l'ovalbumine initiale apparaît clairement à Rt=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  
5 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.

### 10 **EXEMPLE 3.11.**

#### ***Conjugués avec hémagglutinine H1N1***

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  $\mu$ 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  $\mu$ mol, 1 éq) dissous dans 8 ml H<sub>2</sub>O. La solution est agitée pendant 30 minutes à température ambiante, puis l'étape de réduction est effectuée en ajoutant 46  $\mu$ l de  
20 NaBH<sub>3</sub>CN 1M (2.89 mg, 50 éq). La solution est agitée pendant deux heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite dialysé contre H<sub>2</sub>O pendant 24 heures (cassette de dialyse 3.5 Kd).

Le conjugué OM-197-FV-H1N1 a été analysé par SDS-PAGE dans les conditions  
25 utilisées pour le conjugué OM-197-FV-ovalbumine (gradient 4-20% polyacrylamide). 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 68 (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,  
30 Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva). Dans le cas des conjugués OM-197-FV-H1N1, une 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 3.12.****Conjugué avec AZT** (Figure 69)

A une solution d'**AZT** (200 mg ; 0,749 mmol) dans de la pyridine (4 ml) sont ajoutés  
5 successivement de l'anhydride succinique (150 mg ; 0,5 mmol) et de la 4-  
diméthylaminopyridine (50 mg ; 0,41 mmol). Après 12 heures à 50°C, du méthanol (2  
ml) est additionné et le milieu réactionnel est encore agité 15 minutes à température  
ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite concentré et le produit purifié par  
chromatographie Flash sur gel de silice avec l'éluant suivant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /MeOH : 5/1.  
10 Le produit est alors obtenu sous forme d'un solide blanc (266 mg ; 97%).  
C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (M = 367 g /mol) ; Rf = 0,25 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /MeOH : 4/1)

A une solution du dérivé succinyle de l'**AZT** ainsi obtenu (60 mg ; 0,163 mmol) dans  
du THF (3 ml) à 0°C et sous argon sont ajoutés successivement de la triéthylamine  
15 (24 µl ; 0,172 mmol) et du chloroformiate d'éthyle (14 µl ; 0,172 mmol). On observe  
rapidement un précipité de chlorhydrate de triéthylamine. Après 40 minutes  
d'agitation, on ajoute à 0°C une solution du dérivé aminocaproyle (Ex. 2.16) (160  
mg ; 0,163 mmol) dans un mélange DMF:eau 9/1 (10ml) contenant de la  
triéthylamine (24 µl ; 0,172 mmol). Le mélange réactionnel est alors agité 15 minutes  
20 à 0°C puis une nuit à température ambiante avant d'être évaporé sous pression  
réduite. Le produit brut est alors repris avec du dichlorométhane (15 ml) et de l'eau  
(5 ml). La phase organique est séparée. La phase aqueuse est acidifiée avec une  
solution aqueuse d'acide citrique à 10% puis extraite avec du dichlorométhane (2 x).  
Les phases organiques sont alors combinées, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et  
25 concentrées. Une purification par chromatographie sur gel de silice avec l'éluant  
suivant (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /MeOH : 9/1 puis 7/1) permet de recueillir le composé conjugué  
avec l'**AZT** (123 mg ; 57%) sous forme d'un solide blanc. Rf = 0,2 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /MeOH :  
4/1) ; C<sub>69</sub>H<sub>119</sub>N<sub>9</sub>O<sub>16</sub> (M = 1329 g /mol) ; trouvé : m/z = 1330.9 ([M+H]<sup>+</sup>).  
HPLC analytique : Tr = 24.437 min, colonne C18 Supelcosil (15 cm X 4.6 mm, 3 µm,  
30 100Å) ; solvant A = 50% MeCN, 5mM TBAP ; solvant B = 90% 2-propanol, 5mM  
TBAP. Gradient : 25-100% B en 37.5 min., détection UV à 210 nm.

HPLC preparative : sur colonne C18 Kromasil (25 cm X 21 mm, 5  $\mu$ m, 100Å), solvant A = 50% MeCN, 5mM TBAP ; solvant B = 90% 2-propanol, 5mM TBAP.

Elution du produit à 80% B

Phase finale : passage en sel de Na<sup>+</sup> par SPE, phase C18 Bondapack 15  $\mu$ m, 5 élution avec 90 % 2-propanol.

### **Conjugué avec d4T (Figure 69)**

A une solution de **d4T** (200 mg ; 0,89 mmol) dans de la pyridine (4 ml) sont ajoutés  
10 successivement de l'anhydride succinique (179 mg ; 0,786 mmol) et de la 4-diméthylaminopyridine (109 mg ; 0,89 mmol). Après 12 heures d'agitation à température ambiante, du méthanol (2 ml) est additionné et le milieu réactionnel est encore agité 15 minutes à température ambiante puis évaporé. Le produit brut est ensuite purifié par chromatographie Flash sur gel de silice avec l'éluant suivant :  
15 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /MeOH : 5/1). Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc (280 mg ; 97%). C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (M = 324 g /mol) ; R<sub>f</sub> = 0,25 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /MeOH : 4/1)

A une solution du dérivé succinyle du d4T ainsi obtenu (60 mg ; 0,185 mmol) dans du THF (3 ml) à 0°C et sous argon sont ajoutés successivement de la triéthylamine  
20 (27  $\mu$ l ; 0,194 mmol) et du chloroformiate d'éthyle (16  $\mu$ l ; 0,194 mmol). On observe rapidement un précipité de chlorhydrate de triéthylamine. Après 40 minutes d'agitation, on ajoute à 0°C une solution du dérivé aminocaproyle (Ex. 2.16) (181 mg ; 0,185 mmol) dans un mélange DMF :eau 9/1 (10ml) contenant de la triéthylamine (27  $\mu$ l ; 0,194 mmol). Le mélange réactionnel est alors agité 15 minutes  
25 à 0°C puis une nuit à température ambiante avant d'être évaporé sous pression réduite. Le produit brut est alors repris avec du dichlorométhane (15 ml) et de l'eau (5 ml). La phase organique est séparée. La phase aqueuse est acidifiée avec une solution aqueuse d'acide citrique à 10% puis extraite avec du dichlorométhane (2 x). Les phases organiques sont alors combinées, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et  
30 concentrées. Une purification par chromatographie sur gel de silice avec l'éluant suivant : (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /MeOH : 9/1 puis 7/1) permet de recueillir le composé conjugué



100

avec le d4T (107 mg ; 45%) sous forme d'un solide blanc. Rf = 0,2 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /MeOH : 4/1) ; C<sub>69</sub>H<sub>118</sub>N<sub>6</sub>O<sub>16</sub> (M = 1287 g /mol), found : m /z : 1288 (MH<sup>+</sup>) ; 1310 (Na).

HPLC analytique : Tr = 24.455 min, colonne C18 Supelcosil (15 cm X 4.6 mm, 3 μm, 100Å), solvant A = 50% MeCN, 5mM TBAP ; solvant B = 90% 2-propanol, 5mM  
5 TBAP. Gradient : 25-100% B en 37.5 min., détection UV à 210 nm.

HPLC preparative : sur colonne C18 Kromasil (25 cm X 21 mm, 5 μm, 100Å), solvant A = 50% MeCN, 5mM TBAP ; solvant B = 90% 2-propanol, 5mM TBAP.

Elution du produit à 80% B

Phase finale : passage en sel de Na<sup>+</sup> par SPE, phase C18 Bondapack 15 μm,  
10 élution avec 90 % 2-propanol.

## 4<sup>ème</sup> série d'exemples: étude pharmacologique des composés selon l'invention (*in vitro*)

### EXEMPLE 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 composés 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 jaune qui peut être suivi spectrophotométriquement à 405 nm.

15

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 produits sont testés à partir de dilution (5 x, 10 x, 50 x, 100 x, 500 x ou 1000 x) de la solution de produit à 0.1 mg/ml. Le résultat LAL correspond à la première dilution qui n'est plus inhibitrice pour le recouvrement d'une surcharge en LPS.

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 des résultats LAL pour les différents pseudodipeptides acylés porteurs d'un bras auxiliaire fonctionnalisé répondant à la formule générale I :

Produits	Dilution	EU/mg de produit	ng. équivalent LPS par mg de produit
OM-197-MC	50	88.6	7.4
OM-197-MC-MP	50	210.5	16.8
OM-197-FV6	50	540	43
OM-197-FV8	50	1820	145.6
OM-197-MC-FV5	50	49.3	3.9
OM-197-MC-FV7	10	< 0.05	< 0.004
OM-197-MP-AC (R/S,R)	25	0.14	0.011
OM-197-MP-AC (R,R)	25	0.15	0.012
OM-197-MP-AC (S,R)	25	< 0.125	< 0.01
OM-197-MC-AC	25	6.0	0.48
OM-197-N'C2-MC-AC	10	< 0.5	< 0.04
OM-197-N'(C10-2OC8)-MC-AC	10	< 0.5	< 0.04
OM-197-MC-Succ	25	5.3	0.42
OM-197-Lys	25	3.0	0.24
OM-197-AP	10	< 0.5	< 0.04
OM-197-Asp	50	< 2.5	< 0.2
OM-197-Asp-AC	50	2307	184.6
OM-197-Lys-AC	50	< 2.5	< 0.2
OM-197-MC-AC-Succ-AZT	10	1.34	0.11
OM-197-MC-AC-Succ-d4T	10	1.05	0.08
OM-197-MC-AC-Succ	10	< 0.05	< 0.004

Tous les pseudolipopeptides testés présentent une endotoxicité faible. Pour beaucoup de produits cette endotoxicité est même inférieure au seuil de détection du test. La détermination quantitative de l'endotoxicité est limitée du fait de la nécessité de diluer les échantillons pour retrouver la surcharge. Même les composés les plus actifs dans ce test LAL ont une activité endotoxinique 5000 x plus faible que le LPS.

Les pseudolipopeptides de l'invention sont intéressants du fait de leur faible endotoxicité et de leurs activités biologiques.

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

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.

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

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  $(\text{NANP})_6\text{P}_2\text{P}_{30}$  :

Composés ou mélanges testés	EU/mg	ng. équivalent LPS par mg de produit
$(\text{NANP})_6\text{P}_2\text{P}_{30}$	16	1.33
$(\text{NANP})_6\text{P}_2\text{P}_{30}$ + IFA	n.d. *	n.d. *
$(\text{NANP})_6\text{P}_2\text{P}_{30}$ + OM-197-FV6	13	1
$(\text{NANP})_6\text{P}_2\text{P}_{30}$ + OM-197-MC	12	1
$(\text{OM-197-FV})_{1,2,3}$ - $(\text{NANP})_6\text{P}_2\text{P}_{30}$	2	0.17
OM-197-FV- $(\text{NANP})_6\text{P}_2\text{P}_{30}$	9.4	0.78
OM-197-FV- $(\text{NANP})_6\text{P}_2\text{P}_{30}$ + OM-197-MP	17.4	1.45

\* n.d. non dosable en LAL car il s'agit d'une émulsion

- 5 Les produits de la série  $(\text{NANP})_6\text{P}_2\text{P}_{30}$  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 **EXEMPLE 4.2.**

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

#### 4.2.1. Expérience de prolifération

Des souris mâles C57/BL6 de 6 semaines sont sacrifiées par inhalation de CO<sub>2</sub>. 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

sont testés en triplicat et chaque microplaque comprend un contrôle négatif composé de milieu seul. Le volume final dans chaque puits est de 100  $\mu$ l.

100  $\mu$ l 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 CO<sub>2</sub>, saturée en humidité. La prolifération est déterminée par la mesure de l'oxydation d'un substrat chromogénique XTT (2,3-bis[2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide) dans les mitochondries des cellules vivantes.

A la fin de l'incubation, 50  $\mu$ l de la solution XTT substrat (1 mg/ml de XTT + phénazine méthosulfate à 0.008 mg/ml) sont ajoutés à chaque puits. Après 8 heures d'incubation à 37 °C sous 8 % de CO<sub>2</sub> 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  $\pm$  écart-type sous forme de courbe dose-réponse. Les valeurs du contrôle négatif composé de milieu DH (moyenne  $\pm$  écart type) sont également indiquées sous forme graphique.

A partir de la courbe dose réponse, 3 points particuliers de la courbe sont calculés :

Max : amplitude maximale de la courbe et sa concentration correspondante

EC50 : concentration correspondant au 50 % de l'amplitude maximale

Min : première concentration induisant une prolifération significative correspondant au blanc + 3 x écart-type

Les concentrations correspondant à l'EC50 et au min sont déterminées à partir des segments de droite reliant les différents points de la courbe.

Si la courbe n'atteint pas de maximum mais continue de monter pour la plus forte concentration testée, un signe « > » est placé avant les valeurs de « Max » et de « EC50 ».

Si la courbe ne descend pas au-dessous de la limite du blanc + 3 x écart-type la concentration minimale est donnée comme « < » la concentration la plus faible testée.



#### 4.2.2. Présentation des résultats

##### Prolifération des cellules souches de la moelle osseuse induite par des pseudodipeptides acylés porteurs d'un bras auxiliaire fonctionnalisé

5 La figure 70 présente l'activité de différents pseudodipeptides acylés et montre l'influence du bras auxiliaire fonctionnalisé sur la capacité à induire la prolifération des cellules souches de moelle de souris.

Certains pseudodipeptides acylés sont capables d'induire une prolifération supérieure à celle induite par le contrôle positif, composé de LPS de E. coli. La  
10 concentration minimale de produit capable d'induire une prolifération significative est plus importante que celle du contrôle positif. Cette concentration minimale de produit est fortement influencée par la fonctionnalité du bras auxiliaire.

La figure 71 présente l'activité des pseudodipeptides acylés couplés à une drogue. Cette activité démontre que malgré le couplage les composés conservent une partie  
15 de leur activité. Il n'a pas été possible de distinguer entre une activité intrinsèque ou une activité résultant du couplage de la liaison ester par les estérases intracellulaires. L'activité antivirale de ces produits tendrait à démontrer qu'une partie au moins des liaisons esters ont été clivées. Quel que soit le mécanisme, la conservation d'une activité biologique démontre tout l'intérêt de cette association ->  
20 activité antivirale + activité du produit.

Tableau résultat présentant l'induction de la prolifération des cellules souches de moelle par les différents pseudodipeptides acylés porteurs d'un bras auxiliaire fonctionnalisé répondant à la formule générale I :

Produits	Max Amplitude / conc. D.O. / µg/ml	EC50 Amplitude / conc. D.O. / µg/ml	Min Amplitude / conc. D.O. / µg/ml
Milieu DH (contrôle négatif)	0.67 ± 0.04		
LPS E. coli (contrôle positif)	1.72 / 16	1.19 / 1.2	0.80 / 0.06
OM-197-MC	1.75 / 64	1.21 / 19.4	0.80 / 1.25
OM-197-MC-MP	> 1.60 / > 160	> 1.13 / > 6.5	0.80 / 0.77
OM-197-FV6	1.52 / 50	1.10 / 5.7	0.80 / 1.60
OM-197-FV8	1.07 / 25	0.87 / 1.8	0.80 / 1.24
OM-197-MC-FV5	1.75 / 50	1.21 / 32.0	0.80 / 8.20
OM-197-MC-FV7	> 1.83 / > 100	> 1.25 / > 33.1	0.80 / 6.58
OM-197-MP-AC (R/S,R)	2.12 / 25	1.39 / 3.1	0.80 / 0.71
OM-197-MP-AC (S,R)	1.22 / 6.25	0.94 / 2.62	0.80 / 1.17
OM-197-MC-AC	1.62 / 50	1.15 / 31.0	0.80 / 0.92
OM-197-N'C2-MC-AC	0.75 / 1.56	0.71 / nd	0.80 / nd
OM-197-N'(C10-2OC8)-MC-AC	0.75 / 6.25	0.71 / nd	0.80 / nd
OM-197-MC-Succ	2.16 / 50	1.41 / 24.7	0.80 / 2.95
OM-197-Lys	1.56 / 25	1.11 / 3.3	< 0.86 / < 0.39
OM-197-AP	1.49 / 25	1.08 / 2.2	0.80 / 0.41
OM-197-Asp	1.22 / 25	0.94 / 5.0	0.80 / 1.89
OM-197-Asp-AC	1.33 / 50	0.10 / 2.8	0.80 / 1.27
OM-197-Lys-AC	> 2.02 / >50	>1.34 / >14.6	0.80 / 0.90
OM-197-MC-AC-Succ-AZT	1.08 / 12.5	0.87 / 3.3	0.80 / 2.11
OM-197-MC-AC-Succ-d4T	1.40 / 50	1.03 / 25.2	0.80 / 2.81
OM-197-MC-AC-Succ	> 1.65 / >100	> 1.16 / 33.7	0.80 / 2.04

nd = non déterminable

- 5 Tous les pseudodipeptides acylés de l'invention à part les composés avec des chaînes raccourcies sont capables d'induire une prolifération significative des cellules souche de moelle.



**EXEMPLE 4.3.*****Détermination de la production d'oxyde nitrique par des macrophages murins stimulés par les produits de l'invention*****4.3.1. Expérience de production d'oxyde nitrique :**

5 Des souris mâles C57/BL6 de 6 semaines sont sacrifiées par inhalation de CO<sub>2</sub>. 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  
10 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 Pétri qui sont incubées 8 jours à 37 °C sous 8 % de CO<sub>2</sub> dans une étuve saturée en  
15 humidité.

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

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.

25 100 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 CO<sub>2</sub>, saturée en humidité. A la fin de l'incubation avec les produits, 100 µl de surnageant sont prélevés et la concentration de nitrite est déterminée par la réaction de Griess.

100 µl de réactif de Griess (5mg/ml de sulfanilamide + 0,5mg/ml de chlorhydrate de  
30 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 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 en moyenne  $\pm$  écart type sous forme de courbe dose/réponse.

- 5 A partir de la courbe dose réponse, 3 points particuliers de la courbe sont calculés :
  - Max : amplitude maximale de la courbe et sa concentration correspondante
  - EC50 : concentration correspondant au 50 % de l'amplitude maximale
  - Min : première concentration induisant une prolifération significative correspondant au blanc + 3 \* écart-type
- 10 Les concentrations correspondant à l'EC50 et au min sont déterminées à partir des segments de droite reliant les différents points de la courbe.
 

Si la courbe n'atteint pas de maximum mais continue de monter pour la plus forte concentration testée, un signe « > » est placé avant les valeurs de « Max » et de « EC50 ».
- 15 Si la courbe ne descend pas au-dessous de la limite du blanc + 3 \* écart-type la concentration minimale est donnée comme « < » la concentration la plus faible testée.

#### 4.3.2. Présentation des résultats

##### 20 Production d'oxyde nitrique par les macrophages murins induite par des pseudodipeptides acylés porteurs d'un bras auxiliaire fonctionnalisé

La figure 72 présente l'activité de différents pseudodipeptides acylés et montre l'influence du bras auxiliaire fonctionnalisé sur la capacité à induire la prolifération des cellules souches de moelle de souris.

- 25 L'OM-197-MP-AC (R/S,R) est capable d'induire une prolifération supérieure à celle induite par le contrôle positif, composé de LPS de E. coli. La concentration minimale de produit capable d'induire une prolifération significative est néanmoins beaucoup plus importante que celle du contrôle positif. La production de NO par les macrophages murins stimulés par les pseudodipeptides acylés est fortement
- 30 influencée par la fonctionnalité du bras auxiliaire.

La figure 73 présente l'activité des pseudodipeptides acylés couplés à une drogue. Cette activité démontre que malgré le couplage les composés conservent une partie de leur activité. Il n'a pas été possible de distinguer entre une activité intrinsèque ou



une activité résultant du couplage de la liaison ester par les estérases intracellulaires. L'activité antivirale de ces produits tendrait à démontrer qu'une partie au moins des liaisons esters ont été clivées. Quel que soit le mécanisme, la conservation d'une activité biologique démontre tout l'intérêt de cette association ->

5 activité antivirale + activité du produit.

Tableau résultat présentant l'induction de la production d'oxyde nitrique par les macrophages murins par les différents pseudodipeptides acylés porteurs d'un bras auxiliaire fonctionnalisé répondant à la formule générale I :

Produits	Max Amplitude / conc. µM nitrite / µg/ml	EC50 Amplitude / conc. µM nitrite / µg/ml	Min Amplitude / conc. µM nitrite / µg/ml
Milieu DH (contrôle négatif)	0.29 ± 0.09		
LPS E. coli (contrôle positif)	> 10.37 / > 50	> 5.33 / > 0.01	< 1.41 / < 0.001
OM-197-MC	7.16 / 51	3.73 / 1.23	0.57 / 0.15
OM-197-MC-MP	7.94 / 51	4.12 / 1.18	0.57 / 0.11
OM-197-FV6	7.48 / 25.6	3.89 / 1.49	0.57 / 0.20
OM-197-FV8	8.00 / 51	4.15 / 7.89	0.57 / 1.45
OM-197-MC-FV5	5.64 / 16	2.97 / 2.56	0.57 / 0.67
OM-197-MC-FV7	6.17 / > 25.6	3.23 / > 3.70	0.57 / 0.36
OM-197-MP-AC (R/S,R)	> 14.09 / > 100	> 7.19 / > 10.69	0.57 / 1.04
OM-197-MP-AC (S,R)	7.56 / 40	3.93 / 3.28	0.57 / 0.59
OM-197-MP-AC (R,R)	> 8.31 / > 100	> 4.3 / > 15.32	0.57 / 3.35
OM-197-MC-AC	7.08 / 25	3.69 / 4.91	0.57 / 0.91
OM-197-N'C2-MC-AC	> 0.24 / 200	nd	nd
OM-197-N'(C10-2OC8)-MC-AC	> 0.96 / > 100	0.63 / 61.05	0.57 / 54.3
OM-197-MC-Succ	5.84 / 16	3.07 / 0.89	0.57 / 0.22
OM-197-Lys	5.50 / 40	2.90 / 2.23	0.57 / < 0.47
OM-197-AP	> 9.64 / > 100	> 4.97 / > 13.69	0.57 / 1.87
OM-197-Asp	8.26 / 51	4.28 / 0.95	0.57 / 0.086
OM-197-Asp-AC	> 7.97 / > 100	> 4.13 / > 7.04	0.57 / 2.00
OM-197-Lys-AC	> 7.04 / > 50	> 3.67 / > 11.06	0.57 / 1.46
OM-197-MC-AC-Succ-AZT	> 2.53 / > 100	> 1.41 / > 74.89	0.57 / 55.98
OM-197-MC-AC-Succ-d4T	4.17 / 12.5	2.23 / 1.15	0.57 / 0.56
OM-197-MC-AC-Succ	6.17 / > 16	3.23 / 0.72	0.57 / 0.28

10 nd = non déterminable

Tous les pseudodipeptides acylés de l'invention à part les composés avec des chaînes raccourcies (production marginale pour OM-197-N'(C10-2OC8)-MC-AC)

sont capables d'induire une production significative d'oxyde nitrique par les macrophages murins.

#### **EXEMPLE 4.4.**

##### **5 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 mesurés: l'incorporation du Dextran-FITC et l'expression des molécules de surface CD83, CD86.

10

##### **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 contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF), du GM-CSF et de l'IL-4 à 10 ng/ml à raison de  $1 \times 10^6$  cellules/ml. Les cellules sont distribuées dans des boîtes de Pétri à raison de  $10 \times 10^6$  cellules par boîte et cultivées pendant 6 jours avec un changement de milieu après 3 jours. Les cellules ainsi obtenues sont appelées cellules prédendritiques (DC-6). La maturation des cellules prédendritiques 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: l'expression des 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).

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 %.

30

Produits : les solutions mères de OM-197-MC, OM-197-FV6, et OM-197-MP-AC (R/S,R) 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, agités 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.

Dans une autre série d'expériences tous les pseudodipeptides acylés ont été lyophilisés et resolubilisés directement dans de l'eau apyrogène. Les différents produits ainsi que le LPS contrôle sont testés à la concentration de 10 µg/ml. Les résultats sont exprimés en % de cellules dendritiques et en moyenne de fluorescence pour la phagocytose du dextran ou l'expression du marqueur de surface CD86. Ces résultats représentent la moyenne de 2 à 6 expériences suivant les produits.

#### 4.4.2. Evaluation des résultats

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 différenciation DC-9.

Les résultats (Figure 74) 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-197-MP-AC (R/S,R) ne conservent respectivement que 15% et 22% de phagocytose, Il faut au moins 1 µg/ml d'OM-197-MP-AC (R/S,R) 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. 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 75 et 76 respectivement) 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

5 résultats corroborent parfaitement ceux obtenus à partir de la phagocytose. L'OM-197-MP-AC (R/S,R) 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 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

10 dendritiques.

Ces résultats montrent un comportement très différent pour les pseudodipeptides acylés en fonction de leur bras auxiliaire. L'OM-197-MP-AC (R/S,R) 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

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

Phagocytose du dextran marqué à la fluorescéine et expression du CD86 après stimulation des cellules prédendritiques (DC6) par les pseudodipeptides acylés porteurs d'un bras auxiliaire fonctionnalisé répondant à la formule générale I

20 Différenciation des cellules prédendritiques en cellules dendritiques matures.

Produit	Dextran % CD / Fluorescence	CD86 % CD / Fluorescence
37 °C	18.3 / 0.9	33.5 / 2.9
LPS E. coli	100 / 7.3	100 / 7.3
OM-197-FV6	84.5 / 6.3	62.9 / 4.9
OM-197-MC-FV5	86.5 / 6.4	74.5 / 5.6
OM-197-MP-AC (R/S,R)	84.6 / 6.3	80.0 / 6.0
OM-197-MC-AC	68.3 / 5.2	67.4 / 5.2
OM-197-MC-Succ	35.5 / 3.0	34.9 / 3.0
OM-197-Lys	12.1 / 0.5	21.2 / 2.1
OM-197-AP	56.1 / 4.4	62.0 / 4.8
OM-197-Asp	26.4 / 2.4	29.0 / 2.6
OM-197-Asp-AC	22.0 / 22.1	26.7 / 2.4
OM-197-Lys-AC	92.2 / 6.8	93.5 / 6.9
OM-197-MC-AC-Succ-AZT	62.2 / 4.8	81.4 / 6.1
OM-197-MC-AC-Succ-d4T	11.6 / 0.5	25.9 / 2.4



A la concentration de 10 µg/ml de nombreux pseudodipeptides acylés sont capables d'induire la différenciation des cellules prédendritiques en cellules dendritiques. La fonctionnalité portée par le bras auxiliaire module cette capacité à activer les cellules prédendritiques.

- 5 Le pseudodipeptide acylé OM-197-MC-AC-Succ-AZT couplés à une drogue présente une capacité significative à induire la différenciation en cellules dendritique. L'effet de la formulation des pseudodipeptides acylés est particulièrement important sur la capacité à induire la différenciation des cellules prédendritiques en cellules dendritiques. Certains produits présentent des activités très différentes suivant qu'ils  
10 ont été dissous en présence ou en absence de 0.1 % TEOA.

#### **EXEMPLE 4.5.**

##### ***Analyse de l'induction de la protéine MxA dans les cellules dendritiques***

La capacité des produits de l'invention à induire la production de la protéine antivirale MxA par des cellules pré-dendritiques a été évaluée. La production de MxA  
15 par les cellules a été mesurée après séparation électrophorétique SDS-PAGE par western blotting.

##### **4.5.1. Protocole expérimental**

Les cellules dendritiques au stade DC-6 obtenues comme décrit précédemment ont  
20 été stimulées ou pas avec IFN- $\alpha$  (500 U/ml), LPS (1 µg/ml), TRANCE (100 ng/ml), CD40L (1 µg/ml), OM-197-MP-AC (1 µg/ml) ou OM-197-FV6 (1 µg/ml) pendant 48 h. L'extraction et l'analyse des protéines a été effectuée comme suit: les cellules sont récupérées, puis lavées 3 fois avec du PBS (phosphate buffered saline) et lysées dans un tampon 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton-100  
25 contenant 1 mM PMSF (fluorure de phenylmethylsulfonyl) et 1 µg/ml pepstatine comme inhibiteurs de protéases. La lyse est effectuée à raison de 10<sup>6</sup> cellules pour 100 µl de tampon,  
5 fois concentré contenant 60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycérol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoéthanol et 0.1% bromophénol). Les échantillons sont chauffés à  
30 95°C pendant 5 min dans des tubes Ependorf fermés. L'électrophorèse est effectuée sur un minigel de 10 cm x 10 cm à 12% d'acrylamide avec une quantité d'échantillon

équivalant au même nombre de cellules. La migration est effectuée avec le tampon suivant: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3.

Transfert sur membrane: les protéines sont transférées du gel SDS-PAGE sur une membrane de nitrocellulose. (tampon de transfert : 25 mM Tris, 192 mM glycine, 5 20% méthanol, pH 8.3).

Incubation avec les anticorps: le transfert est vérifié par une coloration de la membrane au rouge Ponceau. Les sites non spécifiques sur la membrane sont bloqués avec 5% de lait écrémé dans TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) pendant 1 h à température ambiante. La membrane est incubée dans une solution de l'anticorps monoclonal anti-MxA (clone 143) dilué 1:100, (v/v) dans TBS-lait. La membrane est lavée 3 fois avec TBS-0.1% Tween 20. La membrane est incubée avec un second anticorps anti-souris couplé à la peroxydase (HRP, Sigma) dilué 1:1000, (v/v). La membrane est lavée 3 fois avec TBS-Tween. Les bandes contenant la MxA sont révélées après incubation de la membrane avec les réactifs de chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia). Dans ce système, HRP catalyse une réaction de chemiluminescence basée sur le luminol qu'on peut détecter sur un film.

#### 4.5.2. Résultats

Les DC-6 ont été stimulées pendant 0, 2h, 4h, 24h (Figure 77) ou 48 h (Figure 78) comme suit.

Echantillon	Essai: milieu de culture GMCSF/IL-4	Fig 77				Fig 78	Position dans le Western Blot
		0h	2h	4h	24h	48h	
1.	+ NaCl (ontrôle négatif)	1	2	3	4	1	
2.	+ LPS (1 µg/ml)		5	6	7	2	
3.	+ IFN-α (500 U/ml) (contrôle positif) pour l'induction de la protéine MxA		8	9	10	3	
4.	+ TRANCE (100 ng/ml)					4	
5.	+ CD40L (1 µg/ml)					5	
6.	+ OM-197-MP-AC (1 µg/ml)		1 1	1 2	13	6	
7.	+ OM-197-FV6 (1 µg/ml)		1 4	1 5	16	7	

Les western blots présentés dans les Figures 77 et 78 montrent la production de MxA au cours du temps: une augmentation significative de la protéine MxA est induite par les produits OM-197-AC5 et OM-197-FV6 après 24h (Fig 77) et



respectivement après 48h (Fig 78). Cette production de MxA est équivalente à celle induite par le contrôle positif LPS ou l'IFN $\alpha$ . Cette production est supérieure à celle induite respectivement par le contrôle négatif, le TRANCE (une cytokine de la famille du TNF- $\alpha$  qui induit aussi la maturation des cellules dendritiques) ou le CD40L (un  
5 autre agent maturant des cellules dendritiques)

Les composés selon l'invention OM-197-MP-AC et OM-197-FV6 montrent des propriétés antivirales par leur capacité à induire la protéine MxA.

#### **EXEMPLE 4.6.**

#### 10 ***Détermination de la capacité des composés selon l'invention à activer la production de TNF- $\alpha$ par les cellules mononucléaires du sang périphérique humain***

##### 4.6.1. Protocole

Les cellules mononucléaires du sang périphérique sont isolées à partir de "buffy  
15 coats" de donneurs sains. Les cellules des "buffy coats" sont remises en suspension et les cellules mononucléaires séparées par centrifugation sur un gradient de Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia). Les cellules mononucléaires purifiées sont resuspendues dans du milieu RPMI 1640 complété avec 10 % de SFV, des antibiotiques, du mercaptoéthanol et de la L-glutamine. La concentration cellulaire  
20 est ajustée à  $2 \times 10^6$  cellules vivantes par ml.

100  $\mu$ l de chacune des solutions de pseudodipeptides acylés porteurs d'un bras  
auxiliaire fonctionnalisé, dilués à 100, 10 ou 1  $\mu$ g/ml dans le milieu RPMI 1640, sont déposés dans la microplaque. Les conditions sont testées en trois exemplaires, et  
chaque microplaque comprend un témoin négatif composé de milieu seul. Les  
25 dilutions de LPS de *E. coli* (1 à 0.00001  $\mu$ g/ml) servent de témoin positif.

100  $\mu$ l de la suspension cellulaire sont ajoutés à chaque puits contenant les dilutions  
de produits ou des témoins. Les cellules sont incubées avec les produits pendant 18  
heures dans une étuve à 37 °C, saturée en humidité sous 5 % de CO<sub>2</sub>.

A la fin de l'incubation les microplaques sont centrifugées, et les surnageants sont  
30 assemblés et congelés à - 80 °C sous forme d'aliquot jusqu'au dosage par ELISA.

La concentration de TNF- $\alpha$  produite par les cellules mononucléaires est déterminée  
par ELISA chemiluminescent (kit R&D QuantiGlo # QTA00). Les surnageants dilués

4 x sont déposés dans chaque puits de la microplaque dans laquelle l'anticorps anti-TNF- $\alpha$  humain est lié. La microplaque est incubée 4 heures à température ambiante. Après lavage, l'anticorps anti-TNF $\alpha$  humain conjugué à la peroxydase est ajouté. Après une incubation de 2 heures et un lavage intensif, le substrat  
5 chemiluminescent est ajouté et la luminescence est lue au bout de 20 minutes. La concentration de TNF- $\alpha$  contenue dans les surnageant est déterminée par rapport à une courbe standard allant de 7000 à 0.7 pg/ml.

Les résultats sont exprimés en pg/ml de TNF- $\alpha$  produit. Les résultats présentés sont tirés d'une expérience représentative de l'activité des pseudopeptides acylés.

10

#### 4.6.2. Résultats

Production de TNF- $\alpha$  induite par les pseudopeptides acylés porteurs d'un bras auxiliaire fonctionnalisé répondant à la formule générale I par les cellules mononucléaires du sang périphérique.

Produit	100 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml
OM-197-MC	12	0	0
OM-197-MC-MP	72	0	0
OM-197-FV6	88	104	0
OM-197-FV8	252	100	12
OM-197-MC-FV5	116	104	0
OM-197-MC-FV7	76	80	0
OM-197-MP-AC (R/S,R)	160	156	244
OM-197-MP-AC (R,R)	84	88	0
OM-197-MP-AC (S,R)	80	124	488
OM-197-MC-AC	144	140	12
OM-197-N'C2-MC-AC	0	0	0
OM-197-N'(C10-2OC8)-MC-AC	0	0	0
OM-197-MC-Succ	176	96	0
OM-197-Lys	20	164	284
OM-197-AP	84	116	428
OM-197-Asp	80	28	0
OM-197-Asp-AC	132	172	20
OM-197-Lys-AC	256	184	232
OM-197-MC-AC-Succ-AZT	64	224	108
OM-197-MC-AC-Succ-d4T	52	40	0
OM-197-MC-AC-Succ	40	32	0

15 Le contrôle négatif composé de milieu RPMI induit une production de TNF- $\alpha$  de base en dessous de la limite de détection de 0.7 pg/ml.



Production de TNF- $\alpha$  induite par le LPS *E. coli* par les cellules mononucléaires du sang périphérique.

Produit	LPS <i>E. coli</i> en $\mu\text{g/ml}$					
	1	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	404	436	356	276	132	0

5 Le contrôle positif composé de LPS de *E. coli* induit une forte production de TNF- $\alpha$  même pour les concentrations les plus faibles testées.

La plus part des pseudodipeptides acylés induisent une production de TNF- $\alpha$  importante, même si cette production reste inférieure à celle induite par le contrôle positif. Il faut également des concentrations plus élevées que celle du LPS pour

10 induire une production significative de TNF- $\alpha$ .

Certains composés, OM-197-MC et OM-197-MC-MP induisent une production significative uniquement à la concentration de 100  $\mu\text{g/ml}$ .

La fonctionnalité amine est particulièrement intéressante pour l'induction de la production de TNF- $\alpha$ , d'une part en augmentant amplitude et en diminuant la

15 concentration minimale de produit nécessaire pour induire une réponse significative.

Les pseudodipeptides acylés à chaînes raccourcies OM197-N'(C2-MC-AC) et OM-197-N'(C10-2OC8)-MC-AC n'induisent pas du tout de production de TNF- $\alpha$  même à la concentration de 100  $\mu\text{g/ml}$ .

## 20 **EXEMPLE 4.7.**

***Détermination de la capacité des composés selon l'invention à inhiber la production de TNF- $\alpha$  par les cellules mononucléaires du sang périphérique humain, induite par le lipopolysaccharide d'*E. coli* (LPS)***

### 4.7.1. Protocole

25 Les cellules mononucléaires du sang périphérique sont isolées à partir de "buffy coats" de donneurs sains. Les cellules des "buffy coats" sont remises en suspension et les cellules mononucléaires séparées par centrifugation sur un gradient de Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia). Les cellules mononucléaires purifiées sont remises en suspension dans du milieu RPMI 1640 complété avec 10 % de SFV, des

antibiotiques, du mercaptoéthanol et de la L-glutamine. La concentration cellulaire est ajustée à  $2 \times 10^6$  cellules vivantes par ml.

L'inhibition par les produits est déterminée par une préincubation des produits avec les cellules mononucléaires, et l'ajout, après 1 heure, de dilutions en série de LPS  
5 induisant la production de TNF- $\alpha$ . La concentration inhibitrice des différents pseudodipeptides acylés porteurs d'un bras auxiliaire fonctionnalisés est de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Le LPS d'*E. coli* est dilué en série de 1 à 0.00001  $\mu\text{g/ml}$  (facteur de 10 x).

50  $\mu\text{l}$  de produits dilués à 10  $\mu\text{g/ml}$  dans le milieu RPMI 1640 sont déposés dans la microplaque. Chaque condition (produit à 10  $\mu\text{g/ml}$  + LPS d'*E. coli* dilué) est testée  
10 en triplicat et chaque microplaque comprend un témoin négatif composé de milieu seul. La détermination de la production de TNF- $\alpha$  induite par le LPS seul (sans inhibition) est obtenue en ajoutant les dilutions de LPS d'*E. coli* à du milieu RPMI.

100  $\mu\text{l}$  de la suspension cellulaire sont ajoutés à chaque puits contenant les dilutions de produits ou des contrôles. Les cellules sont incubées avec les produits pendant 1  
15 heure dans une étuve à 37 °C, saturée en humidité sous 5 % de CO<sub>2</sub>.

A la fin de la pré-incubation 50  $\mu\text{l}$  des dilutions en série de LPS d'*E. coli* sont ajoutés. L'incubation des cellules mononucléaires avec le produit et le LPS est poursuivie pendant 18 heures. A la fin de la stimulation des cellules les microplaques sont centrifugées, et les surnageants sont assemblés et congelés à - 80 °C sous forme  
20 d'aliquot jusqu'au dosage par ELISA.

La concentration de TNF- $\alpha$  produite par les cellules mononucléaires est déterminée par ELISA chemiluminescent (kit R&D QuantiGlo # QTA00). Les surnageants dilués 4 x sont déposés dans chaque puits de la microplaque dans laquelle l'anticorps anti-TNF- $\alpha$  humain est lié. La microplaque est incubée 4 heures à température  
25 ambiante. Après lavage, l'anticorps anti-TNF $\alpha$  humain conjugué à la peroxydase est ajouté. Après une incubation de 2 heures et un lavage intensif, le substrat chemiluminescent est ajouté et la luminescence est lue au bout de 20 minutes. La concentration de TNF- $\alpha$  contenue dans les surnageant est déterminée par rapport à une courbe standard allant de 7000 à 0.7  $\text{pg/ml}$ .

30 L'inhibition est caractérisée par la concentration de LPS d'*E. coli* qui en co-incubation avec les produits induit une production de 50 % de TNF- $\alpha$  par rapport au témoin incubé seulement avec le RPMI. Plus cette concentration est élevée et plus le produit est inhibiteur. Cette concentration est calculée à partir des valeurs



d'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  =  $100 - (\text{Production de TNF-}\alpha \text{ induite par le produit et le LPS}) / (\text{Production de TNF-}\alpha \text{ induit par le LPS seul}) * 100$ . A partir de ces données d'inhibition la concentration est extrapolée sur le segment de droite qui joint les 2 dilutions de LPS entourant l'inhibition de 50 %.

- 5 La capacité des produits à induire l'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  par le LPS est également caractérisée par l'inhibition maximale. La concentration de LPS correspondant à cette inhibition maximale (inhibition > 95 %) est également représentative du pouvoir inhibiteur des produits. Les résultats sont calculés à partir d'une expérience représentative contenant tous les produits.

10

#### 4.7.2. Résultats

Inhibition par des pseudodipeptides acylés porteurs d'un bras auxiliaire fonctionnalisé répondant à la formule générale I de la production de TNF- $\alpha$  induite sur des cellules mononucléaires humaines par le LPS.

Produit	Inhibition 50 % LPS en $\mu\text{g/ml}$	Inhibition max. en (%)	Inhibition max LPS en $\mu\text{g/ml}$
OM-197-MC	1	100	0.0043
OM-197-MC-MP	0.19	100	0.001
OM-197-FV6	> 1	100	0.014
OM-197-FV8	> 1	100	0.0033
OM-197-MC-FV5	> 1	100	0.016
OM-197-MC-FV7	>1	100	0.00035
OM-197-MP-AC (R/S,R)	> 1	100	0.00002
OM-197-MP-AC (R,R)	0.68	100	0.0013
OM-197-MP-AC (S,R)	> 1	100	0.00002
OM-197-MC-AC	0.88	100	0.00003
OM-197-N'C2-MC-AC	0.0003	100	0.00001
OM-197-N'(C10-2OC8)-MC-AC	0.0009	85	< 0.00001
OM-197-MC-Succ	1	100	0.018
OM-197-Lys	0.70	100	0.0055
OM-197-AP	> 1	100	0.016
OM-197-Asp	> 1	100	0.00036
OM-197-Asp-AC	0.29	100	0.0058
OM-197-Lys-AC	> 1	100	0.001
OM-197-MC-AC-Succ-AZT	0.45	100	0.0005
OM-197-MC-AC-Succ-d4T	0.64	100	0.00016
OM-197-MC-AC-Succ	> 1	100	0.044

Le contrôle négatif composé de milieu RPMI induit une production de TNF- $\alpha$  de base en dessous de la limite de détection de 0.7 pg/ml.

Tous les pseudodipeptides acylés sont capables d'induire une inhibition de la  
5 production de TNF- $\alpha$  induite par le LPS de E. coli. La concentration de produit  
nécessaire à cette inhibition est fonction de la fonctionnalité du bras auxiliaire et de  
la longueur des chaînes d'acide gras. Même les pseudodipeptides acylés couplés à  
une drogue par une liaison ester sont capables d'induire cette inhibition.

10

#### ***EXEMPLE 4.8.***

#### ***Détermination de la capacité des composés selon l'invention à activer la cytototoxicité des cellules NK contre des cellules cibles de la lignée K562.***

##### 4.8.1. Protocole

15 Les PBMCs ont été isolés à partir de buffy coats selon le protocole décrit  
précédemment dans l'exemple 4.6. Brièvement, après centrifugation sur Ficoll et 3  
lavages les PBMCs ont été distribués dans une plaque à 6 puits à raison  $3 \times 10^6$   
cellules/ml dans 3 ml de milieu RPMI contenant 10% FCS et incubés soit avec le  
milieu seul, soit stimulés avec IFN- $\gamma$  (1000 U/ml), LPS (1  $\mu$ g/ml), OM-197-AC5  
20 (1  $\mu$ g/ml), ou OM-197-FV6 (1  $\mu$ g/ml). Les cellules ont été incubées ainsi pendant  
24h. Les cellules K562 (lignée cellulaire humaine leucémique, ATCC #CCL 243,  
20110-2209 Manassas (VA), U.S.A.) sont maintenues en culture dans du milieu  
RPMI contenant 10% de FCS avec 2 passages par semaine.

Pour la mesure de la cytotoxicité les PBMC et les cellules K562 sont lavés 2 fois  
25 avec HBSS et resuspendus dans du milieu RPMI sans rouge de phénol contenant  
5% de FCS. Les PBMC sont répartis dans une plaque à 96 puits à fond rond de  
façon à obtenir les rapports PBMC : cibles de 20:1, 10:1, 5:1 dans un volume de  
50  $\mu$ l. On ajoute ensuite 5000 cellules K562 (cibles) par puits dans 50  $\mu$ l de RPMI  
sans rouge de phénol. Le volume final est de 100  $\mu$ l. La plaque est centrifugée pour  
30 favoriser le contact puis incubée à 37°C pendant 4 h.



La cytotoxicité est déterminée avec le kit CytoTox 96 non-radioactif basé sur la mesure de LDH libéré au cours de la lyse cellulaire (kit #G1780, lot #124100, Promega, Madison, WI) suivant le protocole du fournisseur.

Le pourcentage de cytotoxicité est calculé selon la formule ci-dessous :

5

$$\% \text{ de cytotoxicité} = \frac{\text{DO K562+PBMC} - \text{DO PBMC} - \text{DO K562 seules}}{\text{DO lyse total K562} - \text{DO K562 seules}} \times 100$$

10

#### 4.8.2. Résultats

Les composés OM-197-AC5 et OM-197-FV6 induisent une activité NK similaire ou légèrement inférieure à celle induite par le LPS testé à la même concentration (1 µg/ml).

Stimuli	rapport PBMC:K562	Absorbance à 490 nm		% cytotoxicité
		PBMC seuls	K562 + PBMC	
Milieu	20:1	0.141	1.5	0.5
	10:1	0.073	1.55	7.7
	5:1	0.055	1.4	0
IFN-γ	20:1	0.101	2.1	39.3
	10:1	0.064	1.9	29.4
	5:1	0.035	1.68	17.9
LPS	20:1	0.17	2.2	42
	10:1	0.122	1.9	26
	5:1	0.035	1.7	19
OM-197-MP-AC	20:1	0.084	1.8	22
	10:1	0.084	1.66	13.7
	5:1	0.027	1.5	7.4
OM-197-MC-FV6	20:1	0.11	2.1	38.8
	10:1	0.087	1.65	12.9
	5:1	0.079	1.4	0
Contrôles		Milieu de culture seul	K562 seules	lyse totale K562
Absorbance à 490 nm		0.408	1.35	3

15

**EXEMPLE 4.9.*****Détermination de la capacité des composés selon l'invention à induire la prolifération des lymphocytes de souris.***4.9.1. Description de l'expérience

- 5 Les cellules spléniques d'un groupe de 4 souris CBA naïves sont poolées, mises en culture en quadruplicat en l'absence ou en présence de l'adjuvant OM-197-MP-AC (0.1 à 10 µg/ml). La réponse proliférative de ces cellules est évaluée par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée (<sup>3</sup>H-TdR) après 1 ou 2 jours de culture. Les valeurs reportées dans le tableau représentent la moyenne arithmétique ± la
- 10 déviation standard de 4 cultures

Adjuvant: la solution mère de OM-197-MP-AC est préparée à 0.9 mg/ml dans de l'eau pour injection additionnée de 0.1 % triéthanolamine.

Résultats

- 15 Le produit OM-197-MP-AC stimule la prolifération des cellules spléniques *in vitro*. Cet effet, maximum après un jour de culture, augmente l'incorporation de thymidine par un facteur de 5 à la concentration de 1 µg/ml et de 12 à la concentration de 10 µg/ml. Après un jour de culture, le produit OM-197-MP-AC, à la concentration de 1 µg/ml, exerce un effet mitogène aussi puissant que la Concanavaline A à 5 µg/ml
- 20 (voir Tableau 1).

Tableau 1. Mesure de la réponse proliférative de cellules spléniques murines à l'adjuvant OM-197-MP-AC

Adjuvant		Incorporation de <sup>3</sup> H-TdR (CPM x 10 <sup>-3</sup> )	
		Durée de la culture (jours)	
		1	2
Pas d'adjuvant		6.4 ± 1.0	14.3 ± 0.8
OM-197-MP-AC (µg/ml)	0.1	8.7 ± 0.7	21.1 ± 1.3
	1.0	34.3 ± 2.6	55.6 ± 5.2
	10	79.0 ± 12.0	92.7 ± 8.8



Les valeurs reportées sur le tableau représentent la moyenne arithmétique  $\pm$  la déviation standard des mesures d'incorporation de cultures en quadruplicat. La Concanavaline A (5 $\mu$ g/ml), utilisée comme contrôle positif, donne une valeur d'incorporation de thymidine de  $37.5 \pm 6.2 \times 10^3$  CPM après un jour de culture.

5

**EXEMPLE 4.10.*****Détermination de l'activité antivirale des conjugués des composés selon l'invention à l'AZT et au d4T comme prodrogue.***10 **4.10.1. Protocole**

La lignée lymphocytaire T MT-4 immortalisée par une infection par HTLV, un virus qui provoque une forme de leucémie a été utilisée pour tester l'activité antivirale (anti-VIH) des composés selon l'invention conjugués à l'AZT et respectivement au d4T. Ces cellules ont la propriété de ne pas survivre à une infection par le VIH. Le test est basé sur la protection par le produit (comme l'AZT) contre cet effet dévastateur du virus.

Les produits sont testés par dilution sérielle du produit dans une plaque à 96 puits. Dans la partie supérieure de la microplaque, les produits testé à différentes concentrations avec des cellules et le virus (en triplicat), ce qui permet de déterminer la concentration de produit qui protège les cellules de l'effet dévastateur du virus. La concentration à laquelle nous observons une réduction de 50% du nombre de cellules vivantes est l'IC50 du produit. La quantification des cellules vivantes se fait avec le MTT, un composé tétrazolium jaune qui est réduit enzymatiquement (dans les mitochondries des cellules vivantes) vers un formazan qui est pourpre. Les puits qui contiennent des cellules en bon état ont une couleur pourpre, si les cellules sont mortes une coloration jaune persiste. La mesure de la densité optique (OD) permet de quantifier cet effet.

La cytotoxicité d'un produits est évaluée de la même façon dans la partie inférieure de la plaque où le test est effectué par dilution des produits incubés sur les cellules sans virus, ce qui permet de déterminer l'effet toxique des produits sur les cellules. Il est rapporté sous la forme d'un CC50, la concentration à laquelle 50% des cellules meurent par l'effet toxique du produit. La sélectivité (indice de sélectivité, SI) d'un

30

produit est définie comme CC50/IC50. Ce paramètre est important, un bon produit a un indice de sélectivité élevé.

#### 4.10.2. Résultats

- 5 Les produits selon l'invention conjugués à l'AZT (OM-197-MC-succ-AZT) ou au d4T possèdent des propriétés anti-virales contre le VIH 1 IIIB et le VIH 2 ROD. Résultats de deux expériences (en triplicat) sur les cellules MT-4:

produit	souche VIH	IC50 ( $\mu$ M)	CC50 ( $\mu$ M)
AZT	VIH-1 IIIB	0.0029	187
OM-197-MC-Succ-AZT	VIH-1 IIIB	0.0519	>94
D4T	VIH-1 IIIB	0.107	321
OM-197-MC-Succ-d4T	VIH-1 IIIB	0.963	+/-97
AZT	VIH-2 ROD	0.0018	187
OM-197-MC-Succ-AZT	VIH-2 ROD	0.061	>94
D4T	VIH-2 ROD	0.22	321
OM-197-MC-Succ-d4T	VIH-2 ROD	0.51	+/-97

- 10 Les composés selon l'invention conjugués avec l'AZT ou le d4T montrent des activités antivirales dans ce modèle de cellules MT-4. L'un des avantages de ces prodrogues réside dans la nature lipidique des conjugués qui permet d'une part le ciblage des composés vers les cellules infectées en libérant les composés anti-viraux dans les réservoirs à virus et d'autre part de moduler l'activité immunologique  
15 des cellules cibles.

#### **EXEMPLE 4.11.**

##### ***Détermination de la capacité des composés selon l'invention à activer la maturation des cellules pré-dendritiques de souris en cellules dendritiques.***

#### 20 4.11.1. Protocole

Obtention des cellules dendritiques: les fémurs et les tibias des souris (C57Bl/6, âge 8 à 10 semaines) ont été vidés de leur moelle. La suspension de moelle a été passée à travers un tamis cellulaire de 70  $\mu$ m de manière à obtenir une suspension



unicellulaire. Les cellules de moelle ont été resuspendues dans du milieu de Dulbecco modifié par Iscove (IMDM) complété avec 10% de serum foetal de veau (SVFi) inactivé par la chaleur et des antibiotiques. Les cellules ont été incubées toute la nuit à 37°C, sous CO<sub>2</sub> dans une étuve saturée en humidité, dans des  
5 microplaques de 6 puits. Le jour suivant (jour 0) les cellules non-adhérentes ont été collectées et lavées. Les cellules vivantes ont été comptées par exclusion de bleu de trypan. La concentration cellulaire a été ajustée à  $2 \times 10^5$  cellules/ml dans du IMDM contenant 20 ng/ml de GM-CSF murin recombinant (rmGM-CSF) et 20 ng/ml d'IL-4 murin recombinant (rmIL-4) et l'incubation a été poursuivie. Le 3<sup>ème</sup> jour du  
10 rmGM-CSF et du rmIL-4 frais, à une concentration de 10 ng/ml, ont été ajoutés. Le 6<sup>ème</sup> jour les cellules non-adhérentes ont été collectées, lavées, et comptées par exclusion de bleu de trypan. La concentration cellulaire a été ajustée à  $2 \times 10^5$  cellules/ml dans du IMDM contenant du rmGM-CSF et du rmIL-4 10 ng/ml, et l'incubation a été poursuivie. Le 8<sup>ème</sup> jour, les cellules non-adhérentes constituées de  
15 cellules dendritiques immatures et matures (CD-DM) ont été récoltées et utilisées pour l'incubation avec les produits.

Incubation avec les produits selon l'invention: les CD-DM ont été incubées à une concentration de  $5 \times 10^5$  cellules/ml dans des micro-plaques de 24 puits en présence des activateurs suivants : le contrôle positif LPS d'*Escherichia coli* 0111 :B4 à  
20 100 ng/ml ; le contrôle négatif IMDM ; ainsi que des 2 composés selon l'invention OM-197-MC-FV5 et l'OM-197-MP-AC aux concentrations de **0.1, 1 et 10 µg/ml**. Après 48h d'incubation, les cellules ont été collectées et conservées pour des analyses en cytométrie de flux.

Analyse par cytométrie de flux: Les CD-DM ont été lavées dans du PBS contenant  
25 2% de SVFi et 0.01% d'azide de sodium (Tampon FACS). Puis elles ont été incubées sur glace pendant 30 minutes avec des concentrations optimales en anti-CD86, anti-CD40, anti-MHCII conjugué au FITC, et anti-CD80 conjugué à la peroxidase. Ensuite les cellules ont été lavées 3 fois. Le marquage des anti-CD86 et anti-CD40 a été effectué par l'incubation des cellules sur glace pendant 30 minutes  
30 avec des anticorps d'âne anti-Ig de rat conjugué à la peroxydase. Après l'incubation, les cellules ont été lavées et resuspendues dans du tampon FACS. La fluorescence a été mesurée sur un cytomètre de flux FACScan<sup>TM</sup>. 15000 événements ont été

analysés par échantillon. Les cellules qui ont été incubées avec du conjugué seul ont servi de contrôle négatif.

#### 4.11.2 Résultats

##### 5 Expression des cellules

	µg/ml	Marqueurs de surface							
		CD40		CD80		CD86		MHCII	
		MFI	% cellules	MFI	% cellules	MFI	% cellules	MFI	% cellules
OM-197-MC-FV5	10	630	54	97	48	4097	51	1681	48
	1	517	44	84	45	3888	43	1691	43
	0.1	442	33	66	42	3437	37	1689	40
OM-197-MC-AC	10	605	55	97	53	4162	52	1622	49
	1	493	48	73	47	3791	45	1607	45
	0.1	446	34	66	41	3504	37	1597	38
LPS	0.1	539	51	95	51	3445	50	1546	51
Contrôle négatif	0	431	29	74	41	3011	34	1553	41

MFI: intensité de fluorescence moyenne

Les produits selon l'invention sont capable d'induire la maturation des cellules prédendritiques en cellules dendritiques. Ces résultats obtenus *in vitro* sont en accord avec les observations effectuées *in vivo* chez la souris.

- 10 *In vivo*, les traitements i.v. et s.c. d'OM-197-MP-AC, 20 µg et 5 µg respectivement par souris, induisent la maturation et la migration des cellules dendritiques dans la rate, de la zone marginale (située entre les pulpes rouge et blanche) vers la pulpe blanche, où sont localisées les cellules T. Les immuno-colorations des coupes histologiques de rates des animaux traités avec les produits selon l'invention
- 15 révellent la collocalisation des cellules dendritiques matures et des cellules T dans la pulpe blanche, comme avec le traitement par le LPS, alors que chez les animaux non traités, il n'y a ni migration, ni maturation observée.



## 5<sup>ème</sup> série d'exemples: étude pharmacologique des composés selon l'invention (*in vivo*)

### EXEMPLE 5.1.

#### 5 *Evaluation des propriétés de pseudodipeptides acylés portant un auxiliaire fonctionnalisé mélangé ou couplé au (NANP)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> dans un modèle d'immunisation de souris*

##### 5.1.1. Protocole expérimental

10

Antigène: le peptide (NANP)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> comprend la séquence répétée (NANP) de *Plasmodium falciparum* et deux séquences de la toxine tétanique (P<sub>2</sub>: 830-843 et P<sub>30</sub>: 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 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.

15

20 Adjuvants: les solutions mères des pseudodipeptides acylés (OM-197-MP, OM-197-FV6 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)<sub>n</sub>-(NANP)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> 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,

30

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

5 Immunisation: 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) <sub>6</sub> P <sub>2</sub> P <sub>30</sub>	6
3	IFA	+	(NANP) <sub>6</sub> P <sub>2</sub> P <sub>30</sub>	6
4	OM-197-FV6	+	(NANP) <sub>6</sub> P <sub>2</sub> P <sub>30</sub>	6
5	OM-197-MC	+	(NANP) <sub>6</sub> P <sub>2</sub> P <sub>30</sub>	6
6	(OM-197-FV) <sub>1,2,3</sub> -(NANP) <sub>6</sub> P <sub>2</sub> P <sub>30</sub>			6
7	OM-197-FV-(NANP) <sub>6</sub> P <sub>2</sub> P <sub>30</sub>			6
8	OM-197-MP + OM-197-FV-(NANP) <sub>6</sub> P <sub>2</sub> P <sub>30</sub>			6

Schéma d'immunisation et des prélèvements :

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

15

Prélèvements du sang :

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)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub>:

5 Le dosage des anticorps IgG dirigés spécifiquement contre l'antigène (NANP)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> 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)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub>. La saturation de la microplaque est effectuée  
10 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  
15 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  
20 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)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> déterminée par ELISA, est présentée graphiquement pour les souris ayant reçu deux immunisations  
30 (Figure 79).

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)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> 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)<sub>1,2,3</sub>-(NANP)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> n'améliore pas la réponse sérologique contre cet antigène. Le mélange de l'adjuvant OM-197-MP et du  
 5 monoconjugué OM-197-FV-(NANP)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> augmente de façon significative la réponse sérologique à cet antigène et dépasse les valeurs obtenues avec le contrôle positif constitué du mélange (NANP)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>P<sub>30</sub> + IFA.

Des résultats similaires sont obtenus lorsque la capture des anticorps est effectuée  
 10 par ELISA en utilisant comme antigène le peptide (NANP)<sub>6</sub>NA (Figure 80).

### **EXEMPLE 5.2.**

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

#### **5.2.1. Description de l'expérience**

Le but de cette étude est de comparer la réponse sérologique induite par l'injection  
 20 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 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
<b>A</b>	ovalbumine	-	200
<b>B</b>	ovalbumine	OM-197-MP	200
<b>C</b>	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 H<sub>2</sub>O + 0.01% thiomersal.

Groupe B: la solution mère du mélange antigène + adjuvant (ovalbumine + OM-197-  
5 MP) contient 125 µg/ml d'ovalbumine et 250 µg/ml de OM-197-MP dans H<sub>2</sub>O + 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 H<sub>2</sub>O+ 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 Immunitations: 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).

Dosage des immunoglobulines anti-ovalbumine: les immunoglobulines sériques  
20 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:  
25 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.

Après un second lavage, les IgG1, IgG2a et IgM spécifiques pour ovalbumine sont  
30 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<sup>ème</sup> 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 incubation de 20 minutes à température ambiante, la réaction est stoppée par l'ajout
- 10 de 100 µl de 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 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 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
- 20 individuels ont ensuite été corrigés selon le facteur de dilution correspondant (50, 200, ou 800 fois) et sont présentés dans les Figures 81, 82 et 83 : 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 souris, ceci quelque soit la sous-classe d'immunoglobuline analysée (IgG1, IgG2a, et
- 30 ovalbumine (Figure 84) 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.



**EXEMPLE 5.3.**

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

5.3.1. 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 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 :

GROUPES	Adjuvant-Antigène	Adjuvant (non lié)	Volume injecté
	H1N1 2.5 µg/animal/injection	50 µg/animal/injection	µl
<b>A</b>	H1N1	-	100
<b>B</b>	H1N1	OM-197-MP (50 µg)	100
<b>C</b>	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 H<sub>2</sub>O.

Groupe B: la solution mère H1N1 + OM-197-MP contient 25 µg/ml de H1N1 et 500 µg/ml de OM-197-MP dans H<sub>2</sub>O.

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 H<sub>2</sub>O).

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.

### 5.3.3. Injections et dosage des immunoglobulines anti-H1N1

Les injections ont eu lieu à jours 0 et 14. Les solutions sont administrées par voie  
5 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  
10 (*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  
15 a duré 45 minutes à 37°C.

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  
20 (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,  
25 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les  
absorbances sont mesurées à 490 nm avec un lecteur de plaques Bio Rad 3550.

### 30 5.3.4. Résultats

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 84: 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.

10

#### **EXEMPLE 5.4.**

##### ***Evaluation des propriétés de l'adjuvant OM-197-MP-AC dans un modèle murin d'immunisation par voie s.c. avec l'antigène de Leishmania LmCPb***

###### 15 5.4.1. Description de l'expérience

Des souris CBA reçoivent dans la queue une seule injection sous-cutanée (100 µl) de l'antigène du parasite *Leishmania* LmCPb (3 µg par souris) ± adjuvant. Deux groupes de 6 souris sont constitués qui reçoivent les traitements suivants: antigène seul (groupe témoin) et respectivement antigène + 50 µg d'OM-197-MP-AC

20 Onze jours après l'injection, les cellules des ganglions lymphatiques inguinaux et périaortiques (2 groupes de 3 souris) sont mises en culture en triplicat en présence de l'antigène purifié LmCPb ou de l'extrait total du parasite (amastigote). Au jour 4, du surnageant est prélevé et conservé à -20°C pour le dosage de l'IL-4 et de l'IFN-γ. Finalement, de la thymidine tritiée (<sup>3</sup>H-TdR) est ajoutée aux cultures pour la mesure  
25 de la prolifération.

Le dosage des cytokines se fait par sandwich-ELISA (kits OptEIA™ IFN-γ et IL-4, BD PharMingen, Basel, Switzerland) et la réponse proliférative est évaluée par mesure de l'incorporation de thymidine (<sup>3</sup>H-TdR). La mesure de l'incorporation de <sup>3</sup>H-TdR exprimées en CPM sous forme de moyenne arithmétique ± la déviation standard  
30 pools de 3 souris) et la concentration en IL-4 en pg/ml est donnée individuellement pour chaque pool de 3 souris sous forme de moyenne arithmétique de deux mesures (dosage des cytokines).

Antigène : la solution-mère de LmCPb est préparée à la concentration de 150 µg/ml dans PBS.

Adjuvants : la solution mère de OM-197-MP-AC est préparée à 0.9 mg/ml dans de l'eau pour injection additionnée de 0.1% triéthanolamine

- 5 Mélange antigène-adjuvant: La préparation d'adjuvant (4 volumes), préalablement ajustée à la concentration finale adéquate dans du PBS stérile, est mélangée juste avant l'injection avec la solution-mère d'antigène (1 volume).

#### 5.4.2. Résultats

- 10 Chez des souris CBA immunisées avec l'antigène de *Leishmania* LmCPb, une dose unique de 50 µg de l'adjuvant OM-197-MP-AC suffit à induire une augmentation (entre 2 et 6 fois) de la prolifération des cellules ganglionnaires mesurée *in vitro* en réponse à l'antigène purifié (0.6 à 15 µg/ml) ou à un extrait total de la forme amastigote du parasite (entre 2 et  $50 \times 10^6$ /ml). Ces résultats sont reportés dans le
- 15 Tableau 1. De plus, le traitement des souris avec l'OM-197-MP-AC fait apparaître dans le surnageant des cultures ganglionnaires stimulées par l'antigène parasitaire des quantités importantes d'IL-4 (voir Tableau 2), alors que la production d'IFN-γ n'est pas détectée (< 100 pg/ml).



Table 1. Réponse proliférative *in vitro* de lymphocytes ganglionnaires de souris CBA immunisées avec LmCPb: Effet de l'adjuvant OM-197-MP-AC seul ou en combinaison avec du CpG-DNA

Stimulant <i>in vitro</i>		Incorporation de thymidine tritiée (CPM)	
		Sans adjuvant	OM-197-MP-AC
Pas de stimulant		0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.1
LmCPb (µg/ml)	15	2.8 ± 0.8	7.0 ± 0.7
	5	1.6 ± 0.4	3.0 ± 1.1
	1.7	1.1 ± 0.3	1.9 ± 0.5
	0.6	0.9 ± 0.2	1.3 ± 0.5
Amastigotes (x10 <sup>-6</sup> /ml)	50	5.1 ± 1.4	32.6 ± 5.2
	17	2.8 ± 1.0	12.6 ± 2.5
	6	1.1 ± 0.6	5.3 ± 1.5
	2	0.9 ± 0.4	1.6 ± 0.3
Con A (µg/ml)	5	124.3 ± 48.9	208.5 ± 56.0

Les valeurs reportées dans le Tableau 1 représentent la moyenne arithmétique ± la déviation standard des mesures d'incorporation effectuées dans deux pools de ganglions lymphatiques (3 souris par pool; cultures de chaque pool en triplicat).

Table 2: Production d'IL-4 *in vitro* par des lymphocytes de souris CBA immunisées avec LmCPb: Effet de l'adjuvant OM-197-MP-AC seul ou en combinaison avec du CpG-DNA

Stimulant <i>in vitro</i>		Production d'IL-4 (pg/ml)	
		Sans adjuvant	OM-197-MP-AC
Pas de stimulant	a	< 8	< 8
	b	< 8	< 8
LmCPb µg/ml	15	a	< 8
	b	< 8	12
Amastigotes x 10 <sup>-6</sup> /ml	50	a	< 8
		b	< 8
	17	a	< 8
		b	< 8
Con A µg/ml	5	a	117
	b	168	103

Les valeurs reportées dans le tableau représentent la moyenne arithmétique de 2 mesures de cytokines effectuées dans des surnageants de 2 pools (a et b; 3 souris par pool) de cellules ganglionnaires cultivées en triplicat.

Conclusion

Le produit OM-197-MP-AC potentialise chez la souris CBA immunisée avec LmCPb (une protéase abondante dans la phase amastigote du parasite *Leishmania*) une réponse T spécifique évaluée *in vitro* par la mesure de la prolifération lymphocytaire.

- 5 De plus, cet adjuvant favorise le développement de lymphocytes anti-LmCPb sécrétant des quantités importantes d'IL-4

**EXEMPLE 5.5**

10 ***Evaluation dans un modèle d'immunisation de souris des propriétés de pseudodipeptides acylés portant un auxiliaire fonctionnalisés couplés ou mélangés à des peptides synthétiques de la protéine du circumsporozoite de Plasmodium yoelii (PyCS 252-260)***

Le but de cette expérience est d'évaluer la capacité du pseudodipeptide acylé porteur d'un bras auxiliaire greffé ou mélangé sur un peptide synthétique PyCS 252-  
15 260 de la protéine du circumsporozoite de *Plasmodium yoelii*, à induire une réponse immune cellulaire et humorale spécifique contre le peptide.

5.5.1. Protocole expérimental

Formulation des antigènes avec les adjuvants: le peptide synthétique PyCS 252-260 correspondant à un épitope T de la protéine du circumsporozoite de *Plasmodium*  
20 *yoelii* de séquence SYVPSAEQI (Tableau 1). Le **peptide 2** MR99B (SERSYVPSAEQI) a été obtenu par ajout des acides aminés SER sur le N-terminal et le **peptide 1** MR99A (KGGKGGKSERSYVPSAEQI) a été obtenu par ajout des acides aminés lysine-glycine-glycine attachés au N-terminal du peptide MR99B décrit précédemment. les peptides ont été obtenus par synthèse sur phase solide (F-  
25 moc, selon by Merrifield et Atherton (Atherton *et al.*, Bioorg. Chem. 8: 350-351. 1979) avec les réactifs et solvants provenant de Bachem Feinchemikalien (Buddendorf, Suisse), Novabiochem (Läufelfingen, Suisse) and Fluka (Buchs, Suisse). Les peptides ont été purifiés par HPLC sur phase inverse.

Les mono et poly-conjugués des peptides avec le pseudodipeptide acylé porteur  
30 d'un bras auxiliaire (OM-197-MC-FV) ont été obtenus comme décrit dans l'exemple 3.6 ([OM-197-MC-FV]<sub>n</sub>-peptide 1) et l'exemple 3.5 (OM-197-MC-FV-peptide 2). Les solutions finales stériles des peptides conjugués ont été lyophilisées.



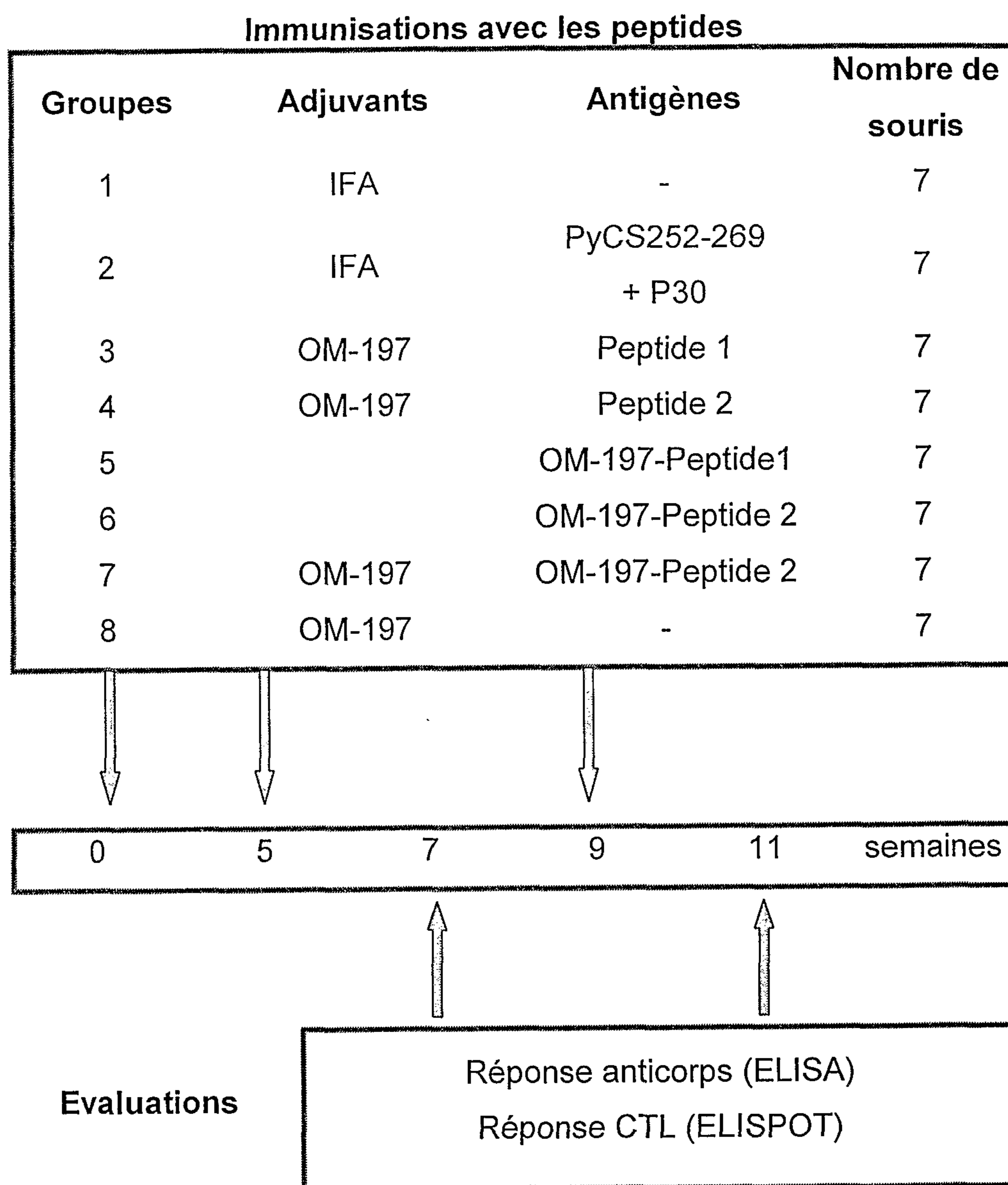
Immunitations des souris: la dose d'antigène correspond à 20 µg du peptide 2 par souris et par injection (Tableau 2). Avant l'injection, les préparations lyophilisées sont reprises avec NaCl 0.9%, vortexées 3 min and soumises à une sonnication de 10 min at 50°C. Les formulations avec IFA sont préparées par mélange d'un volume d'antigène (14.5 µg peptide PyCS 252-260 plus 50 µg de P30 (épitope T universel) dans le PBS) et d'un volume d'adjuvant.

Des souris BALB/c âgées de 4 semaines (Harlan, Zeist, NL) sont injectées sous-cutanées à la base de la queue. L'injection des formulations est effectuée avec des aiguilles 23" dans un volume finale de 50 µl. Les animaux reçoivent une seconde dose d'antigène au début de la 5<sup>ème</sup> semaine et une troisième injection au cours de la 9<sup>ème</sup> semaine.

Tableau 1. Antigènes

peptides synthétiques	séquences	masse moléculaire	Dose / injection (µg)
Peptide 1	KGGKGGKSERSYVPSAEQI	1978.2	29.0
Peptide 2	SERSYVPSAEQI	1365.5	20.0
PyCS 252-260	SYVPSAEQI	993.1	14.5

Tableau 2. Tableaux des groupes expérimentaux, des immunisations et des prélèvements



Prélèvements du sang et des organes lymphoïdes :

5 Obtention du sérum: des prélèvements de sang sont effectués sur toutes les souris après 7 et 11 semaines. Le sang est laissé reposer 60 min à 37°C, puis placé pendant une nuit à 4°C. Le sérum est ensuite congelé à -80°C jusqu'au dosage des anticorps.

10 Prélèvement des ganglions inguinaux et de la rate : deux animaux de chaque groupe sont sacrifiés après 7 et respectivement 11 semaines. Les ganglions inguinaux et la



rate sont prélevés chirurgicalement et les cellules mises en culture pour évaluation de l'activité CTL par ELISPOT (réponse Interferon- $\gamma$ ).

#### Détermination du titre d'anticorps anti-peptide 1:

Le dosage du titre d'anticorps dirigé spécifiquement contre le peptide 1 (KGGKGGKSERYSYVPSAEQI) 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 0.05 ml de PBS (*phosphate buffered saline*) contenant 0.001 mg de peptide 1. Les plaques sont lavées avec PBS-0.05% Tween 20 (Sigma, St-Louis, MO, .S.A.) (PBS-T) et la saturation de la microplaque est effectuée avec 5% de lait maigre dans le PBS-T pendant 1 h à température ambiante. Les sérums individuels (A, B, C, D, E, F, G) des souris prélevés aux temps 9 et 11 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 et la solution de dilution contenant l'anticorps polyclonal de chèvre anti-immunoglobuline de souris conjugué à la phosphatase alcaline (Sigma, Saint-Louis, MO, U.S.A.) 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, U.S.A.). L'absorbance à 405 nm est mesurée avec un lecteur de microplaque (Dynatech 25000 ELISA reader, Ashford, Middlesex, UK), chaque sérum est déterminé en duplicat. Les résultats présentés sont la moyenne des valeurs obtenues pour les souris de chaque groupe. Le titre d'anticorps est déterminé par la dernière dilution induisant une réponse positive significative, c'est-à-dire avec une valeur de densité optique supérieure à la valeur du bruit de fond additionnée de 3 écart-types.

#### Dosages ELISPOT – interféron- $\gamma$ :

Les anticorps spécifiques anti-interféron- $\gamma$  de souris (O1E703B2) sont fixés par incubation pendant une nuit à 4 °C en chambre humide, d'une solution d'anticorps à 50  $\mu$ g/ml dans une microplaque ELISPOT dont le fond des puits est couvert de nitrocellulose (Millipore, Molsheim, F),. L'étape de saturation est effectuée par ajout de DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY, U.S.A.) contenant 10% de sérum de veau foetal (FCS, Fakola, CH) pendant 2 heures à 37°C. Les cellules obtenues à



partir des organes lymphoïdes (ganglions inguinaux et rate) sont mises en culture dans les microplaques à 200'000 ou 400'000 cellules par puits, puis co-cultivées pendant 24h à 37°C avec 100'000 cellules présentatrices d'antigène (préalablement pulsées avec le peptide PyCS 252-260 à 37°C pendant 1h et irradiées (10 K rads) et lavées 3 fois) ou en présence de Concanavaline A comme contrôle. Après l'incubation, les cellules sont éliminées et après lavage, un second anticorps anti-IFN- $\gamma$  de souris biotinylé (ANI, 2  $\mu$ g/ml dans PBS avec 1% BSA) est ajouté pendant 2 h. La streptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim, Mannheim, RFA) diluée 1:1000 est ajoutée et incubée 1 h à 37°C, 3 lavages sont effectués avec du PBS contenant 0.05% de Tween 20, suivi par 3 lavages avec du PBS. La présence des complexes immuns anti-IFN- $\gamma$  est mise en évidence par l'ajout du substrat BCIP/NBT (Sigma, St-Louis, MO, U.S.A.). La réaction est arrêtée par lavage à l'eau courante. Les spots positifs à l'IFN- $\gamma$  sont alors comptés au moyen d'un lecteur automatique Biosys GmbH (Karben, Allemagne). Les spots spécifiques correspondent à la différence entre le nombre de spots comptés en présence des cellules pulsées avec le peptide et le nombre de spots comptés en l'absence de peptide. Les résultats représentés sont la moyenne des valeurs obtenues pour les souris de chaque groupe. Ils sont exprimés en nombre de spots par million de cellules mises en culture.

## 20 Résultats

La réponse humorale est présentée dans la Figure 85 (2 semaines après la seconde injection) et dans la Figure 86 (2 semaines après la 3<sup>ème</sup> injection). Après 2 immunisations, les réponses positives sont observées dans 5 sur les 7 animaux du groupe 5 (animaux ayant été immunisés avec le peptide 1 conjugué par un bras auxiliaire à 4 unités de pseudodipeptide acylé). Dans ce groupe, le pourcentage de souris répondeuses augmente avec la 3<sup>ème</sup> injection puisque les souris B et D montrent un titre d'anticorps significatif, mais bas. Le groupe 3 immunisé avec le même peptide mélangé avec le même adjuvant ne produit pas de titre d'anticorps significatif. Une réponse émergente est observée après 3 immunisations dans le groupe 7 (monoconjugué avec le peptide 2 complété par l'adjuvant OM-197 libre). Les autres groupes ayant reçu le peptide court ou aucun peptide ne montrent pas de réponse anticorps.



En conclusion, le tetraconjugué OM-197-peptide 2 est capable d'induire une réponse anti-corps dans toutes les souris immunisées avec un titre moyen à bas.

L'évaluation de l'activité cellulaire est déterminée par la fréquence des CTL, sécrétant de l'interféron- $\gamma$ , spécifiques à l'épitope PyCS 252-260. Les résultats sont présentés dans le tableau 3. Le contrôle positif est représenté par le groupe 2 et le contrôle négatif représenté par les adjuvants seuls (groupe 1 et 8). Le contrôle de la stimulation des cellules par la Concanavaline A est positif pour toutes les souris.

Les groupes 5 (tetra-conjugué) et 7 (monoconjugué + adjuvant) montrent des réponses CTL positives.

10 En conclusion, le peptide conjugué à 4 molécules de pseudodipeptide acylé (OM-197-peptide 1) est efficace alors que le monoconjugué (OM-197-peptide 2) n'induit pas de CTL. Par contre le monoconjugué complété avec l'OM-197 libre induit des CTL, alors qu'il n'induit pas la production d'anticorps, ce qui est probablement dû à la petite taille du peptide 2 (12 acides aminés).

15 Tableau 3: Réponse CTL au peptide PyCS 252-260

Groupe	Adjuvant ... Antigène	Nombre de CTL par million de cellules spléniques			
		après 2 <sup>ème</sup> injection		après 3 <sup>ème</sup> injection	
1	IFA (adjuvant incomplet de Freund)	0.0	± 0.0	0.2	± 0.2
2	IFA + PyCS 252-260 + P30	36.9	± 2.7	4.4	± 6.2
3	OM-197 + Peptide 1	0.0	± 0.0	0.7	± 1.0
4	OM-197 + Peptide 2	0.0	± 0.0	0.0	± 0.0
5	OM-197-Peptide 1	11.3	± 12.4	36.9	± 25.6
6	OM-197-Peptide 2	0.0	± 0.0	0.6	± 0.9
7	OM-197 + OM-197-Peptide 2	28.8	± 7.1	20.0	± 14.1
8	OM-197	0.0	± 0.0	0.6	± 0.9

**EXEMPLE 5.6*****Evaluation de la pyrogénicité des pseudodipeptides acylés dans le modèle du lapin.***

Le but de cette expérience est de déterminer la plus forte concentration de pseudodipeptide acylé porteur d'un bras auxiliaire greffé qui n'induit pas de fièvre chez un lapin injecté i.v..

**Protocole :**

15 lapins (New Zealand White Rabbits) ont été répartis dans les groupes suivants:

- Groupe 1: 1.0 mg/kg
- 10 Groupe 2: 0.1 mg/kg
- Groupe 3: 0.01 mg/kg
- Groupe 4: 0.001 mg/kg
- Groupe 5: eau pour injection

Le jour du test les lapins sont pesés et immobilisés dans des boîtes prévues à cet effet. Des sondes à températures sont introduites dans leur rectum.

1 heure après l'introduction des sondes les températures (préinjections) sont enregistrées pendant 90 minutes et la moyenne est déterminée.

Chaque lapin reçoit ensuite une injection i.v. de produit ou du contrôle (eau stérile à 0.9% NaCl) via la veine de l'oreille marginale (latérale). La température est mesurée chaque 30 minutes pendant 3 heures. La différence entre la moyenne de préinjection et la température maximum est calculée et reportée.

Pour 3 lapins par groupe le test est considéré comme non pyrogène si la somme des 3 réponses ne dépasse pas 1.15 °C, et pyrogène si la somme dépasse 2.65 °C. Si la valeur obtenue se situe entre deux, le test est refait avec 3 lapins supplémentaires.



Résultat :

Les résultats du test de pyrogénicité des composés OM-197-MC-MP et OM-197-MC-Asp sont présentés ci-après:

OM-197-MC-MP dose	réponse en °C moyenne (valeurs individuelles)	résultats
1 mg/kg	3.40 (1.50,0.60,1.30)	pyrogène
0.1 mg/kg	2.00 (1.45,0.05,0.50)	non pyrogène(1 valeur élevée)
0.01mg/kg	0.65 (0.00,0.45,0.20)	non pyrogène
0.001mg/kg	0.35 (0.10,0.05,0.20)	non pyrogène
contrôle	0.20 (0.20,0.00,0.00)	non pyrogène

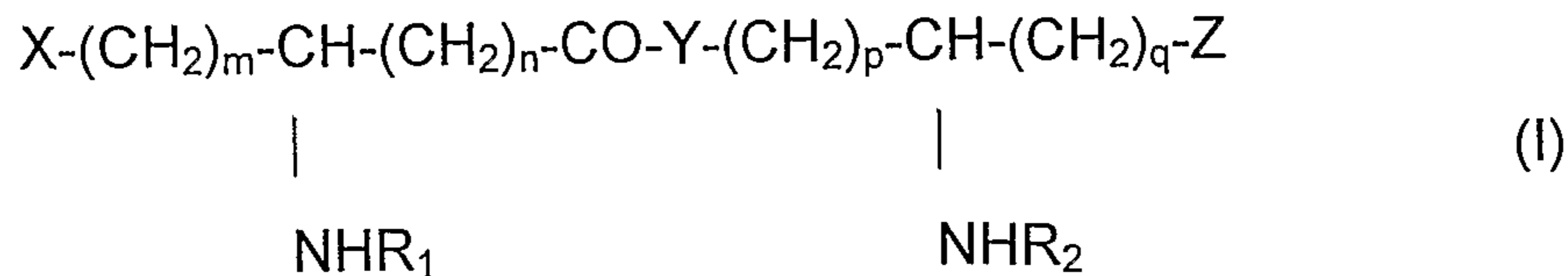
OM-197-MC-Asp dose	réponse en °C moyenne (valeurs individuelles)	résultats
1 mg/kg	3.25 (1.25,1.45,0.55)	pyrogène
0.1 mg/kg	2.85 (1.10,1.20,0.55)	pyrogène
0.01mg/kg	0.35 (0.20,0.15,0.00)	non pyrogène
0.001mg/kg	0.25 (0.00,0.10,0.15)	non pyrogène
contrôle	0.40 (0.25,0.05,0.10)	non pyrogène

5

Les composés selon l'invention ne sont pas pyrogènes aux doses inférieures à 0.1 mg/kg.

## REVENDICATIONS

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



10

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  
15 en  $C_1 - C_{24}$ ) 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

$Y$  représente O ou NH,

20 X et Z représentent un bras auxiliaire fonctionnalisé ou un groupe acide sous  
forme neutre ou chargée choisi parmi les groupements suivants :

-carboxyle

-carboxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]

-carboxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]

-phosphono [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]

25

-phosphono [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]

-dihydroxyphosphoryloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]

-dihydroxyphosphoryloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]

-dihydroxyphosphoryloxy

-hydroxysulfonyloxy

30

-hydroxysulfonyl [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]

-hydroxysulfonyl [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]

-hydroxysulfonyloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]

-hydroxysulfonyloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]



-[carboxy(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]aminocarbonyle  
 -[dicarboxy(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]aminocarbonyle  
 -[ammonio(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]aminocarbonyle  
 -{carboxy[amino(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]}aminocarbonyle

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

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

15 le descripteur s prend une valeur variant de 1 à 10

W est choisi parmi les groupements :

-formyle

-acétyle

-cyano

20 -halogéno

-amino

-bromo ou iodo-acétamido

-acylamido

.-diacylimido

25 -sulfhydrile

-alkylthio

-hydroxyle

-1,2-dihydroxyéthyle

-alkoxy

30 -acyloxy

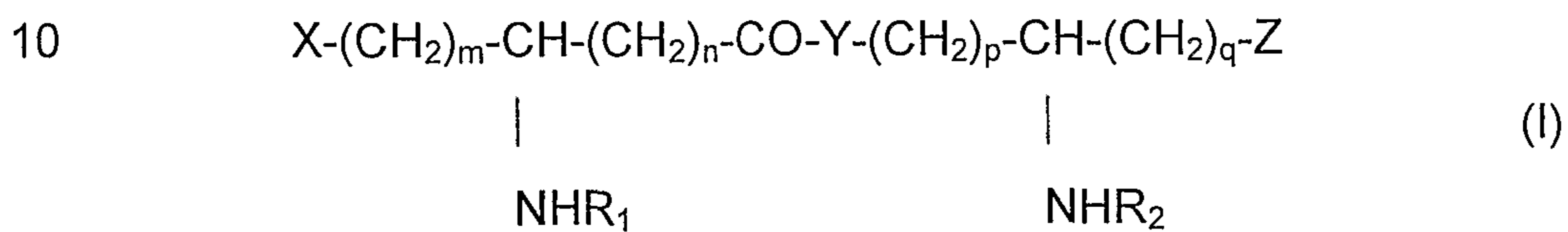
-vinyle

-éthynyle

-carboxyle libre

- carboxyle sous forme d'ester, d'anhydride mixte, d'amide ou d'hydrazide
- azido
- thiocyano

- 5 3. Nouveaux 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.



- 15 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  $m$ ,  $n$  prennent une valeur variant de 0 à 10

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

- 20 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,

- 25 le groupe acide X ou Z est choisi de préférence parmi les groupements :

- carboxyle
- carboxy [( $C_1-C_5$ )alkoxy]
- carboxy [( $C_1-C_5$ )alkylthio]
- phosphono [( $C_1-C_5$ )alkoxy]
- 30 -phosphono [( $C_1-C_5$ )alkylthio]
- dihydroxyphosphoryloxy [( $C_1-C_5$ )alkoxy]
- dihydroxyphosphoryloxy
- hydroxysulfonyloxy



- hydroxysulfonyl [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]
- hydroxysulfonyl [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]
- hydroxysulfonyloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy]
- hydroxysulfonyloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio]

5 et le bras auxiliaire fonctionnalisé en X ou en Z est défini comme précédemment à l'exception du radical 1,2-dihydroxyéthyle.

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

5. Un composé selon la revendication 1 ou 2 dans lequel, dans le cas où X ou Z est un groupe acide sous forme chargée, il s'agit de la forme carboxylique,  
15 sulfonique, phosphonique ou phosphorique salifiée, notamment par addition d'une base minérale ou organique, de préférence thérapeutiquement compatible.

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

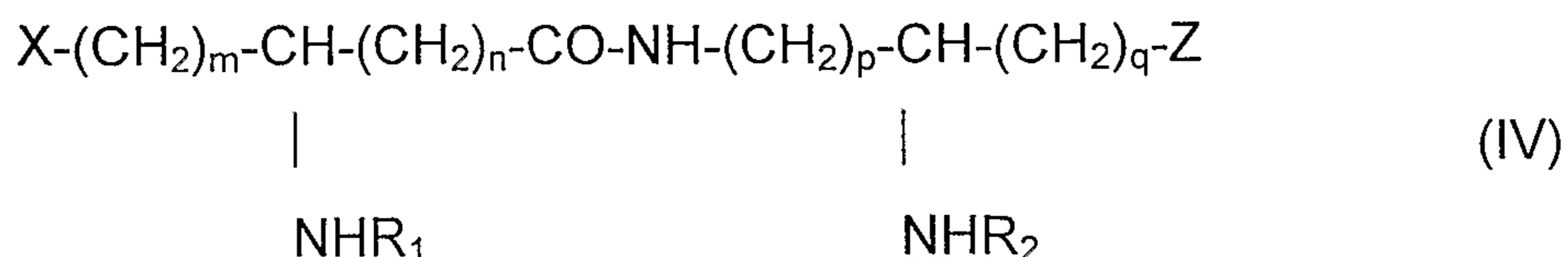


le descripteur s prend une valeur variant de 1 à 10, et en particulier 4, 5 ou 6 et W est choisi parmi les groupements :

- formyle
- amino
- 25 -hydroxyle
- 1,2-dihydroxyéthyle
- et carboxyle.

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

151



- 5 dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> 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 C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>) thio
- 10 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 un des substituants X ou Z est une fonction acide choisie parmi les groupes carboxyle, dihydroxyphosphoryloxy ou un groupe carboxy[(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkoxy], carboxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylthio], [carboxy(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]aminocarbonyle, [dicarboxy(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]aminocarbonyle et {carboxy[amino(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]}aminocarbonyle et dans laquelle l'autre substituant est un radical acyloxy choisi parmi les groupes 6-aminohexanoyloxy, 6-oxohexanoyloxy, 6-hydroxyhexanoyloxy, 6,7-dihydroxyheptanoyloxy et 3-carboxypropanoyloxy.
- 15
- 20 8. Les composés selon l'une des revendications 1 à 7, choisis 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
  - 25 - le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxy-tétradécanoylamino]-décan-1,10-diol-1-dihydrogénophosphate 10-(6,7-dihydroxyheptanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique,
  - le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-(6-oxohexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique,
  - 30 - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique, α-N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide 5-O-(6, 7-



dihydroxyheptanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique

- l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide 5-O-(6-oxohexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 5 - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide 5-O-(6-hydroxyhexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 10 - le (3RS,9R)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogéné-phosphate 10-(6-aminohexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- le (3R,9R)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogéné-phosphate 10-(6-aminohexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 15 - le (3S,9R)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogéné-phosphate 10-(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-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogéné-phosphate 10-(6-hydroxyhexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 20 - 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 - le (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) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- le (2S,8R)-1-(carboxyméthyl)thio-2-[(R)-3-tétradécanoyloxytétradécanoylamino]-3-oxo-4-aza-8-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]nonan-9-ol 9-O-(7-amino-heptanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 30

- le (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) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 5 - le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-1,10-diol-1-dihydrogénophosphate 10-(6-bromoacetamidohexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- le (3RS, 9R)-3-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-décane-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-O-(6-oxohexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 10 - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 15 - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-succinylamidohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-glycinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 20 - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-succinyloxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 25 - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide  $\beta$ -N-(3-aminopropyl)amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1-carboxy-5-aminopentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- 30



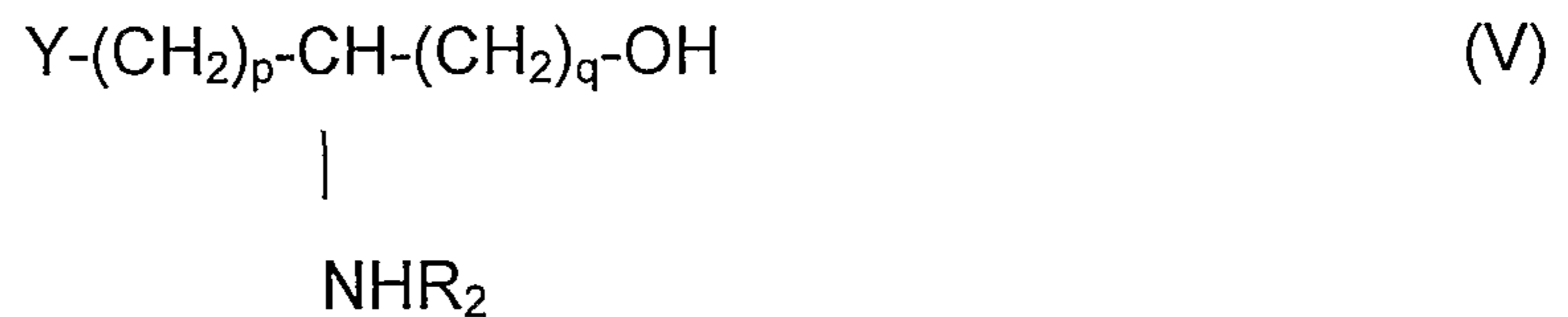
- l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1-carboxy-5-aminopentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
  - 5 - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1,2-dicarboxyethyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
  - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1,2-dicarboxyethyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
  - 10 - l'acide N-acétyl-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
  - 15 - l'acide N-(2-décanoyloxyoctanoyl)-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique.
- 20 9. Les composés selon les revendications 1 à 7 de formule générale I choisis dans le groupe formé par:
- l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
  - 25 - le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol-1-dihydrogénophosphate 10-(6,7-dihydroxyheptanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
  - le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate 10-(6-oxohexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
  - 30 - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]pentyl]amide 5-O-(6, 7-

- dihydroxyheptanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
- l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-hydroxy-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide 5-O-(6-oxohexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
  - les (3RS, 9R), (3R, 9R) et (3S, 9R)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogène-phosphate 10-(6-aminohexanoate) et leurs sels d'addition avec une base minérale ou organique
  - le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogène-phosphate 10-(6-hydroxyhexanoate) et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
  - 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
  - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
  - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
  - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1-carboxy-5-aminopentyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique
  - l'acide N-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyl]-D-aspartique,  $\alpha$ -N-[(4R)-5-(6-aminohexanoyloxy)-4-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] pentyl]amide  $\beta$ -N-[(1S)-1,2-dicarboxyethyl]amide et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique.
10. Procédé d'obtention des pseudodipeptides N-acylés de formule générale I 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



bras 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  $\omega$  d'un acide aminé  $\omega$ -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, en ce qu'on libère la fonction amine en position (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 alcool ou amino terminale pour obtenir l'amino alcool fonctionnalisé de formule générale V

10



15

dans laquelle Y représente HO ou  $NH_2$ ,

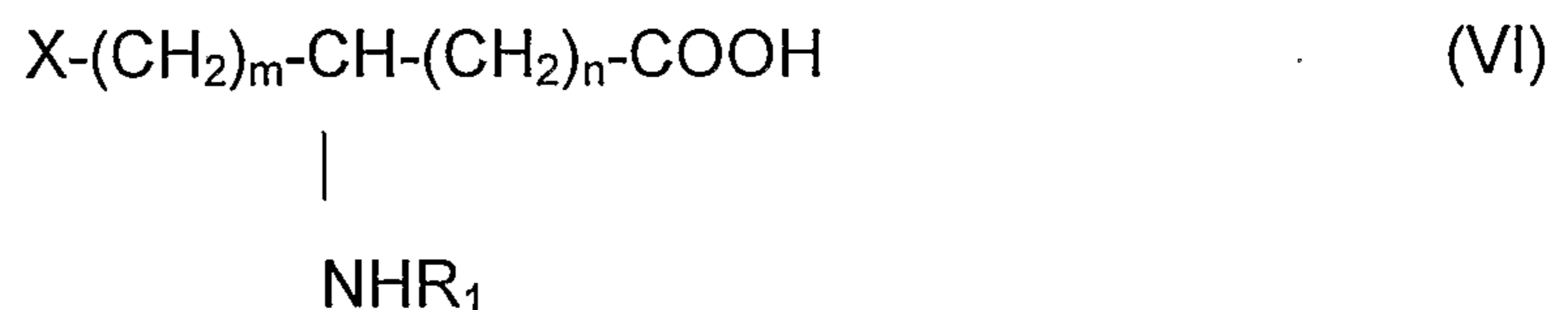
$R_2$  représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus,

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

20

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

25



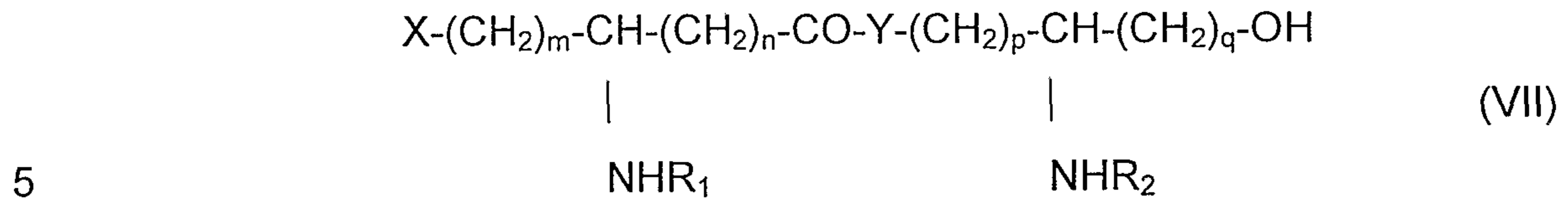
dans laquelle  $R_1$  est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme précédemment,

30

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 libre ou estérifiée,

pour former le pseudodipeptide de formule générale VII

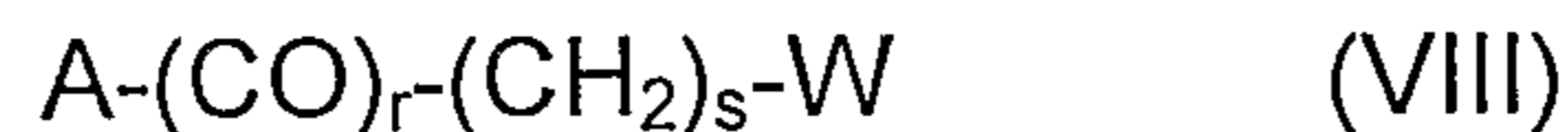


5

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,

10



15

dans laquelle A est un groupe partant, une fonction OH, SH ou  $\text{NH}_2$

le descripteur  $r$  est 1 ou 0

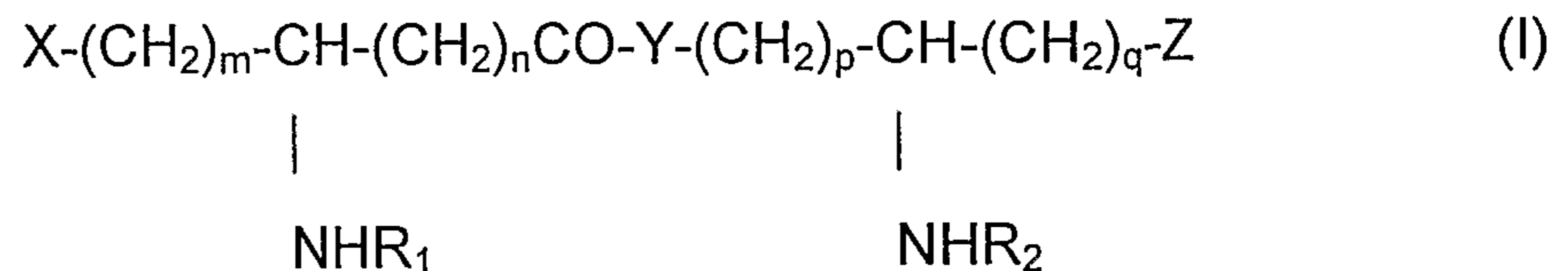
le descripteur  $s$  varie de 1 à 10 et de préférence entre 2 et 6,

W est choisi parmi les groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -amino, -bromo- ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -sulfhydryle, -alkylthio, -hydroxyle, -1,2-dihydroxyéthyle, -acyloxy, -vinyle, -éthynyle, -carboxyle

20

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 processus de déprotection, de façon à obtenir le dérivé de formule générale I

25



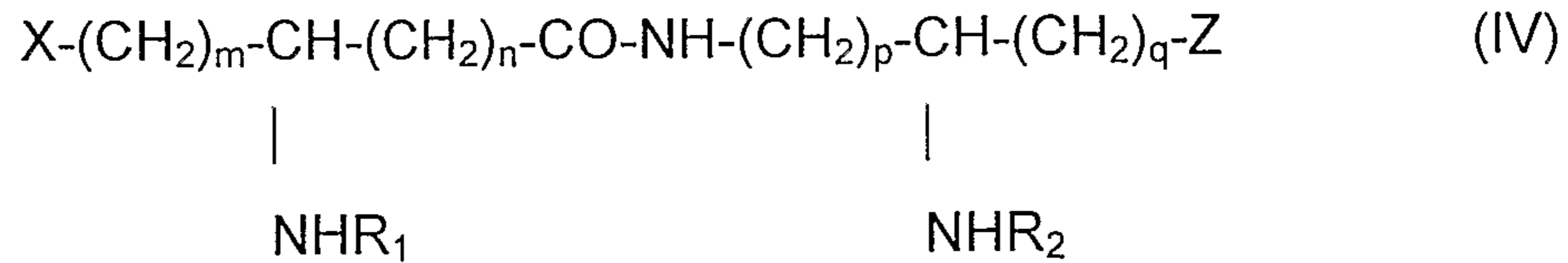
30

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

11. Procédé d'obtention des pseudodipeptides acylés selon la revendication 10, de formule générale IV



158



5 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 (alkyl en  $C_1-C_{24}$ ) thio

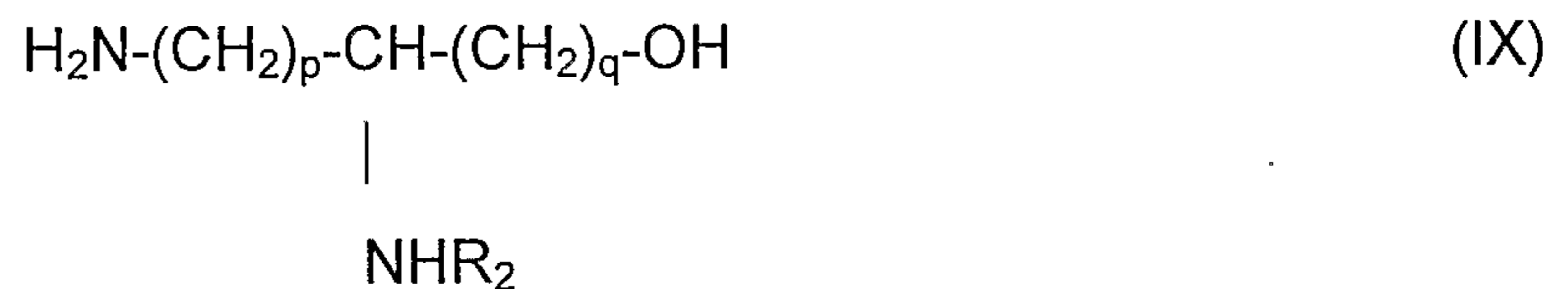
10 les descripteurs  $m$ ,  $p$  et  $q$  prennent une valeur allant de 1 à 10

le descripteur  $n$  prend une valeur allant de 0 à 10

dans laquelle  $X$  et  $Z$  représentent chacun un groupement acide, sous forme neutre ou chargée, ou un bras auxiliaire fonctionnalisé

15 caractérisé en ce qu'on bloque les fonctions amine en position  $(q+1)$  et en  $\omega$  d'un acide diaminé de formule  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_p\text{CHNH}_2(\text{CH}_2)_{q-1}\text{COOH}$  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

20 d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule  $\text{R}_2\text{OH}$  dans laquelle  $\text{R}_2$  est défini comme précédemment, puis libère la fonction amine terminale par hydrogénolyse pour obtenir l' amino alcool de formule générale IX



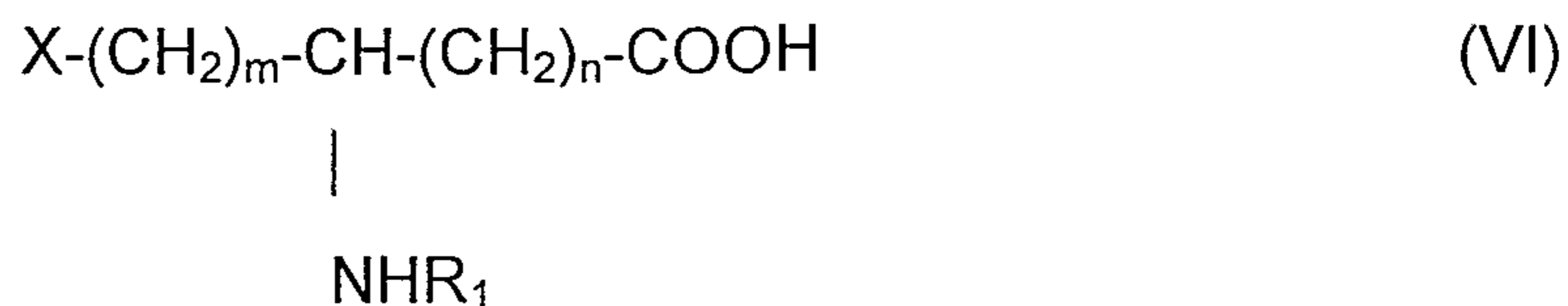
25

dans laquelle  $\text{R}_2$  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,

30  $p$  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  $\omega$ -hydroxylé de formule générale VI

159



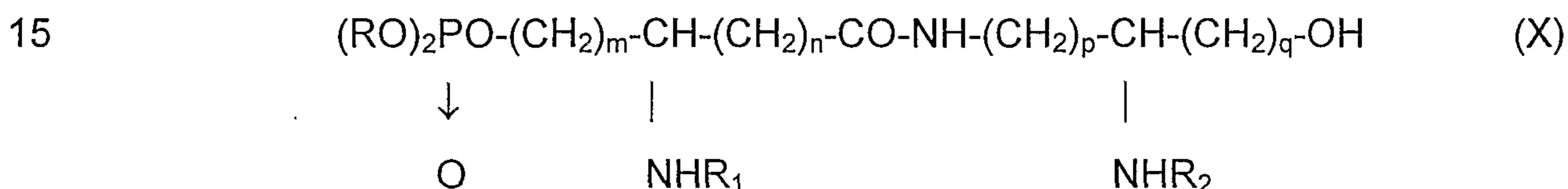
5 dans laquelle  $R_1$  est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants

m est un nombre entier variant de 1 à 10

n est un nombre entier variant de 0 à 10

10 et X est un groupe dialkyloxy- ou diaryloxy-phosphoryloxy de formule  $(\text{RO})_2\text{P-O}$   
 $\downarrow$   
 O

pour former le pseudodipeptide phosphorylé de formule générale X



15 dans laquelle les substituants  $R_1$ ,  $R_2$  et les descripteurs m, n, p et q sont définis  
 20 comme précédemment, et R est un radical 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,



25 dans laquelle A est un groupe partant, une fonction OH, SH ou  $\text{NH}_2$

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

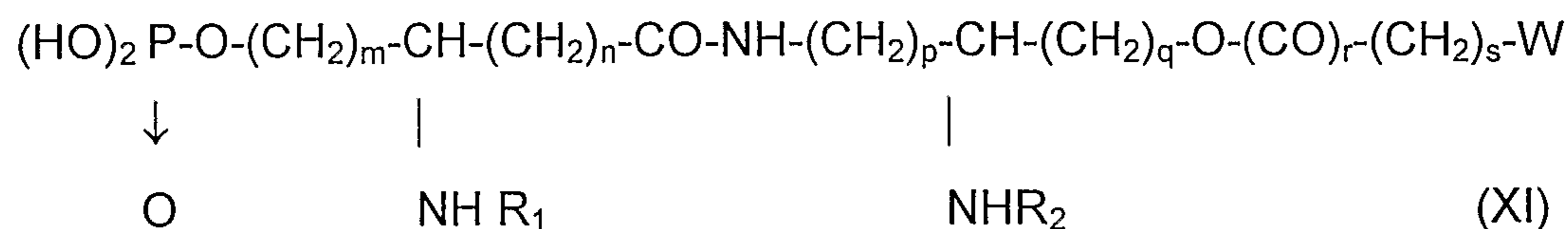
30 W est choisi parmi les groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -amino, -bromo- ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -sulfhydryle, -alkylthio, -hydroxyle, -1,2-dihydroxyéthyle, -acyloxy, -vinyle, -éthynyle, -carboxyle



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

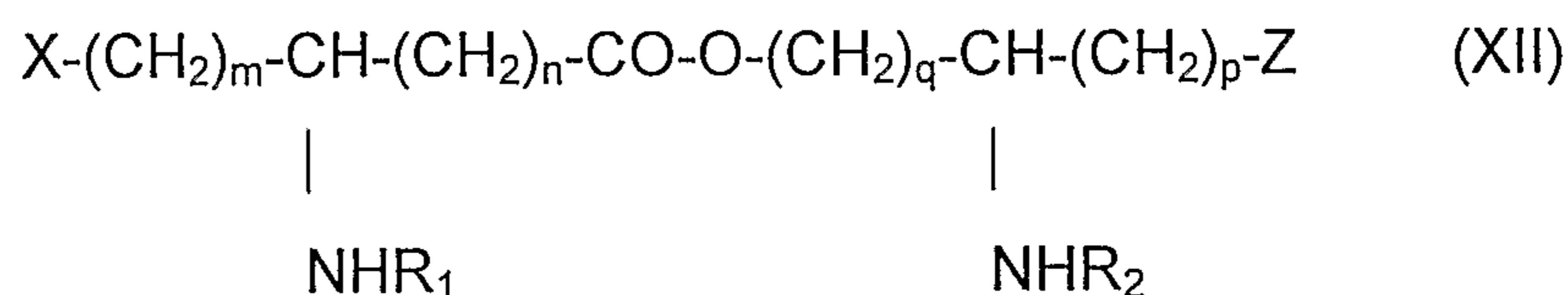
5 obtenir le dérivé de formule générale XI



10

dans laquelle les substituants W, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, m, n, p, q, r, s ont les significations fournies antérieurement.

15 12. Procédé d'obtention des pseudodipeptides selon la revendication 10 de formule générale XII



20

dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> 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 C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>) thio

25

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

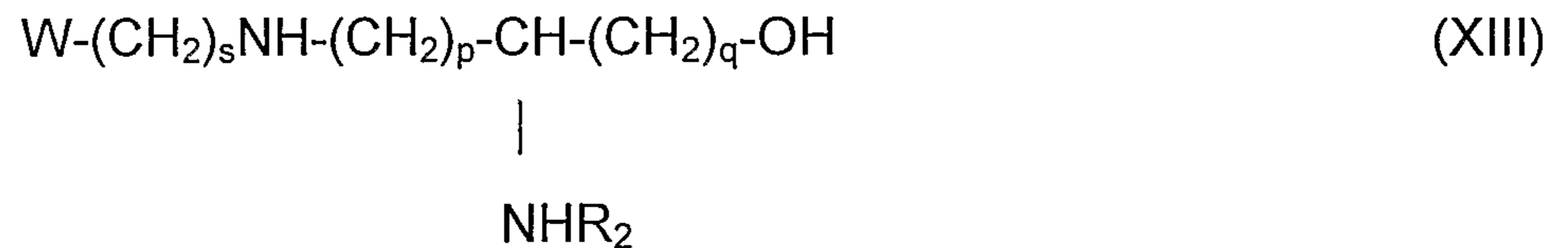
le descripteur n prend une valeur allant de 0 à 10

dans laquelle X et Z représentent chacun un groupement acide ou un bras 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 H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>CHNH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>q-1</sub>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 R<sub>2</sub>OH dans laquelle R<sub>2</sub> est défini comme précédemment, libère la fonction amine terminale par hydrogénéolyse puis alkyle la fonction amine avec un agent d'alkylation pour  
5 obtenir l'amino alcool de formule générale XIII



10

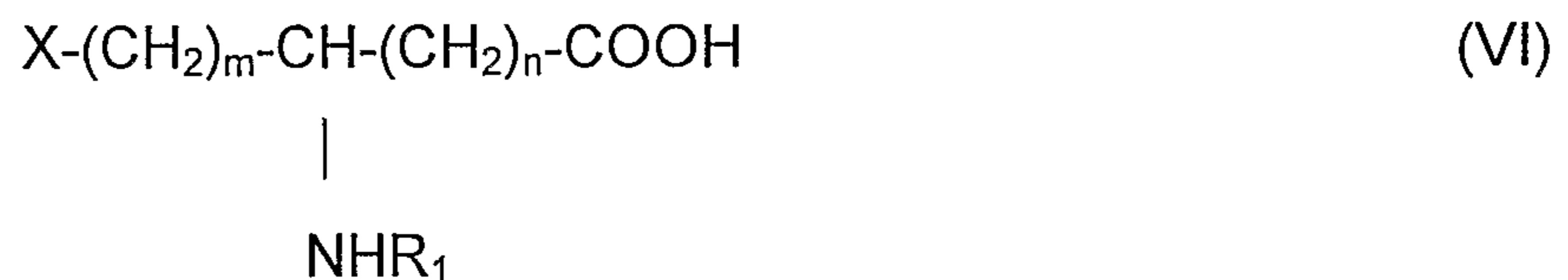
dans laquelle R<sub>2</sub> représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus,

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

15

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



20

dans laquelle R<sub>1</sub> 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  
25 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)<sub>2</sub> P-O

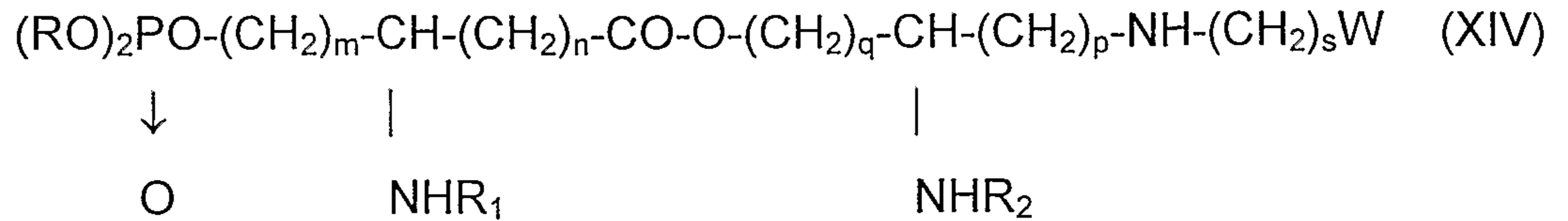
30



pour former le pseudodipeptide de formule générale XIV



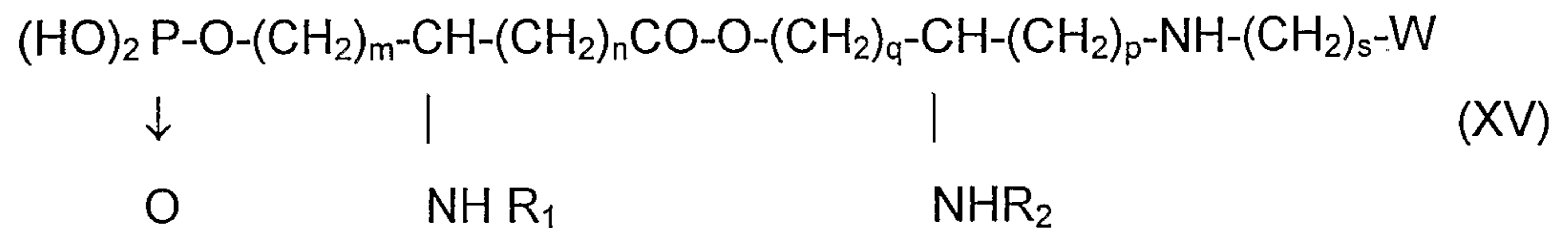
162



5 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 hydrogénolyse,

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

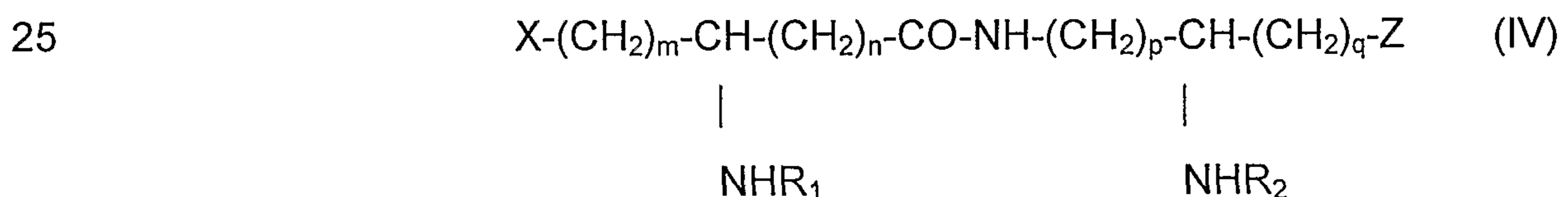
10



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

$W$  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  
 20 d'hydrazide, -azido, -thiocyano ou leurs précurseurs.

13. Procédé d'obtention selon la revendication 10, des carboxypseudodipeptides de formule générale IV

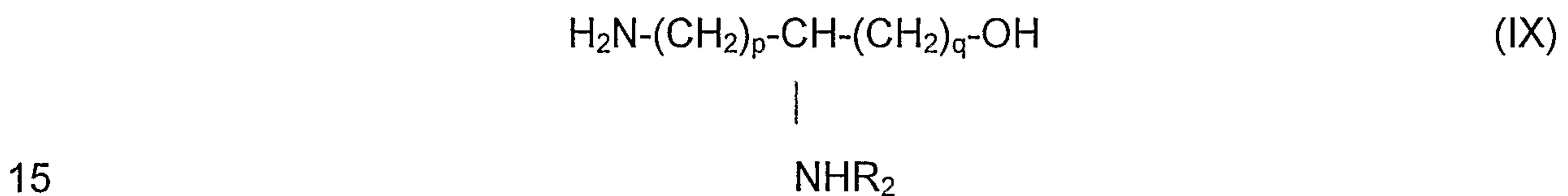


dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou  
 30 ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy,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

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

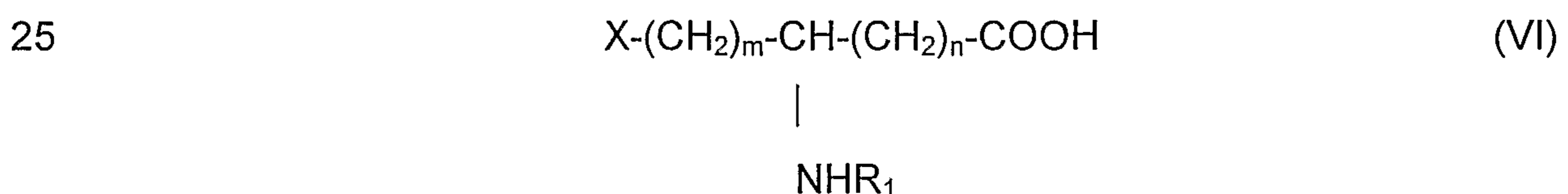
le descripteur n prend une valeur allant de 0 à 10  
dans laquelle X et Z représentent chacun un groupement acide ou un bras  
auxiliaire fonctionnalisé

qui consiste en ce qu'on bloque les fonctions amine en position (q+1) et en  $\omega$   
5 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 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  $R_2OH$  dans laquelle  
10  $R_2$  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,

20 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'acide aminé  $\omega$ -carboxylique de  
formule générale VI



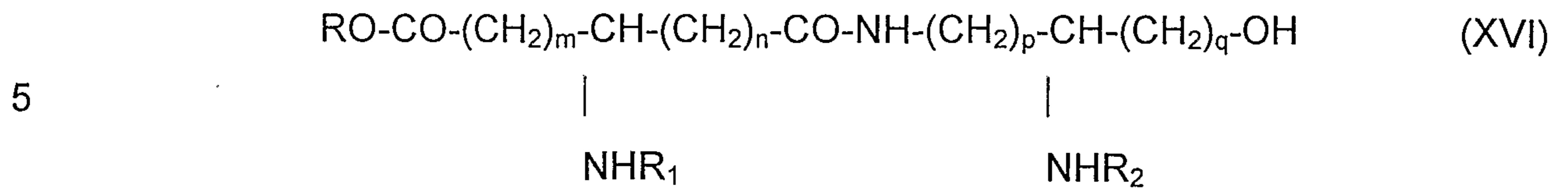
30 dans laquelle  $R_1$  est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à  
24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou  
plusieurs substituants

m est un nombre entier variant de 1 à 10

n est un nombre entier variant de 0 à 10



et X est un radical RO-CO- dans lequel R est un groupement alkyle pour former le pseudodipeptide de formule générale XVI

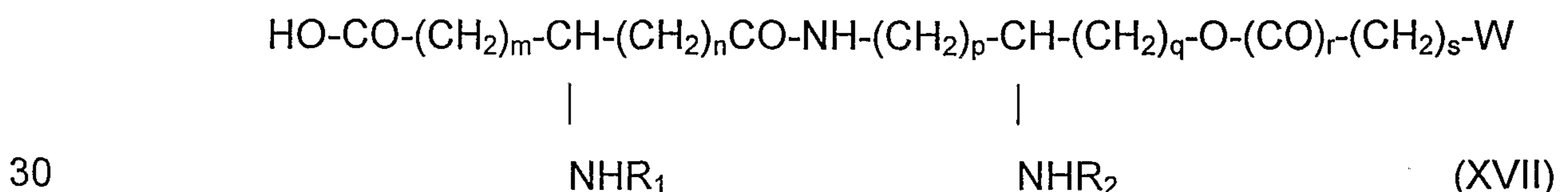


dans laquelle les substituants  $R_1$ ,  $R_2$  et les descripteurs  $m$ ,  $n$ ,  $p$  et  $q$  sont définis comme précédemment, et R est un groupe labile par hydrogénolyse, dont on peut -si désiré- substituer, alkyler ou acyler la fonction alcool terminal libre par un réactif de substitution, d'alkylation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



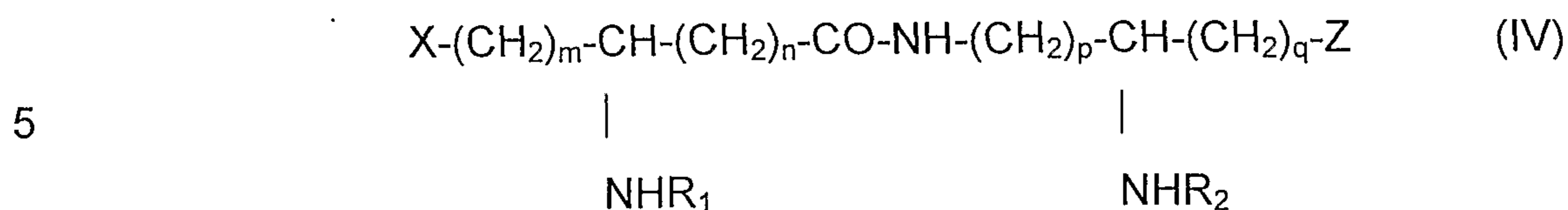
dans laquelle A est un groupe partant, une fonction OH, SH ou  $\text{NH}_2$   
 le descripteur  $r$  est 1 ou 0  
 le descripteur  $s$  varie de 1 à 10, et de préférence de 2 à 6

W est choisi parmi les groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -amino, -bromo- ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -sulfhydryle, -alkylthio, -hydroxyle, -1,2-dihydroxyéthyle, -acyloxy, -vinyle, -éthynyle, -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 on le soumet à un processus de déprotection et notamment à une hydrogénation catalytique de façon à obtenir le dérivé de formule générale XVII



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

14. Procédé d'obtention de pseudodipeptides selon la revendication 10, de formule générale IV



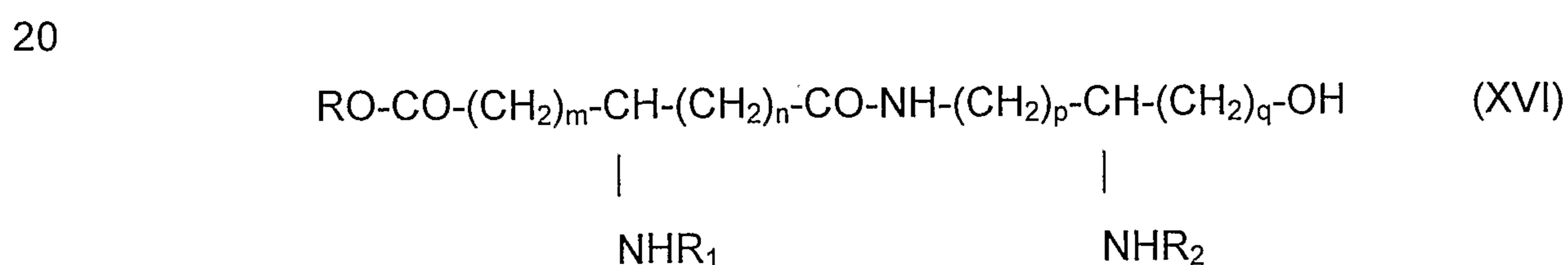
dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino,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

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

qui consiste en ce que l'on bloque la fonction hydroxyle libre d'un 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 hydrogénéolyse, avec un groupe protecteur labile par acidolyse, libère la fonction carboxyle présente sous forme d'ester, soumet cette fonction carboxylique éventuellement sous forme activée à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool primaire correspondant, convertit cette fonction alcool en ester phosphorique par traitement avec un agent de phosphorylation, libère la fonction hydroxyle protégée par traitement avec un acide, puis la soumet à une réaction de substitution, d'acylation ou d'alkylation avec un réactif de formule générale VIII





A pouvant être un groupe partant, une fonction OH, SH ou NH<sub>2</sub>

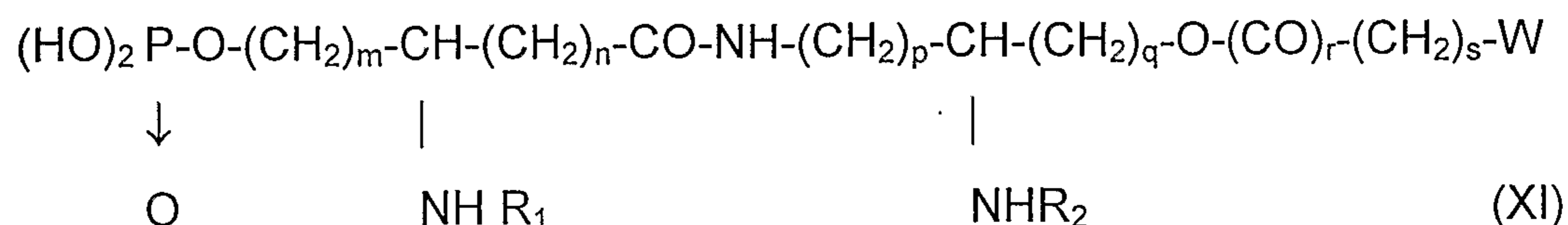
5 le descripteur r est 1 ou 0

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

10 W est choisi parmi l'un des groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -amino, -bromo- ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -sulfhydryle, -alkylthio, -hydroxyle, -1,2-dihydroxyéthyle, -acyloxy, -vinyle, -ethynyle, -carboxyle libre ou présent sous forme d'ester ou d'un autre dérivé

si nécessaire en présence d'un agent de couplage, et le produit ainsi formé est déprotégé, par hydrogénolyse, de façon à obtenir le produit de formule générale XI

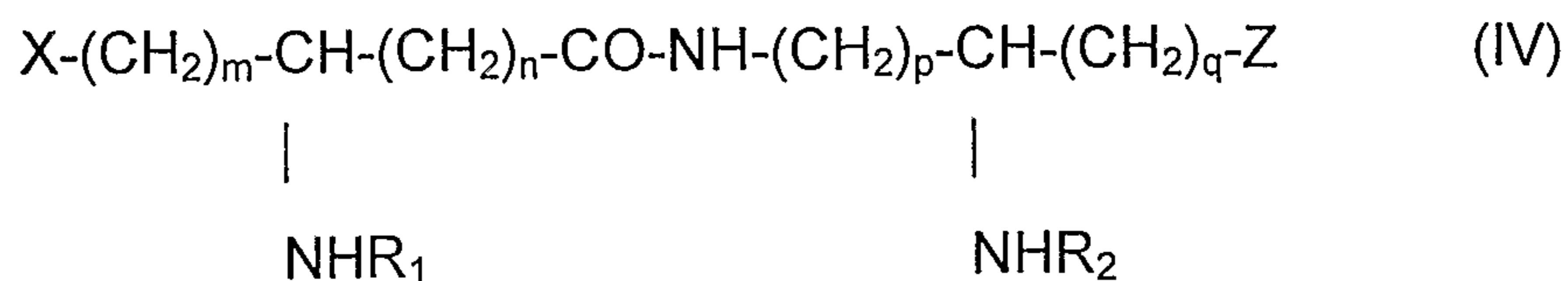
15



20 dans laquelle les substituants W, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, m, n, p, q, r, s ont les significations fournies antérieurement.

15. Procédé d'obtention de phosphodipeptides selon la revendication 10, de formule générale IV

25



30 dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> 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 C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>) thio

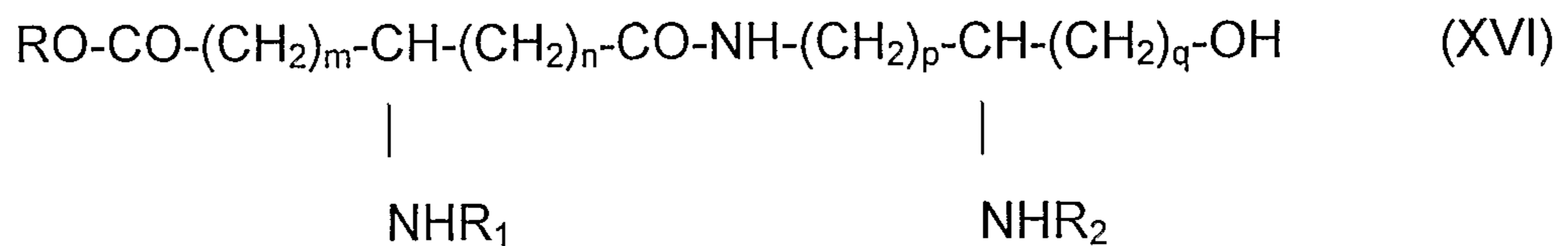
les descripteurs m, p et q prennent une valeur allant de 1 à 10

le descripteur n prend une valeur allant de 0 à 10

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

qui consiste en ce que l'on déprotège la fonction carboxyle présente sous forme d'ester dans un pseudodipeptide de formule générale XVI

10



15 dans laquelle les substituants R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> 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,

puis soumet l'acide ainsi formé à une réaction de couplage peptidique avec un acide aminé ou un diaminoalkane partiellement protégé, en présence d'un agent  
20 de couplage peptidique, puis soumet si désiré le produit de couplage à une réaction de substitution, d'acylation ou d'alkylation avec un réactif de formule générale VIII



25

A pouvant être un groupe partant, une fonction OH, SH ou NH<sub>2</sub>

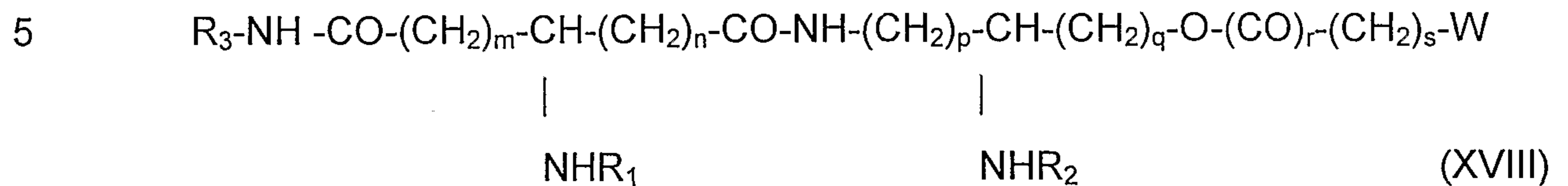
le descripteur r est 0 ou 1

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

30 W est choisi parmi l'un des groupements, -formyle, -acétyle, -cyano, -halogéno, -amino, -bromo- ou iodoacétamido, -acylamido, -diacylimido, -sulfhydryle, -alkylthio, -hydroxyle, -1,2-dihydroxyéthyle, -acyloxy, -vinyle, -ethynyle, -carboxyle libre ou présent sous forme d'ester ou d'un autre dérivé



si nécessaire en présence d'un agent d'activation, et le produit ainsi formé est déprotégé, par exemple par hydrogénolyse, de façon à obtenir le produit de formule générale XVIII



10 dans laquelle les substituants W, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, m, n, p, q, r, s ont les significations fournies antérieurement et le groupe R<sub>3</sub> représente un groupe aminoalkyle, carboxyalkyle, dicarboxyalkyle ou aminocarboxyalkyle.

15 16. Les énantiomères et les diastéréoisomères des composés de formule générale I selon la revendication 1, de formule générale IV selon la revendication 7, de formule générale XI selon la revendication 11, de formule générale XII selon la revendication 12, de formule générale XVI selon la revendication 13 ou de formule générale XVIII selon la revendication 15.

20 17. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10, dans lequel le blocage de la fonction amine en ω sur la chaîne d'un dérivé d'ornithine ou de lysine 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 et successivement α-N-t-  
25 butoxycarbonylation, pour obtenir le dérivé α-N-t-butoxycarbonylé et ω-N-benzyloxycarbonylé.

30 18. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10, 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 moyen d'un borohydrure de métal alcalin ou alcalinoterreux, pour obtenir le dérivé hydroxylé correspondant ayant une fonction alcool primaire.

19. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10, dans lequel l'élimination du groupe benzyloxycarbonyle est effectuée par hydrogénolyse dans un solvant hydroxylique contenant de la triéthylamine.
- 5
20. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10, dans lequel l'amine libérée est couplée avec un acide  $\alpha$ -acylamino  $\omega$ -phosphorylé carboxylique en présence d'un réactif de couplage peptidique et notamment de IIDQ pour donner un pseudodipeptide phosphorylé protégé.
- 10
21. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10, dans lequel le pseudodipeptide est acylé sur la fonction alcool avec un acide  $\omega$ -fonctionnalisé en présence d'agent d'estérification, et notamment d'EDCI, pour conduire à un ester alcénylé.
- 15
22. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10, dans lequel la fonction alcényle de l'ester alcénylé est soumise à une réaction de dihydroxylation en un diol vicinal que l'on soumet, après déprotection des fonctions du pseudodipeptide à une oxydation par l'acide periodique pour obtenir
- 20
23. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10, dans lequel le pseudodipeptide est acylé sur la fonction alcool avec un acide  $\omega$ -amino-alkanoïque.
- 25
24. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10, dans lequel on effectue une réaction de déprotection complète par hydrogénolyse en présence d'un catalyseur, pour obtenir un pseudodipeptide portant un bras auxiliaire aminoalkanoylé.
- 30
25. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10, dans lequel le partenaire acide de la réaction de couplage est un dérivé de l'acide aspartique ou de l'acide glutamique obtenu par acylation de la fonction amine de l'ester



$\beta$ -benzylique de l'acide aminé par un dérivé d'acide gras en présence d'un agent d'acylation pour obtenir un ester  $\beta$ -benzylique d'acide N-acyl aspartique ou glutamique.

- 5 26. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10, dans lequel le dérivé N-acylé de l'acide aspartique ou glutamique est couplé à l'amino alcool  $\alpha$ -N-acylé dérivé de l'ornithine ou de la lysine 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.
- 10
27. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10, dans lequel la fonction hydroxyle du pseudodipeptide est acylée à l'aide d'un acide  $\omega$ -fonctionnalisé par un groupe alcényle et dans lequel on soumet le groupe alcényle aux réactions de dihydroxylation puis de déprotection et d'oxydation par
- 15 l'acide periodique pour obtenir un composé de formule générale XVII.
28. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10, dans lequel la fonction hydroxyle du pseudodipeptide est acylée à l'aide d'un acide  $\omega$ -aminoalkanoïque et en ce que l'on soumet le composé aux réactions de
- 20 déprotection, pour obtenir un composé de formule générale XVII.
29. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10, dans lequel l'amino alcool obtenu par réduction de l'ornithine ou de la lysine est alkylé par un triflate d' $\omega$ -alcényle que l'on couple avec un acide  $\alpha$ -acylaminé  $\omega$ -phosphorylé
- 25 carboxylique en présence d'un agent d'acylation comme l'EDCI, puis soumet le 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 periodate de sodium pour obtenir un composé à fonction aldéhyde.
- 30 30. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10 dans lequel on soumet un dérivé N-protégé de la sérine à une O-alkylation, élimine le groupe protecteur de la fonction amine par acidolyse, 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 la fonction OH libre avec un acide alcanoïque  $\omega$ -fonctionnalisé, pour obtenir un composé de formule générale I dans laquelle X est un groupement carboxyalkyloxy.

5  
31. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10 dans lequel l'acide aminé de départ est la cystéine ou l'homocystéine que l'on alkyle par le bromoacétate de p-méthoxybenzyle puis acyle à l'azote avec un dérivé d'acide 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  $\omega$ -fonctionnalisé, et si désiré soumet le produit en résultant à une réaction de déprotection, pour obtenir un composé de formule générale I dans laquelle X est un groupement carboxyalkylthio.

20  
32. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10 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 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 alcanoïque  $\omega$ -fonctionnalisé par un radical alcénylé ou aminé, soumet le dérivé alcénylé à une réaction de dihydroxylation puis de déprotection par hydrogénéolyse puis à une oxydation par l'acide periodique, pour obtenir un composé de formule générale I dans laquelle X est un groupement dicarboxyalkyloxy.

30

33. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10 dans lequel en partant de l'ester benzylique de l'homosérine O-phosphorylée, on procède à une N-acylation par l'acide 3-benzyloxytétradécanoïque, soumet l'ester de benzyle à



une hydrogénolyse sélective, couple cet acide avec le dérivé  $\alpha$ -N-dodécanoyloxytétradécanoïque de l'ornithinol en présence d'un agent de couplage peptidique pour obtenir un pseudodipeptide que l'on acyle sur la fonction hydroxyle restée libre avec un acide alcanoïque  $\omega$ -fonctionnalisé par un alcényle ou un amino, en présence d'une carbodiimide et dans le cas d'un dérivé alcénylé soumet celui-ci aux réactions de dihydroxylation puis de déprotection par hydrogénolyse en présence d'un catalyseur et d'oxydation par l'acide periodique, pour obtenir un composé de formule générale I dans laquelle R1 est un groupe hydroxyalkanoyle et R2 est un groupe acyloxyalkanoyle.

10

34. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10 dans lequel le pseudodipeptide intermédiaire issu de l'acide aspartique ou glutamique est soumis à une réaction de protection de la fonction hydroxyle libre par un groupe sensible à l'acidolyse, puis on déprotège la fonction carboxyle présente sous forme d'ester par une autre méthode de déprotection et notamment par hydrogénolyse, puis on la réduit, de préférence après activation sous forme d'anhydride mixte, avec un agent de réduction comme un borohydrure de métal alcalin; la fonction hydroxyle ainsi formée est soumise à une réaction de phosphorylation puis le groupe protecteur de l'hydroxyle est hydrolysé en milieu acide et la fonction hydroxyle ainsi régénérée soumise à une réaction d'acylation avec un acide carboxylique  $\omega$ -fonctionnalisé, puis on soumet celui-ci aux réactions de dihydroxylation puis de déprotection par hydrogénolyse en présence d'un catalyseur et d'oxydation par l'acide periodique pour former un composé de formule générale XI porteur d'une fonction aldéhyde.

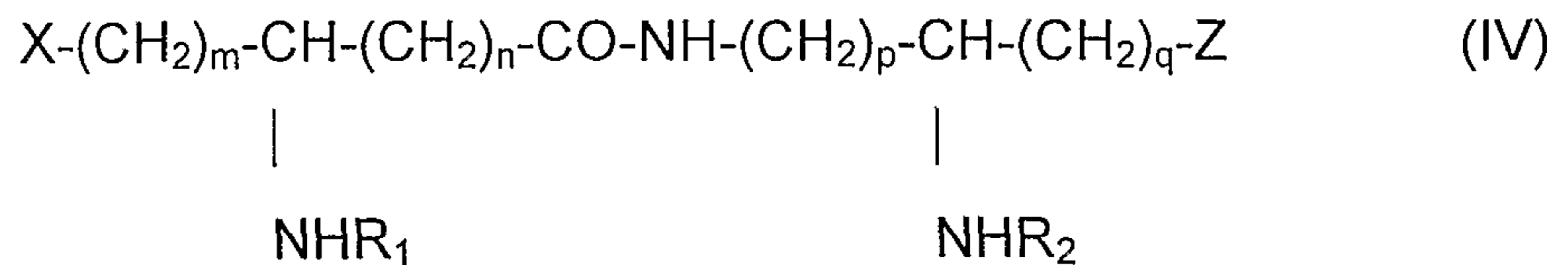
25

35. Un mode d'exécution du procédé selon la revendication 10 dans lequel le pseudodipeptide intermédiaire issu de l'acide aspartique ou glutamique est soumis à une réaction de déprotection de la fonction carboxyle présente sous forme d'ester, puis couple cette fonction carboxyle avec un aminoalcane ou un acide aminé partiellement protégé, en présence d'un agent de couplage, puis on soumet le produit de couplage soit à une déprotection, notamment par hydrogénolyse, soit à une réaction d'acylation avec un acide alcanoïque  $\omega$ -fonctionnalisé et dans le cas d'un dérivé alcénylé on soumet celui-ci aux

30

réactions de dihydroxylation, puis de déprotection, notamment par hydrogénolyse, et d'oxydation par l'acide periodique pour obtenir un composé de formule générale I ou de formule générale XVIII.

5 36.A titre de produits nouveaux, les composés de formule générale IV



10

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 hydroxyle, un alkyle, un alkoxy, un acyloxy, un amino, un acylamino, un acylthio et un (alkyl en  $C_1 - C_{24}$ ) thio

15

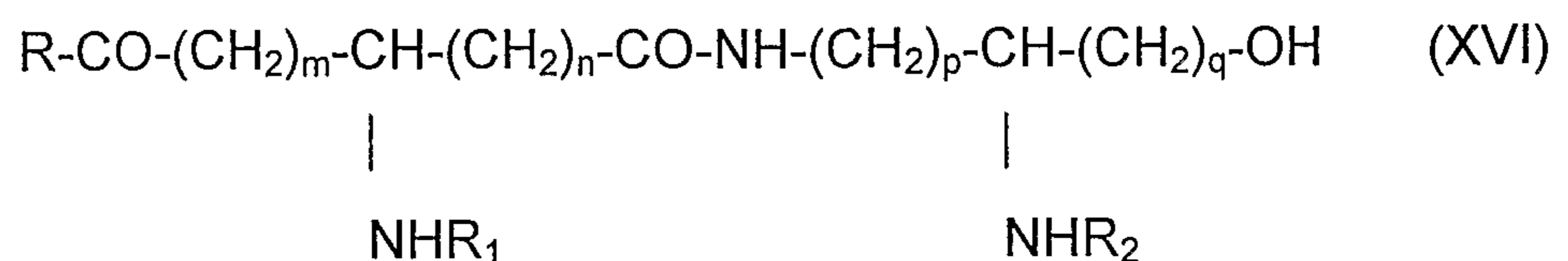
les descripteurs  $m$ ,  $p$  et  $q$  prennent une valeur allant de 1 à 10

le descripteur  $n$  prend une valeur allant de 0 à 10

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

20

- les composés de formule générale XVI :

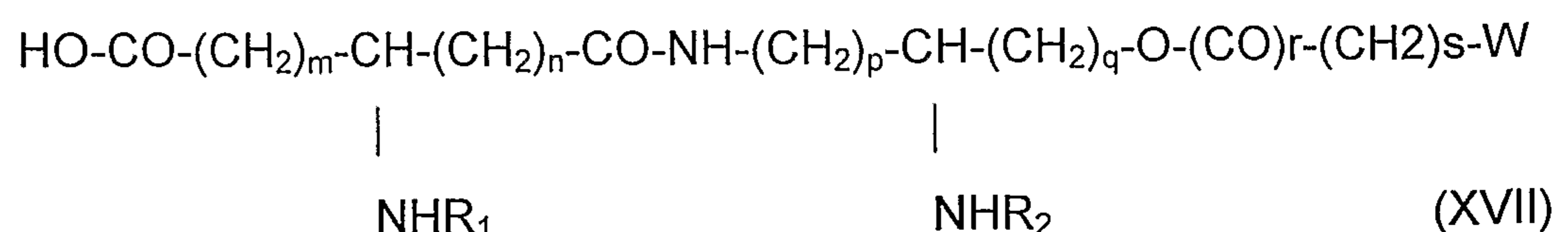


25

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

- et les composés de formule générale XVII

30





dans laquelle A est de l'oxygène et les substituants W, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, m, n, p, q, r, s ont les significations fournies antérieurement ceux-ci étant sous forme énantiomérique pure ou sous forme de mélange de stéréoisomères.

5

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

10

38. Les compositions pharmaceutiques selon la revendication 37, 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.

15

39. Les compositions pharmaceutiques selon la revendication 37, à base d'un composé de formule générale I, sous forme de diastéréoisomère pur ou en mélange, en association ou en mélange avec un excipient ou un véhicule pharmaceutique.

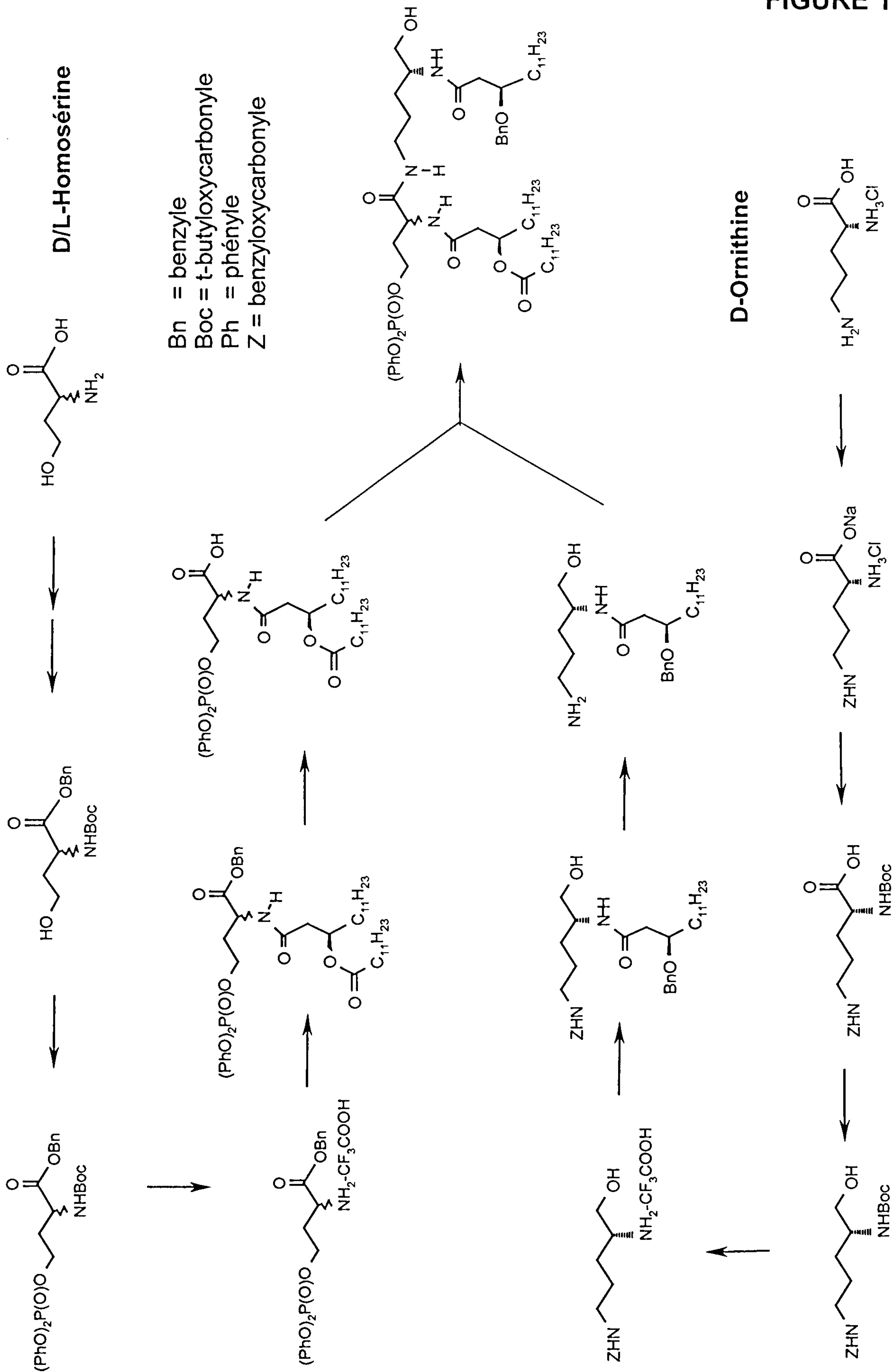
20

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

25

41. 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.

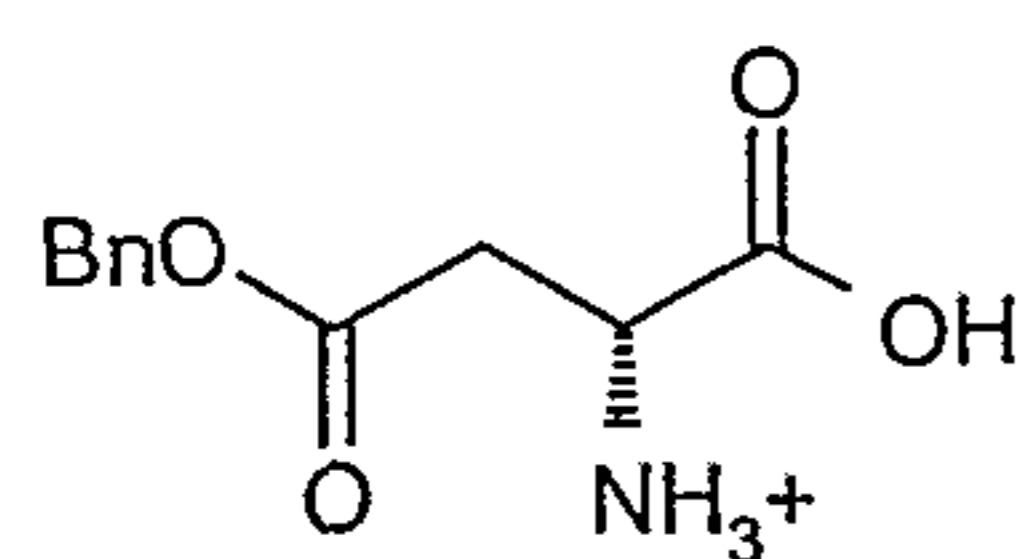
FIGURE 1



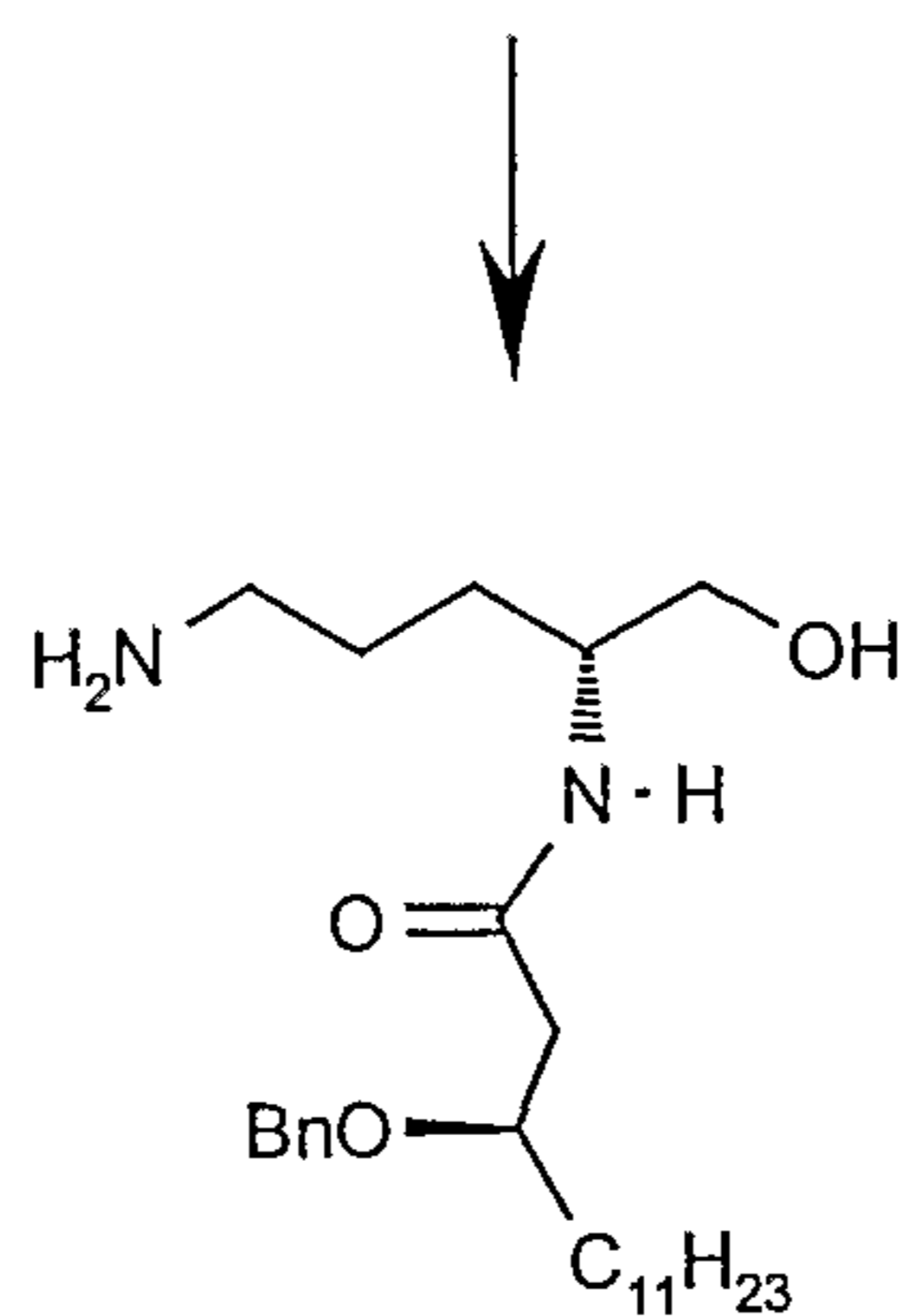


Acide D-aspartique  
β-benzyle ester

FIGURE 2



D-Ornithine



Bn = benzyle

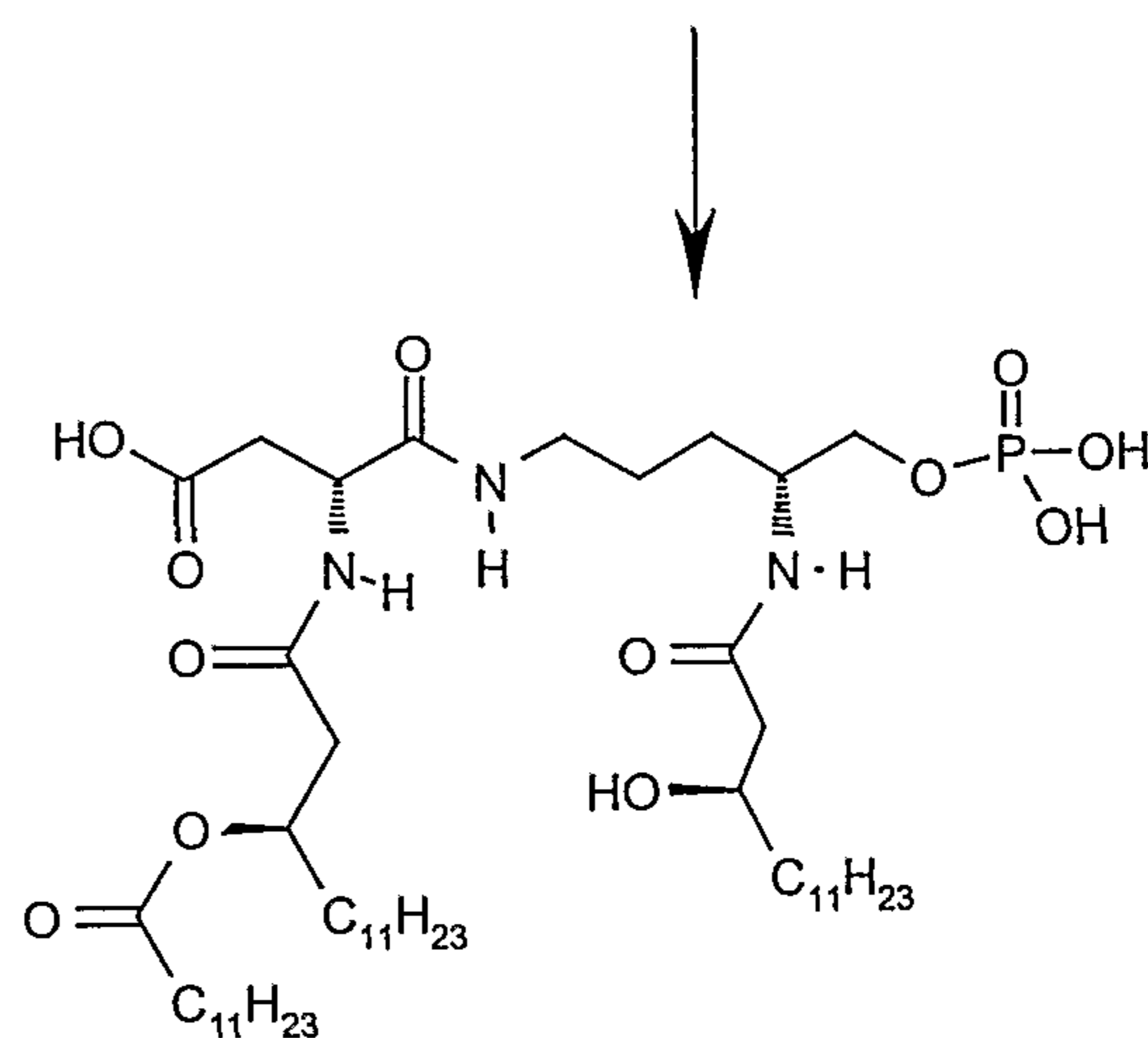
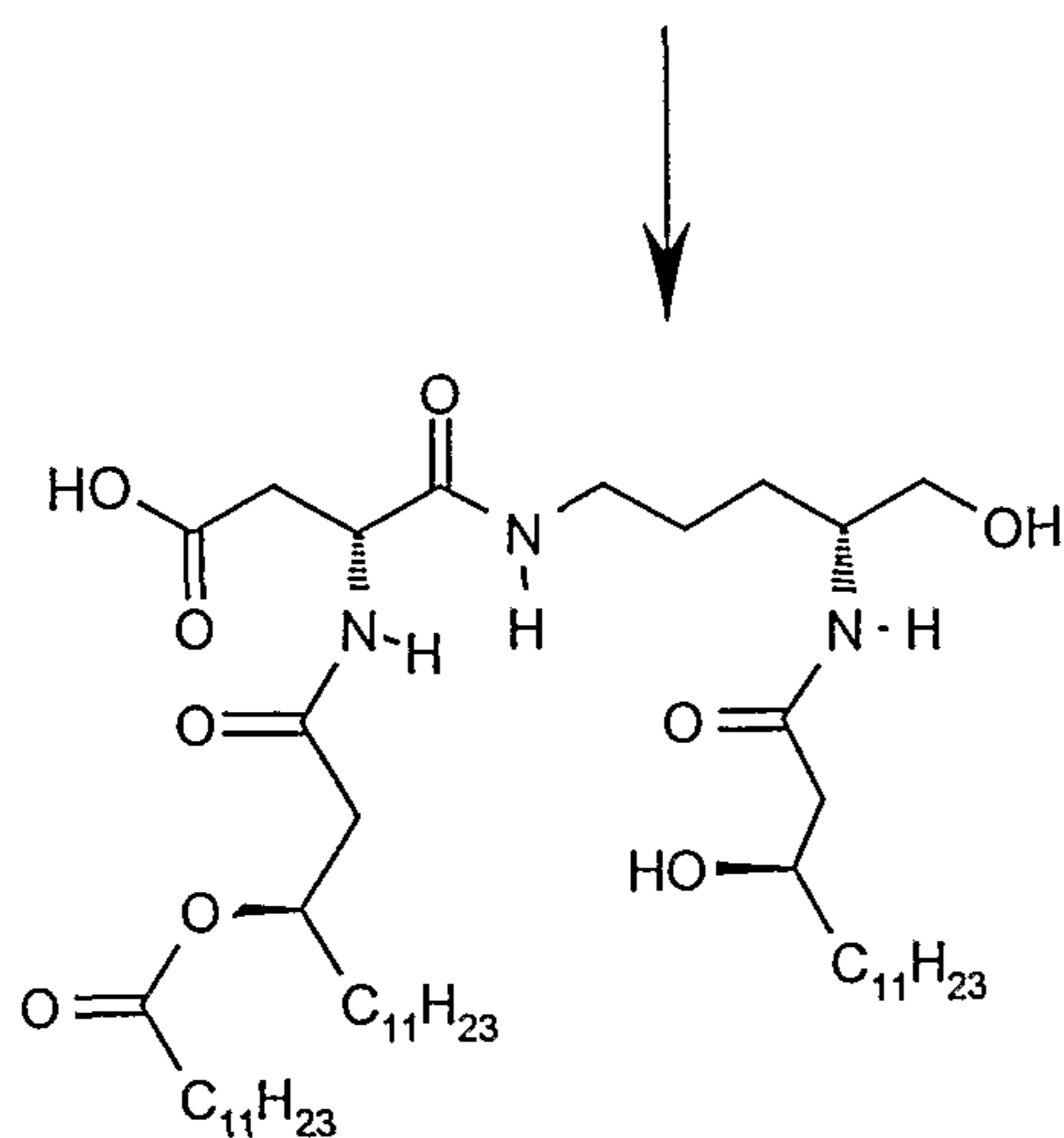
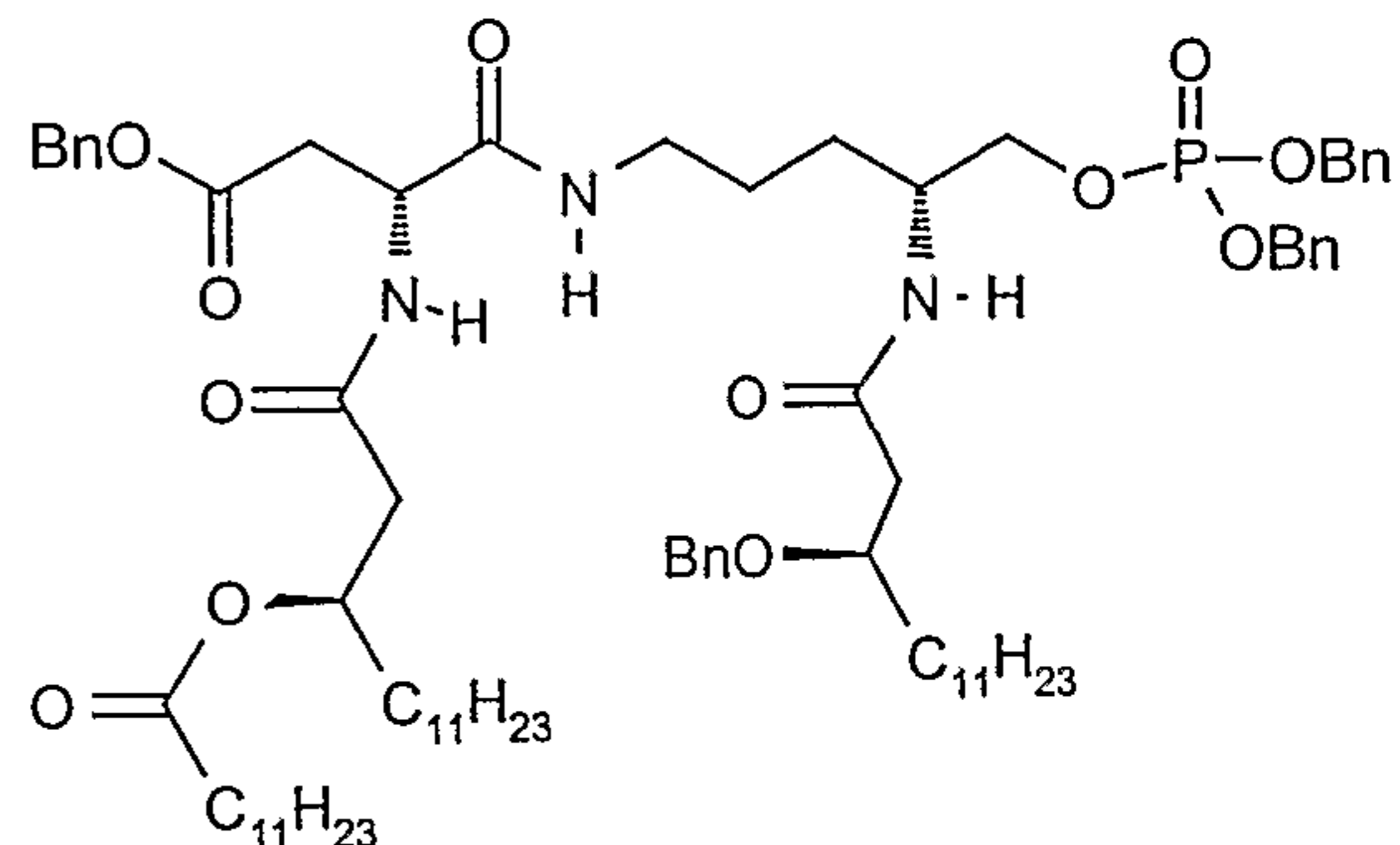
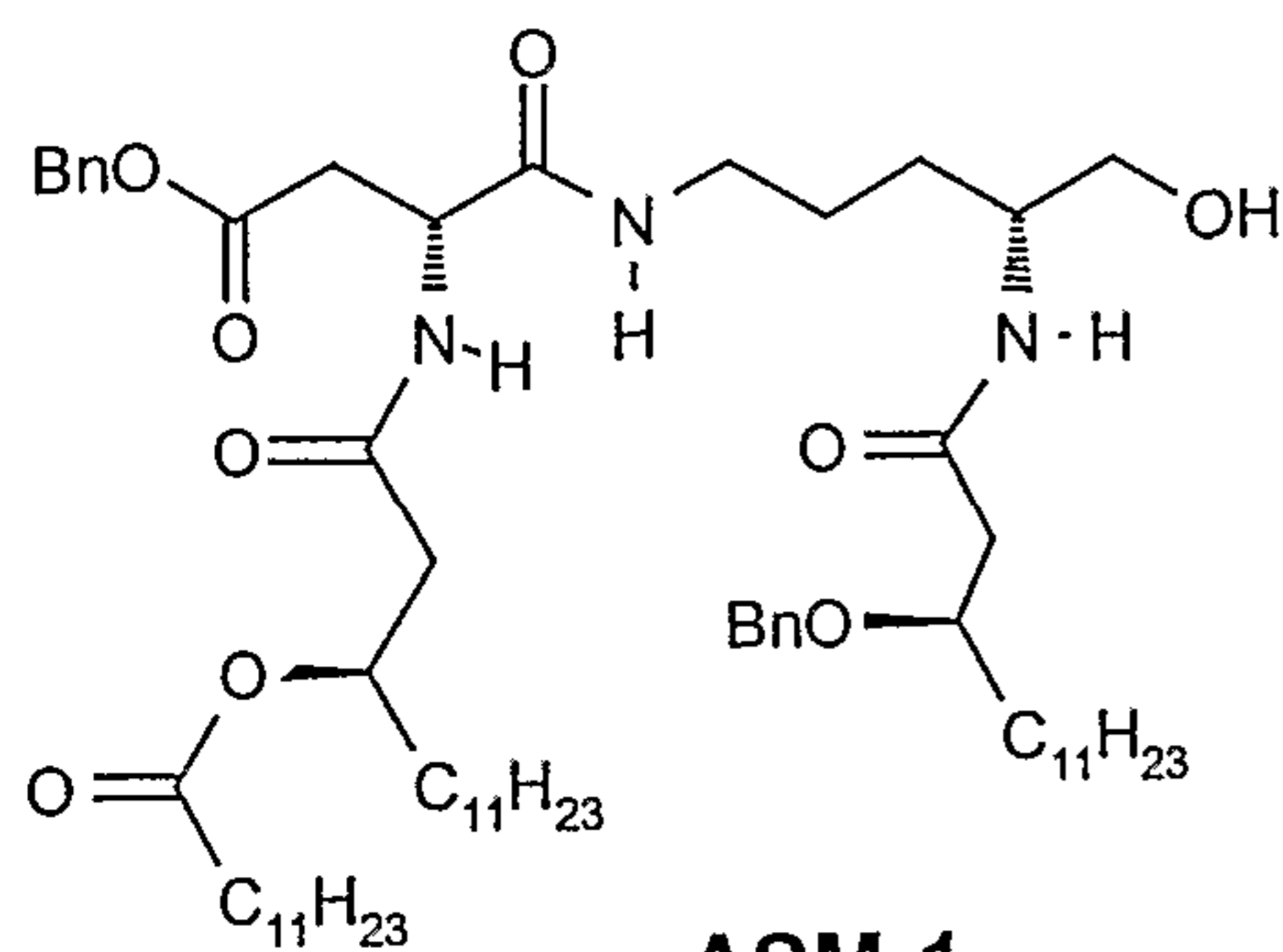
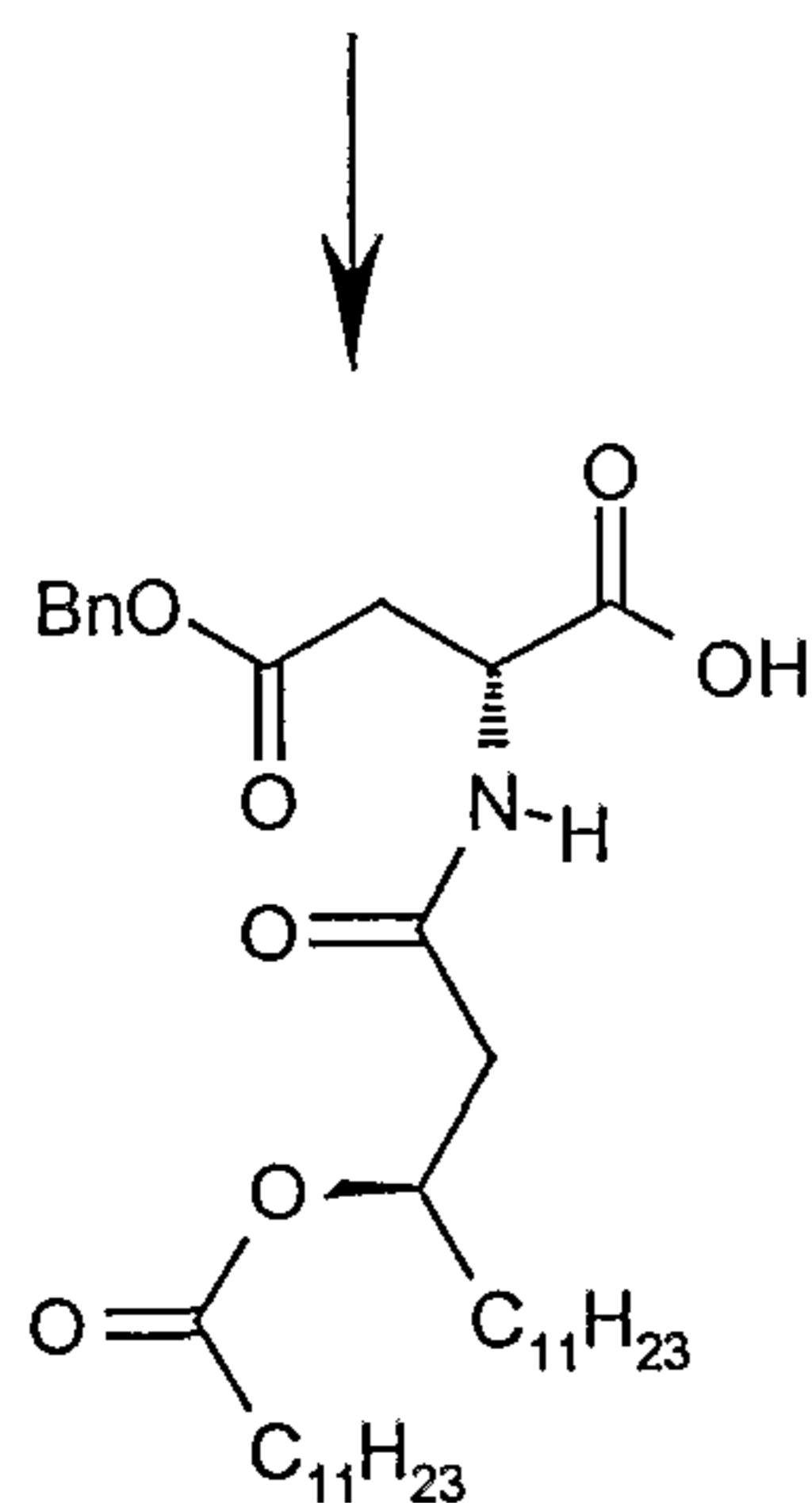


FIGURE 3

OM-197-MC

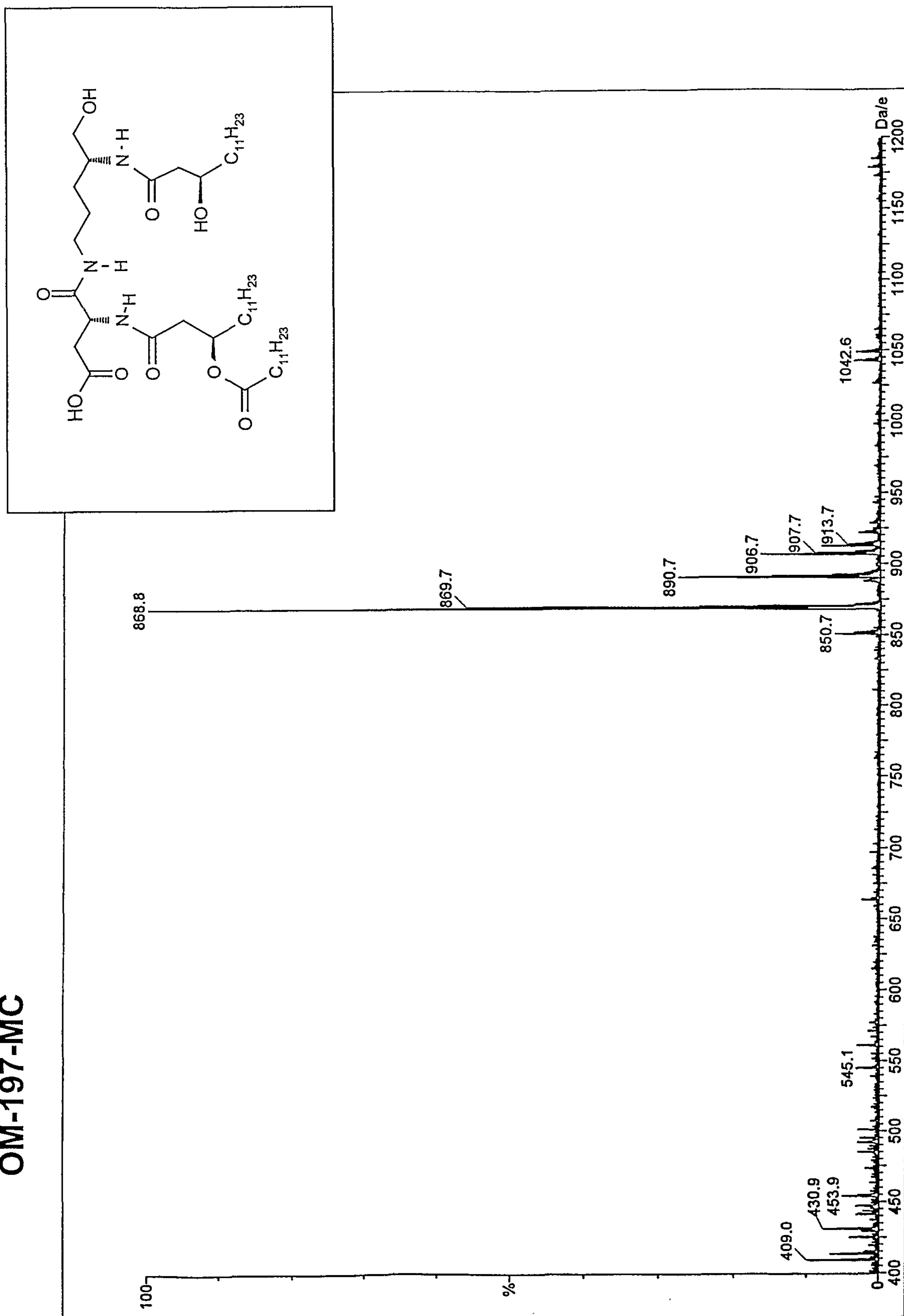
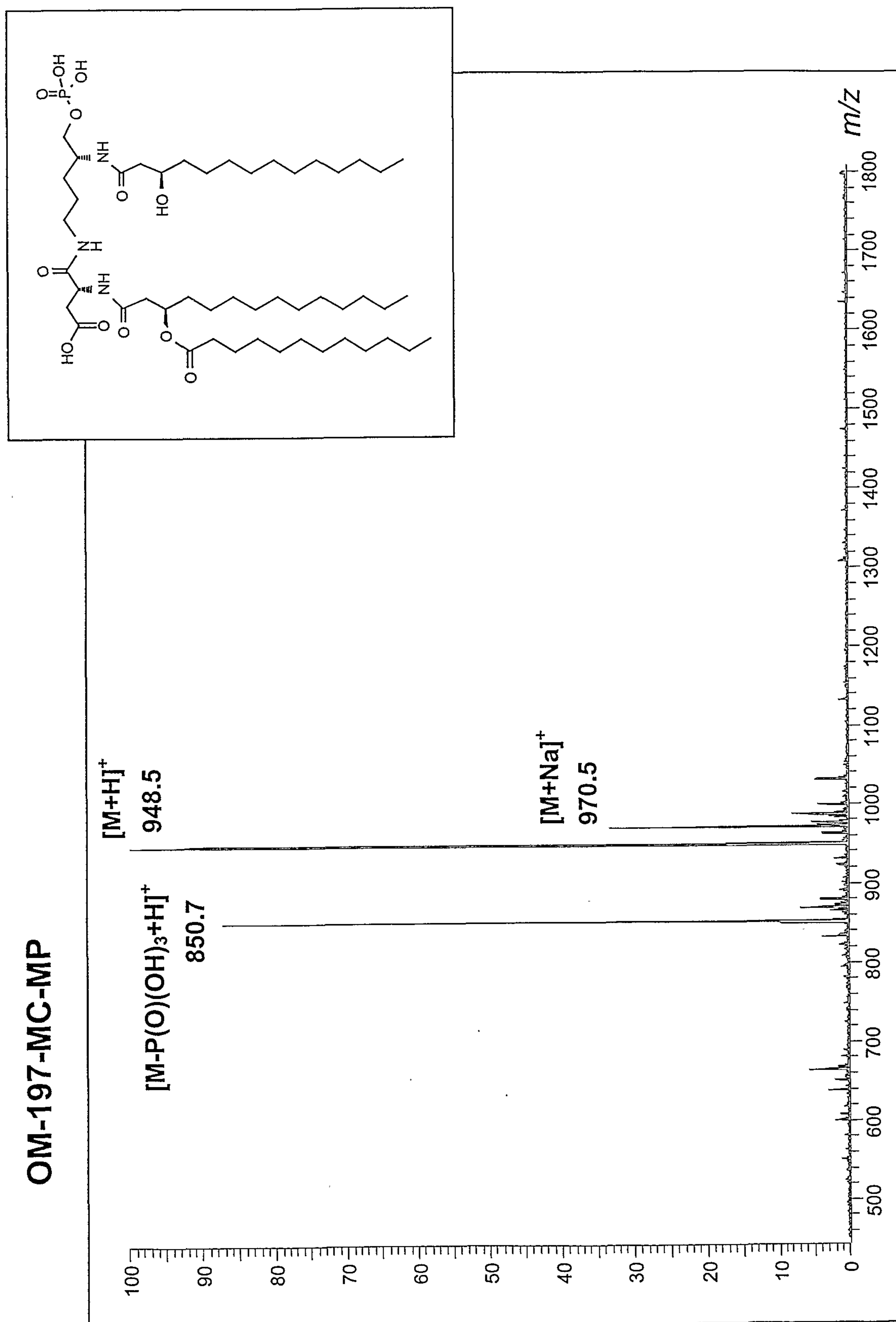




FIGURE 4



5/86

FIGURE 5

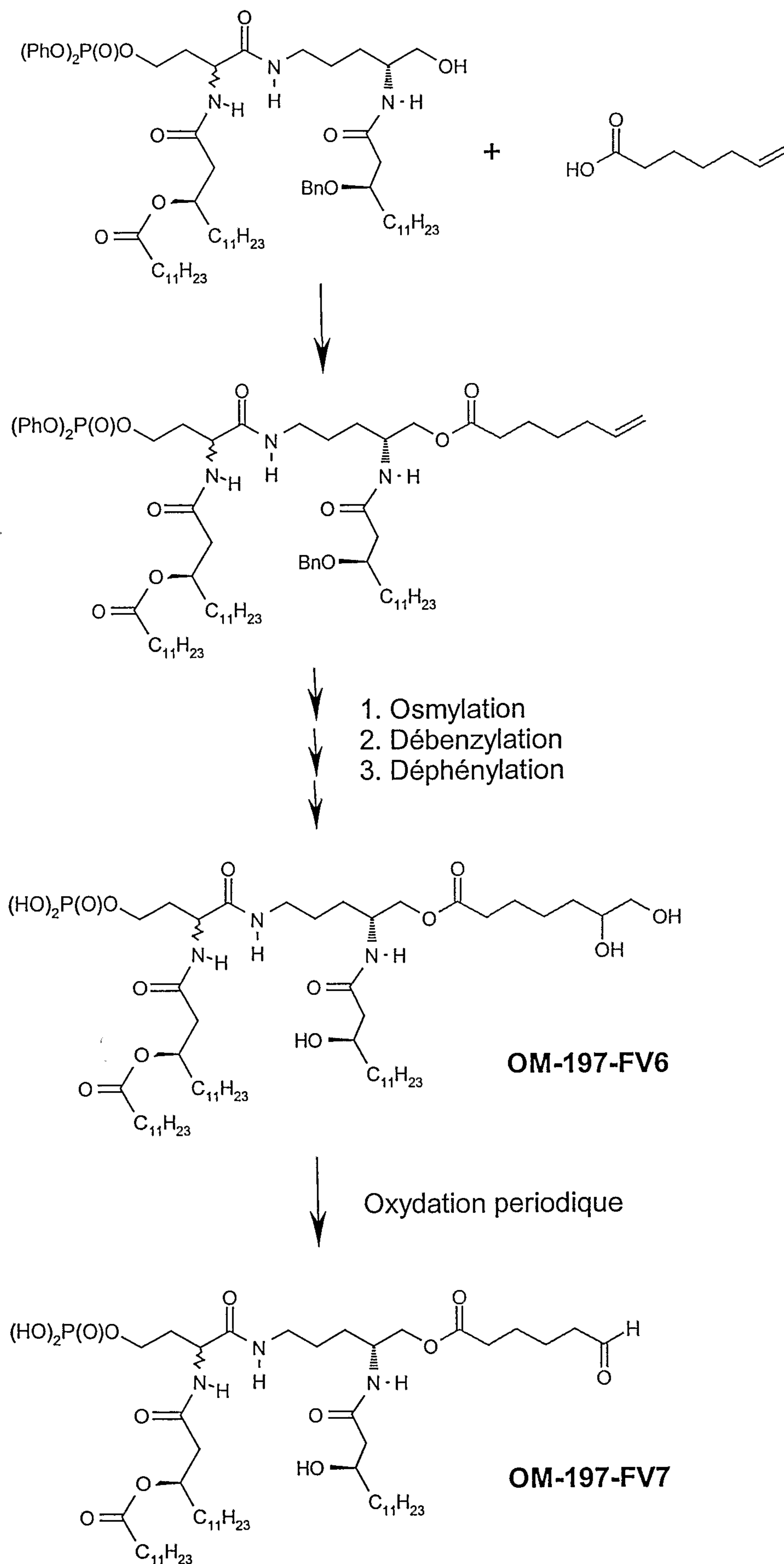
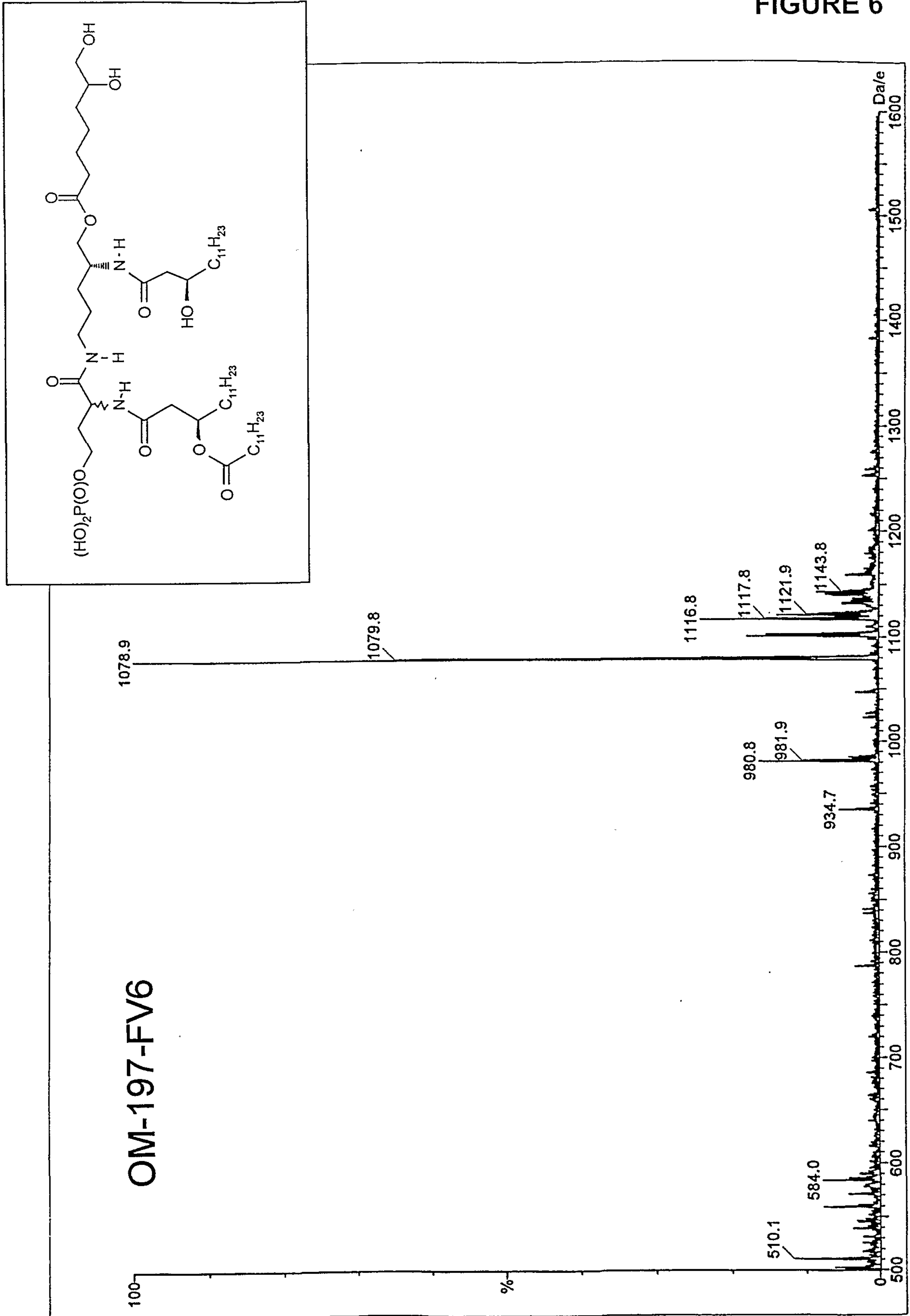




FIGURE 6







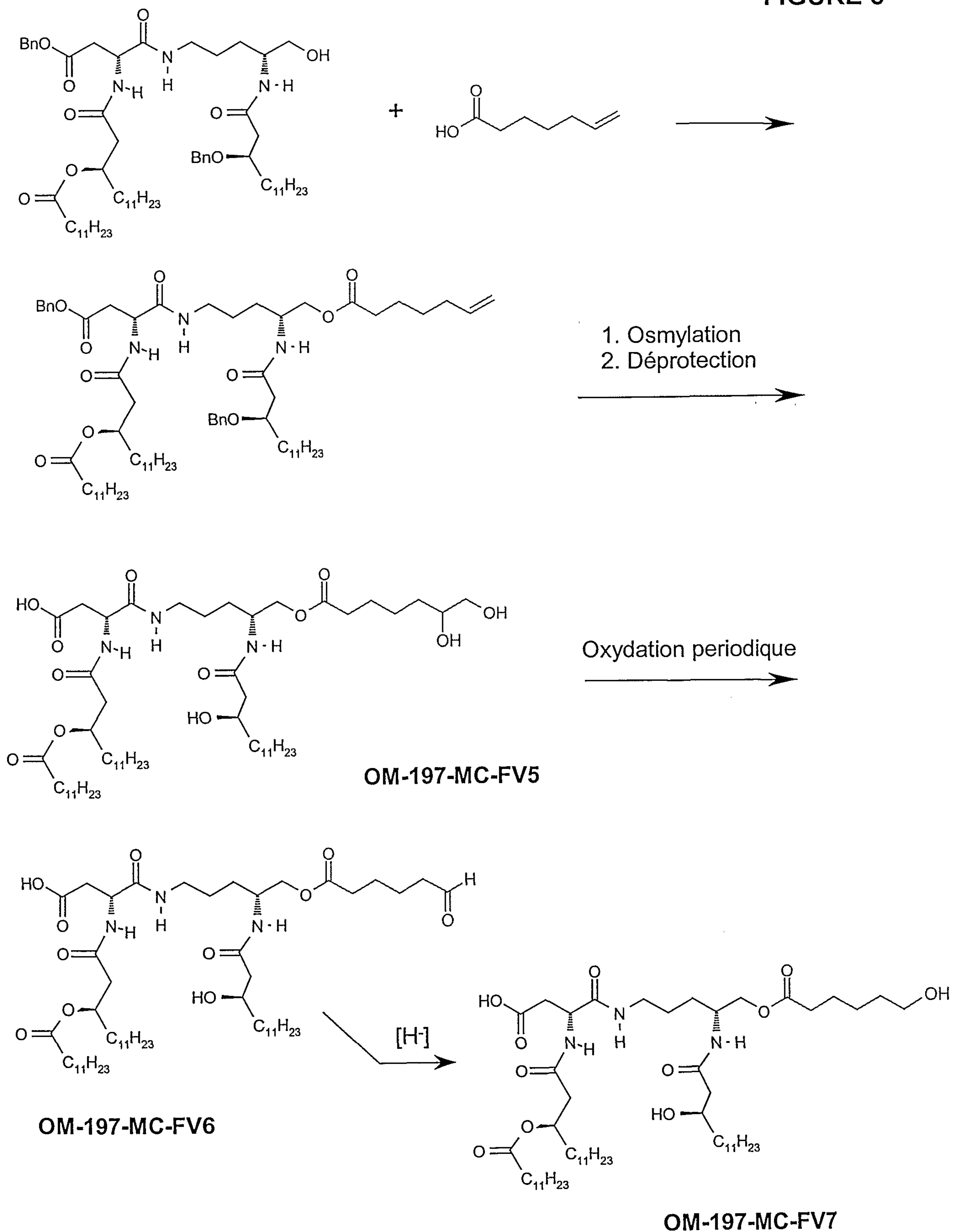
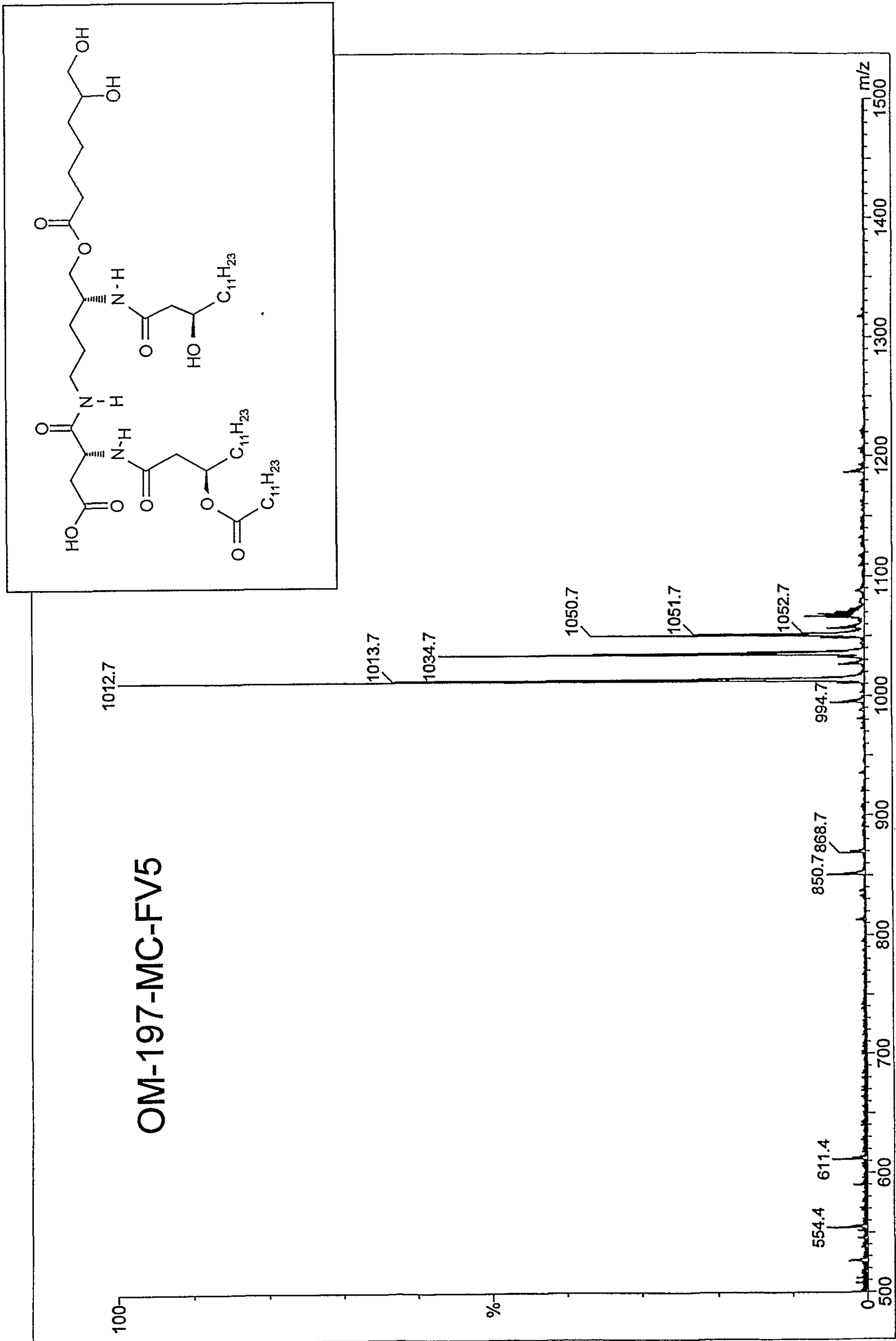
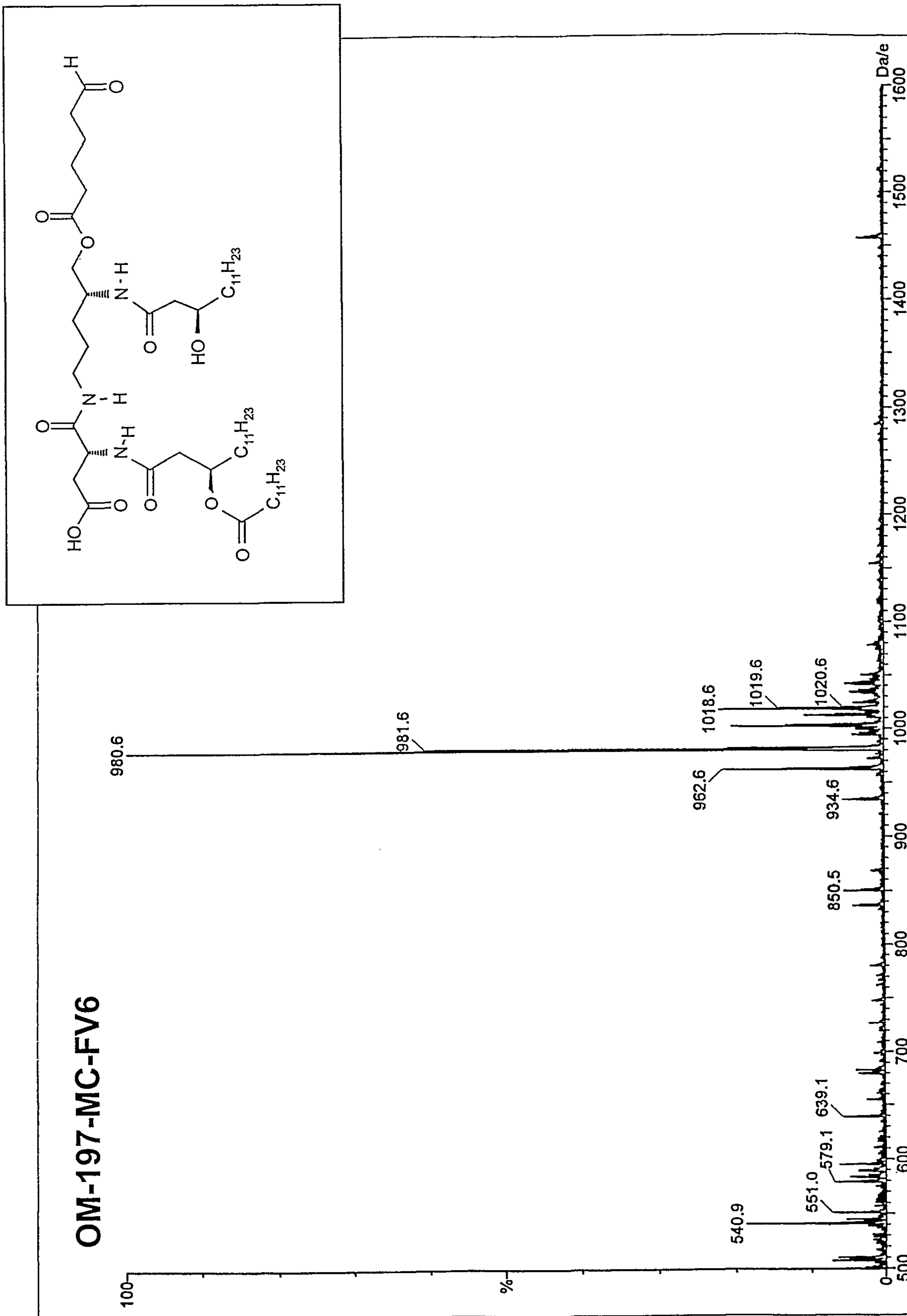


FIGURE 9

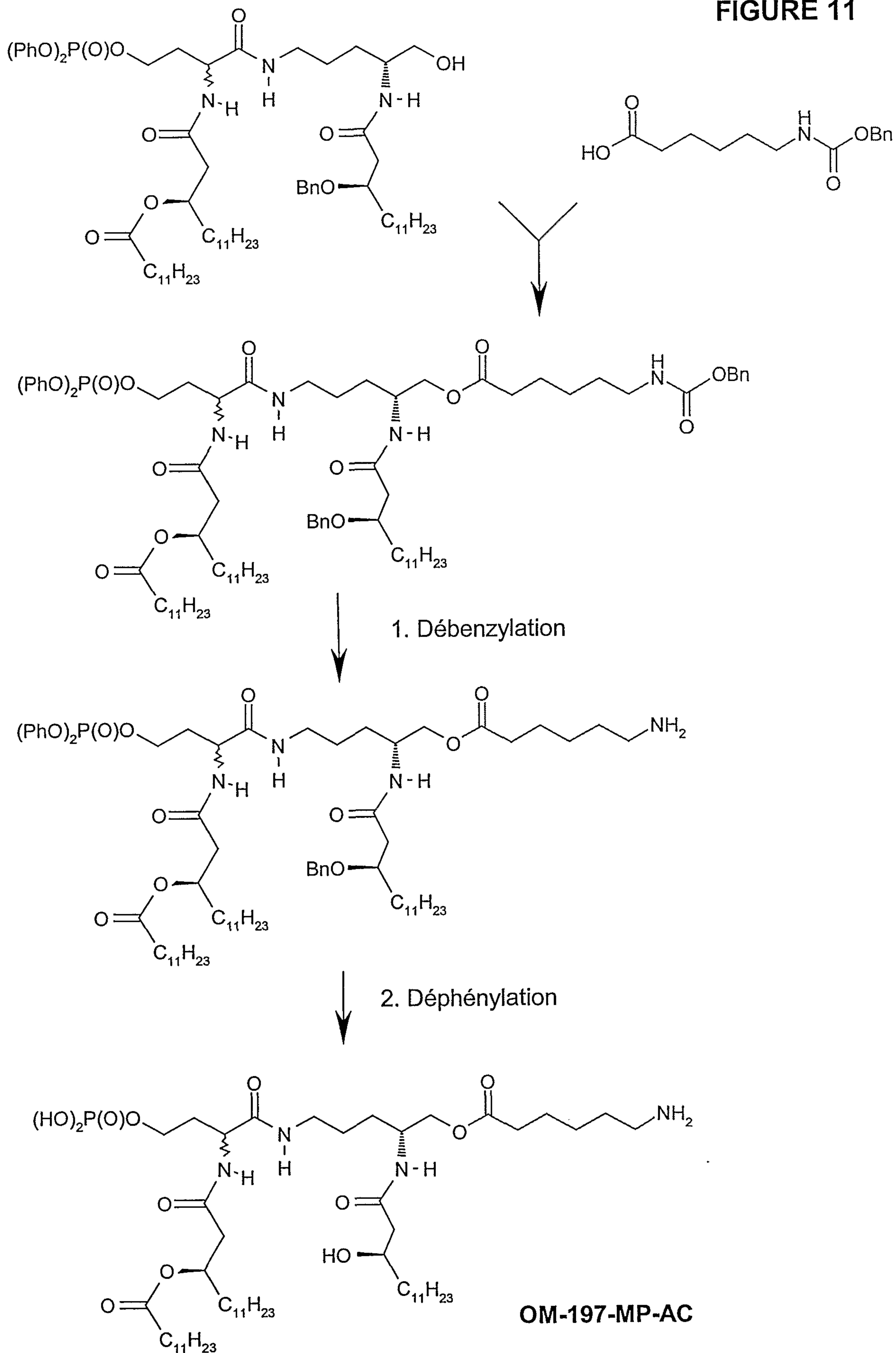




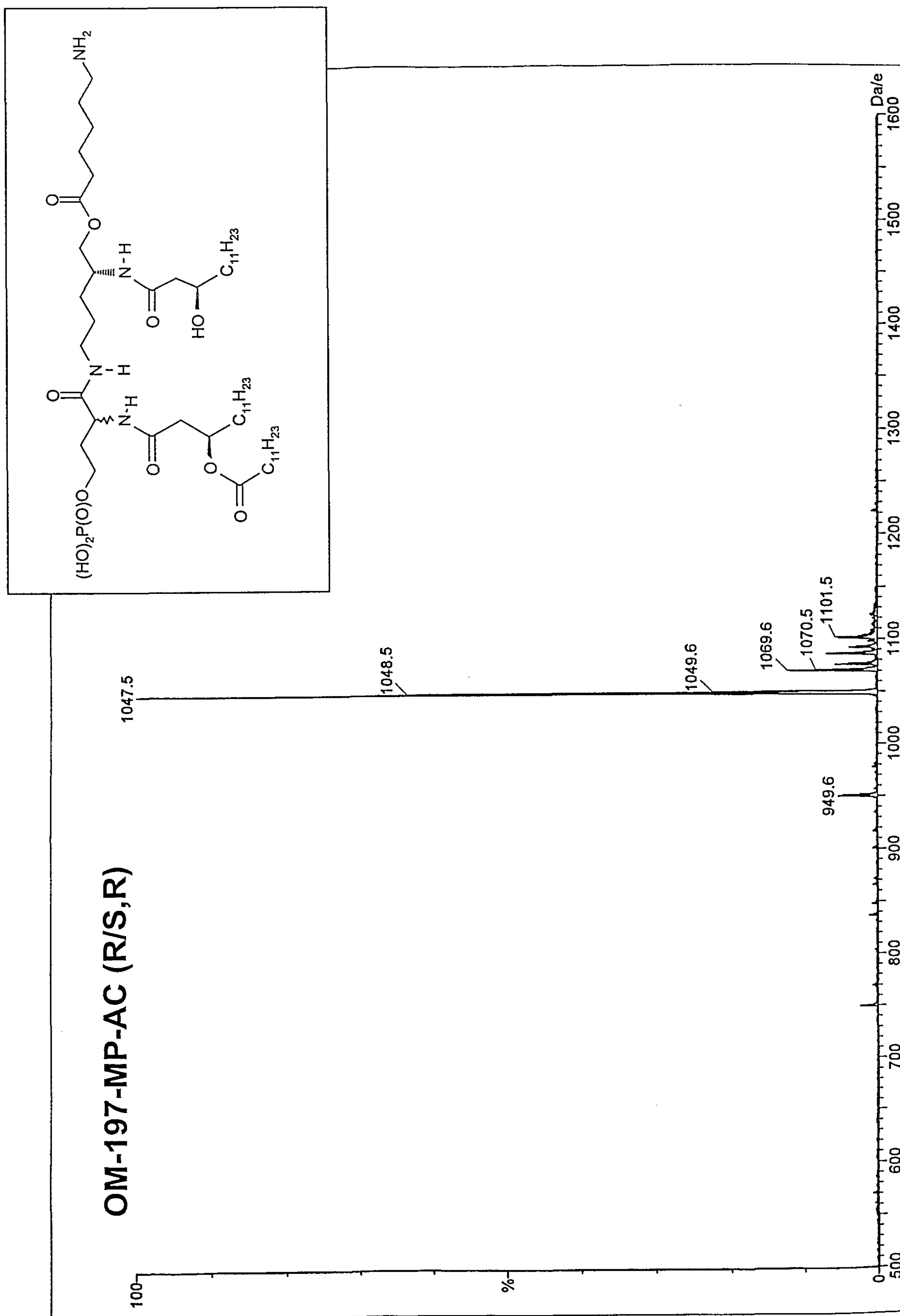


11/86

FIGURE 11







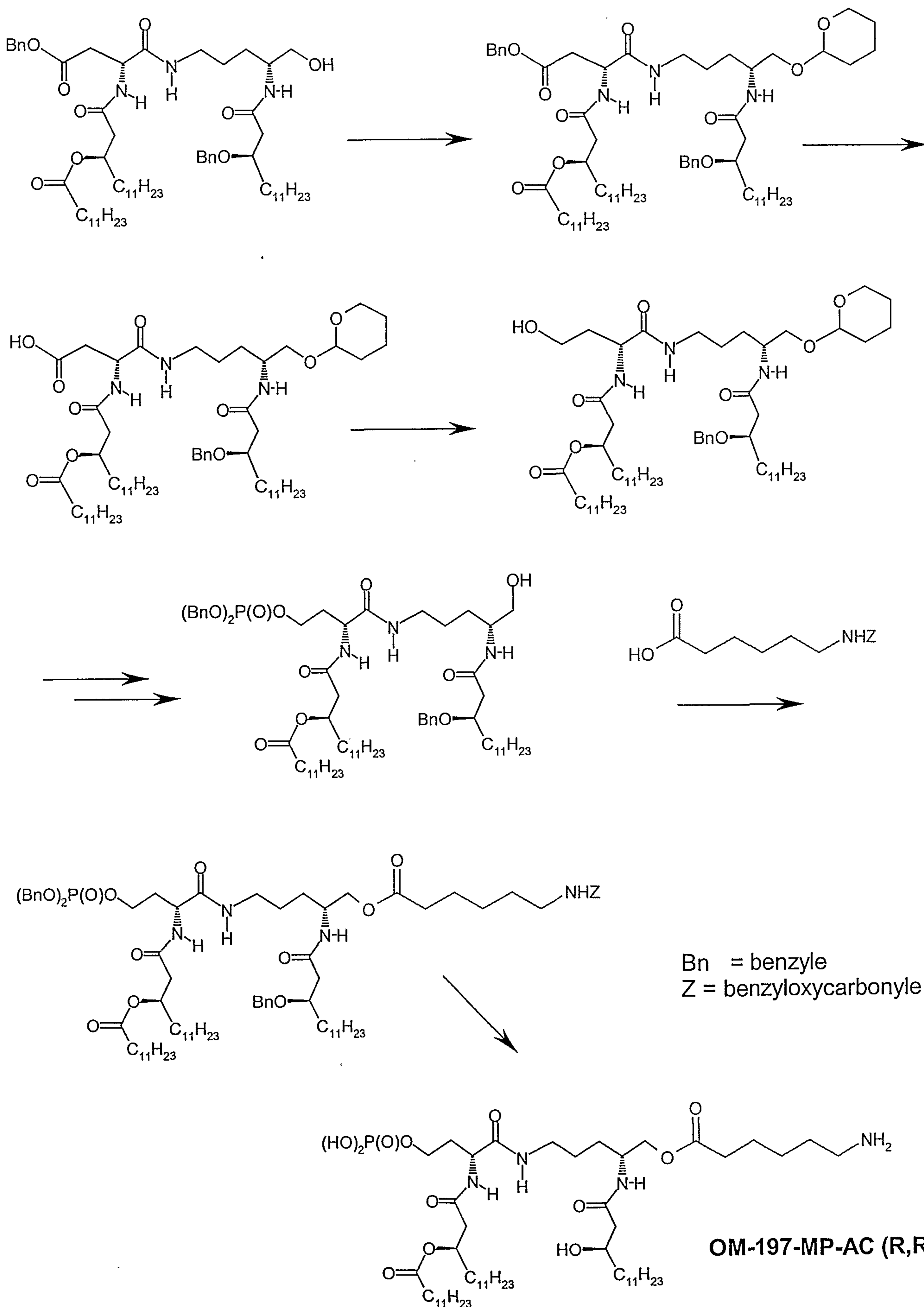
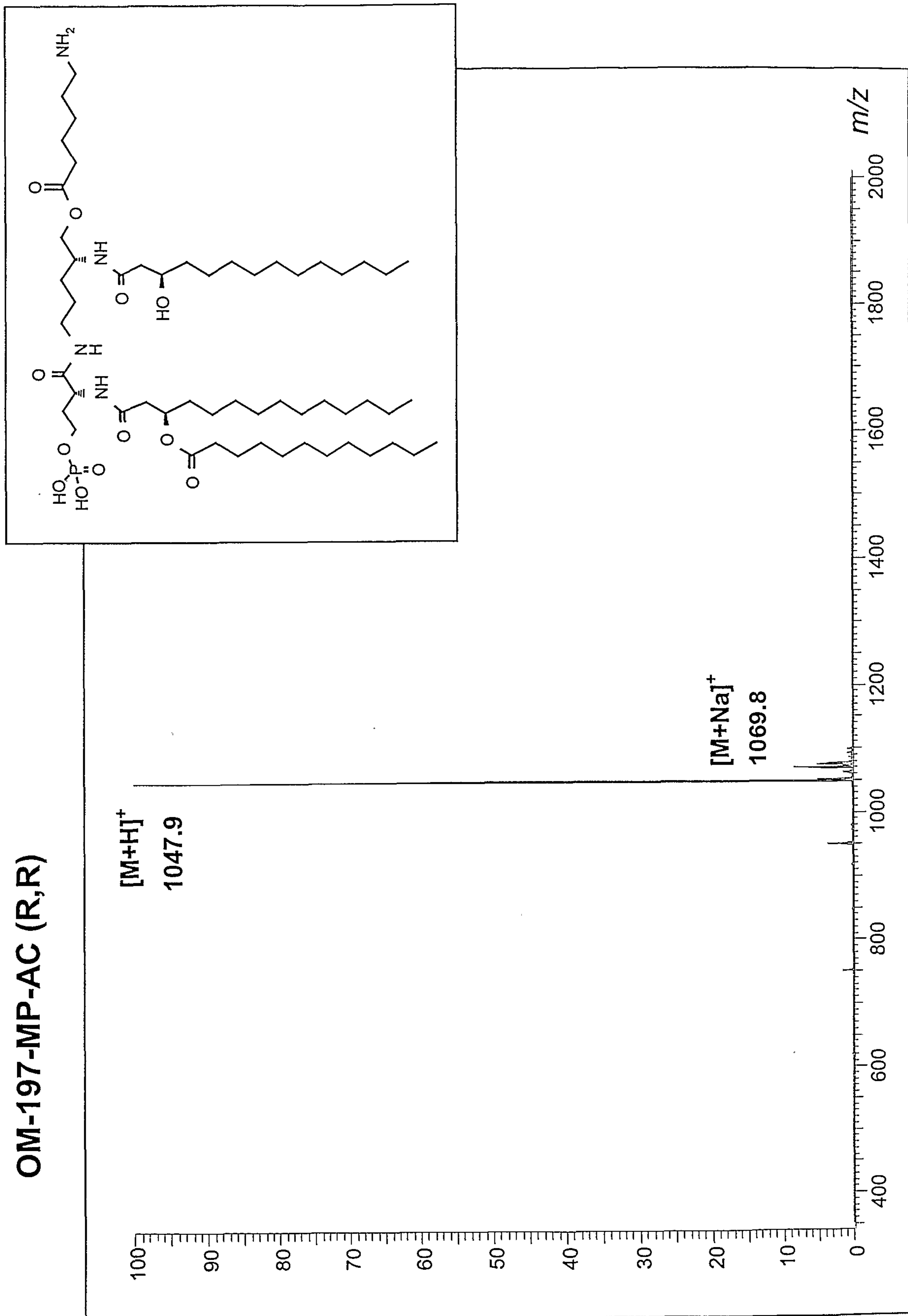
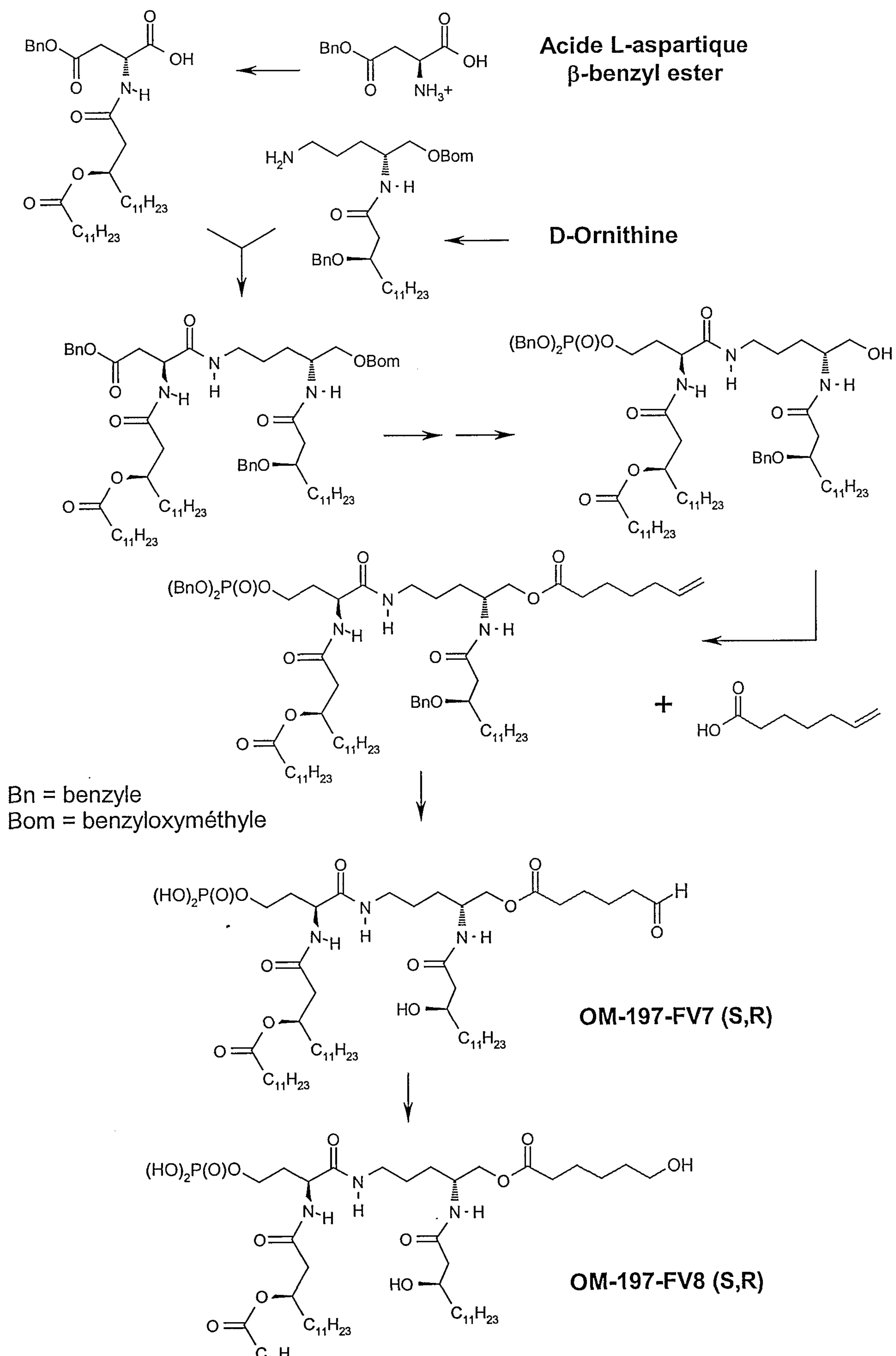


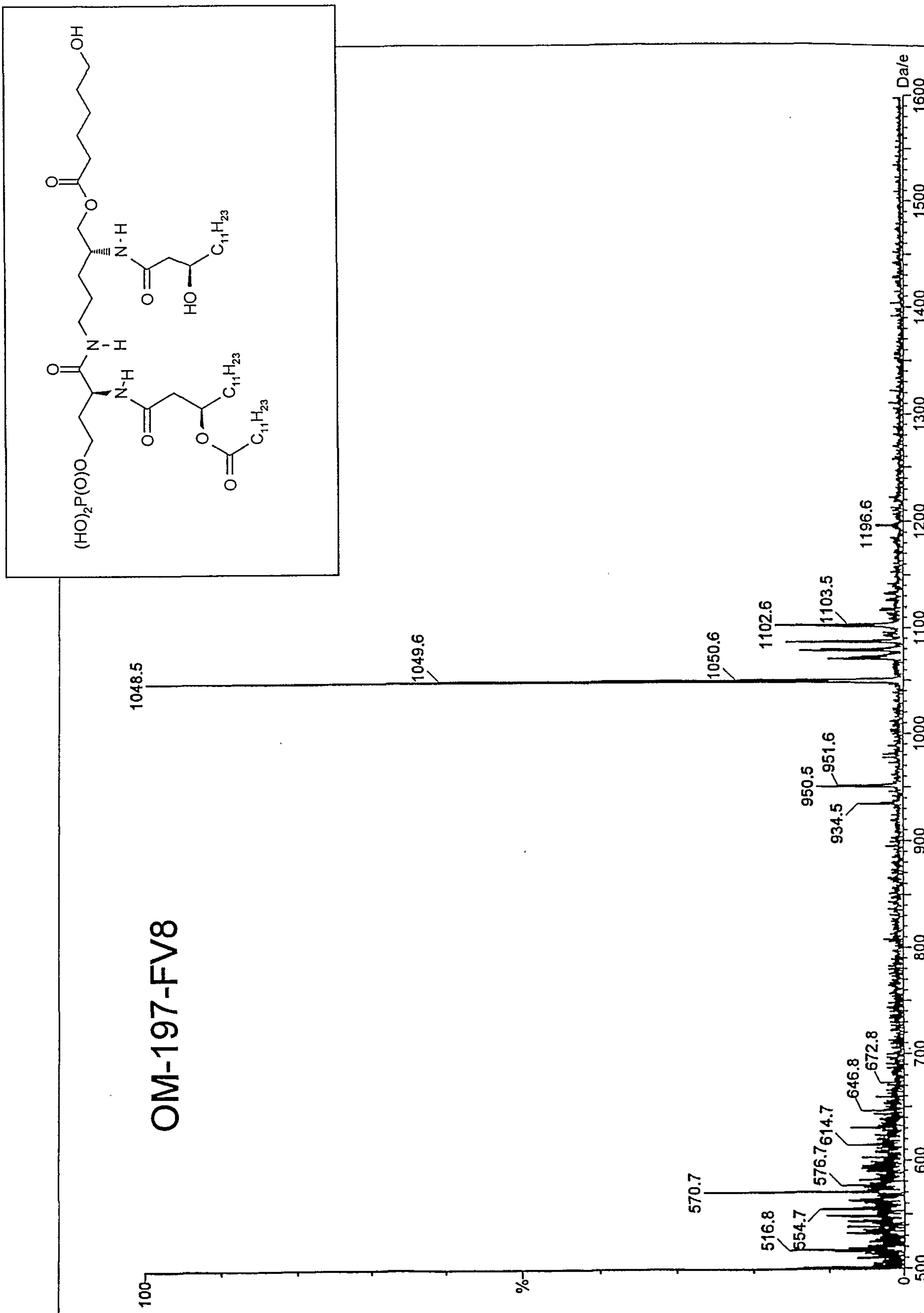


FIGURE 14













OM-144-FP8

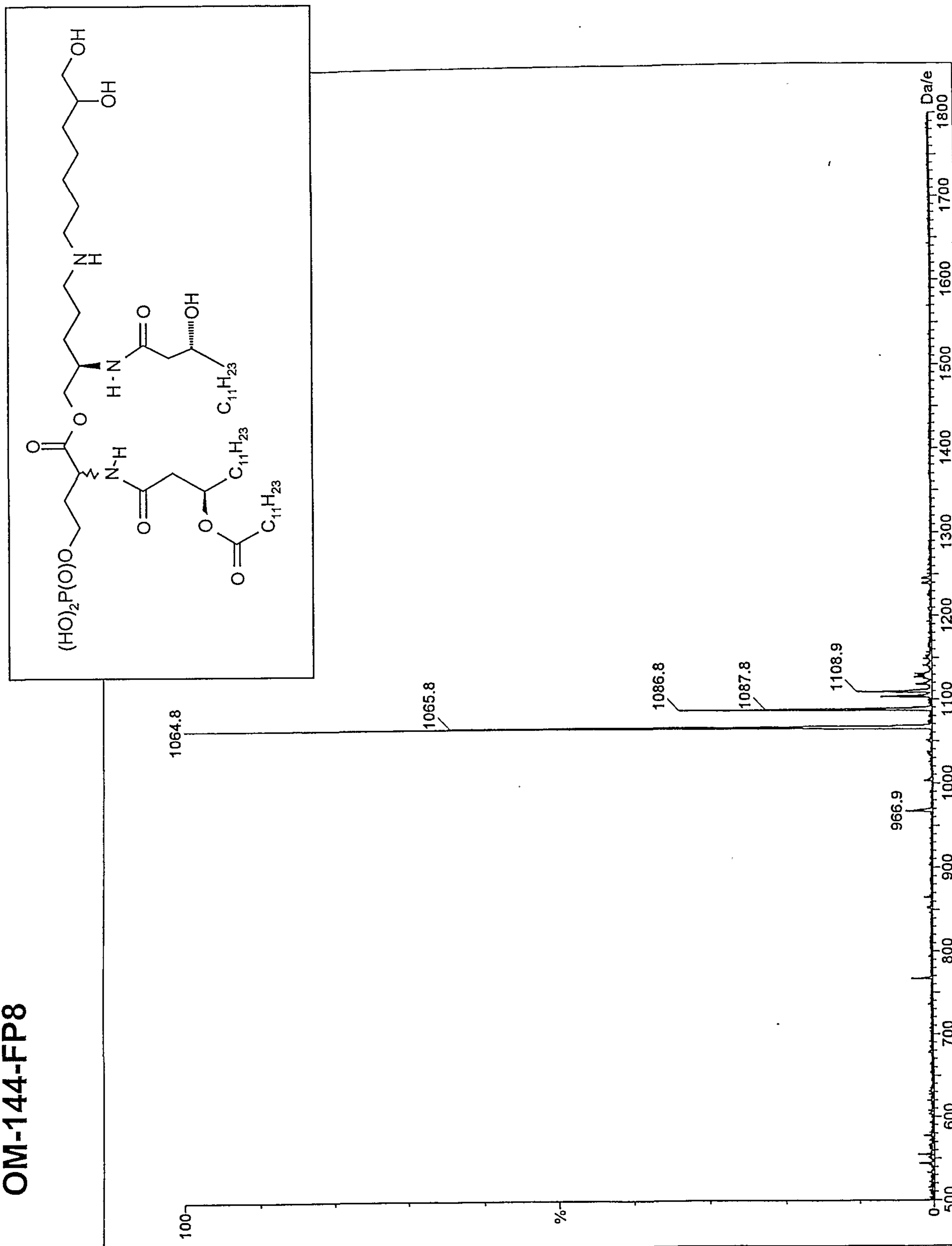


FIGURE 19

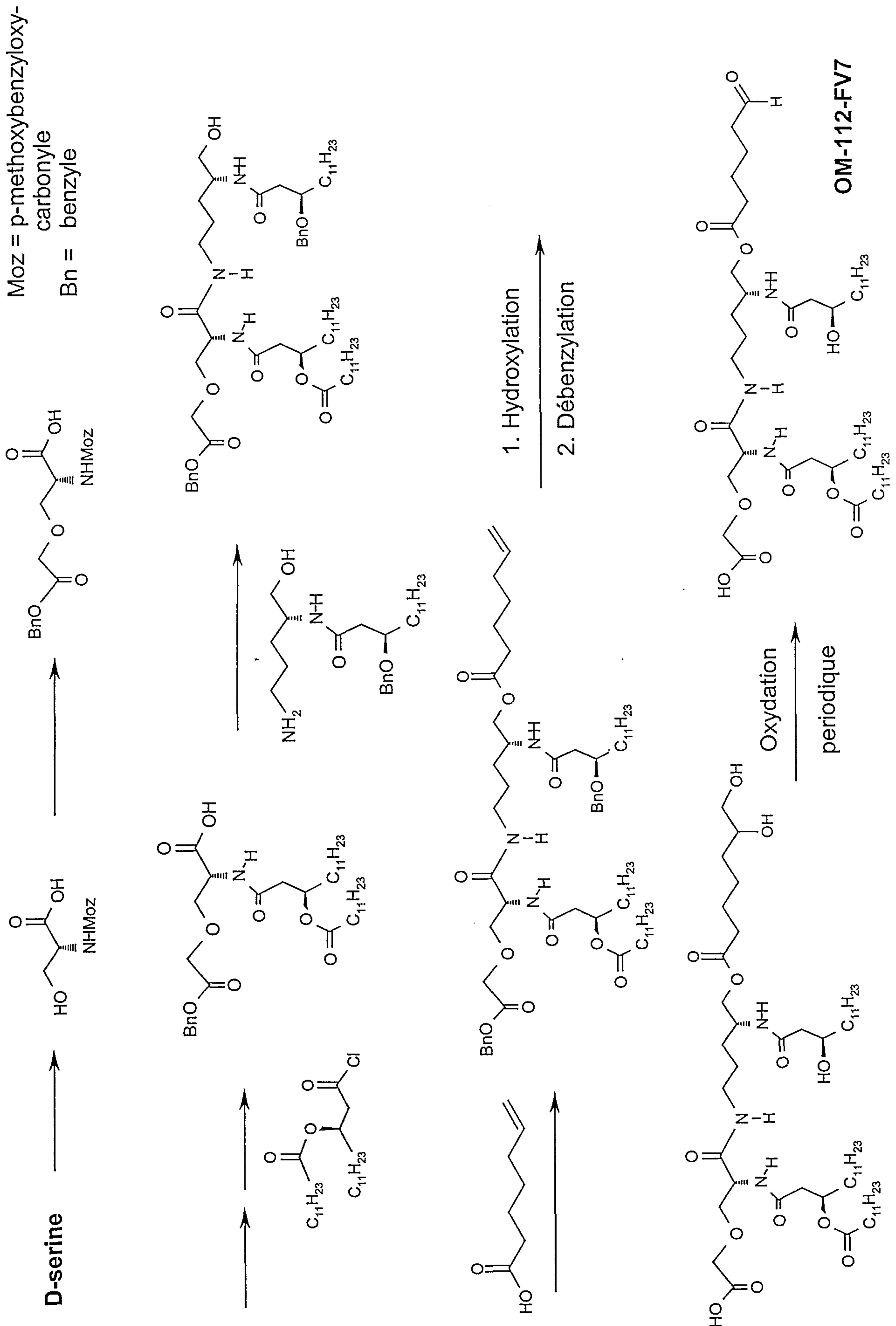
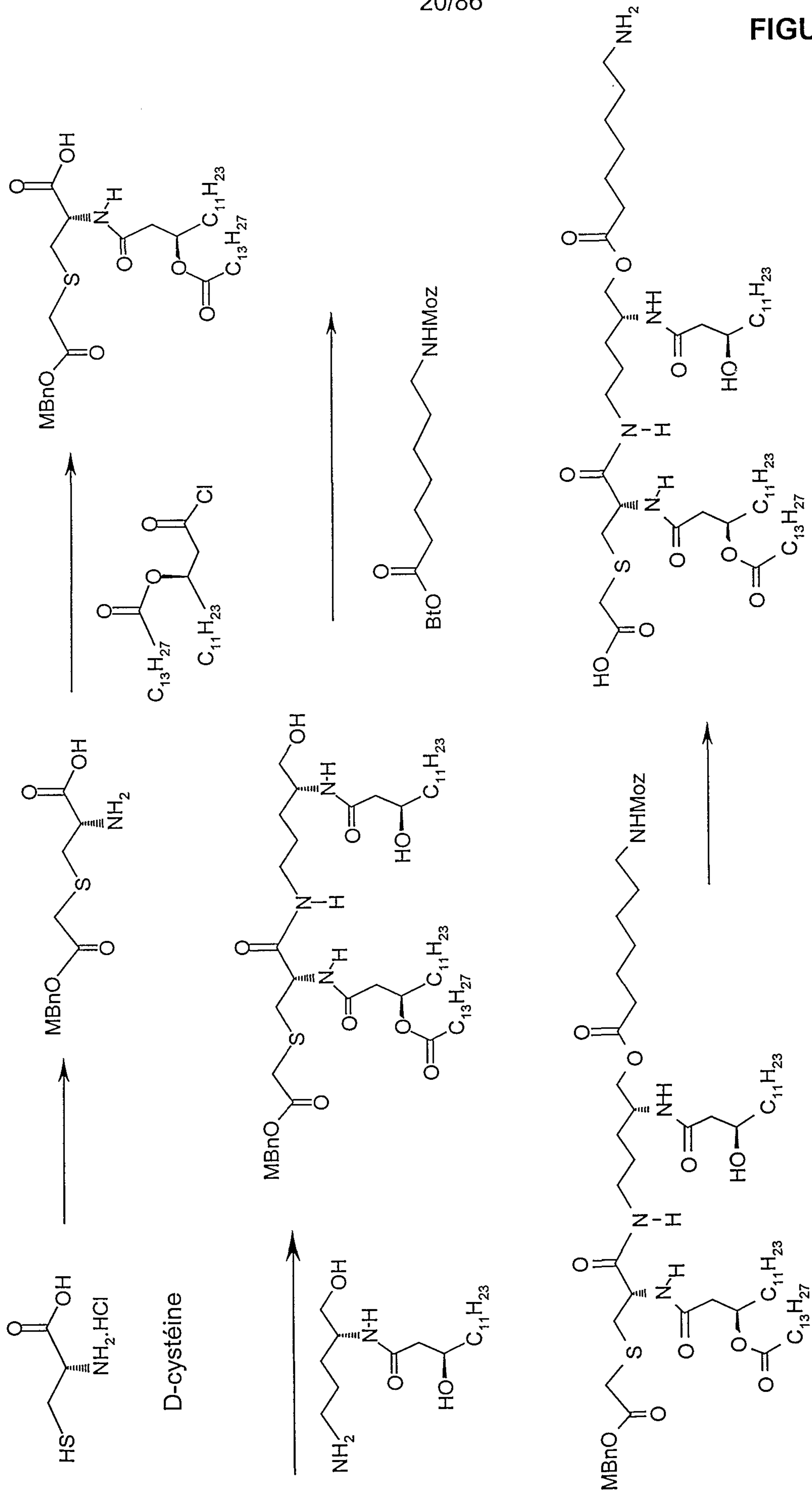




FIGURE 20

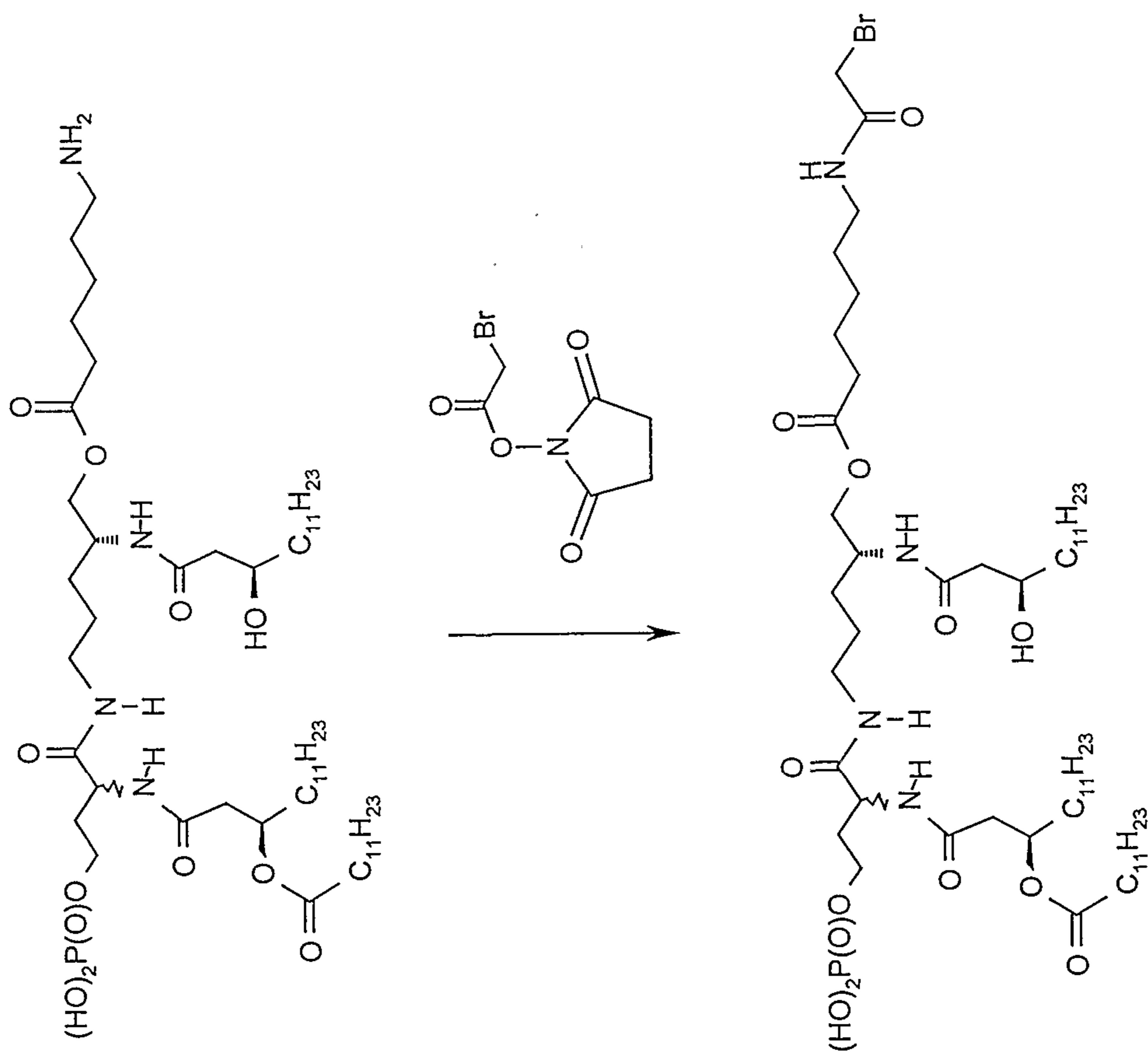


OM-212-AH1

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







OM-412-BA7

Boc = t-butyloxycarbonyle  
 Z = benzyloxycarbonyle  
 Bn = benzyle  
 Ph = phényle

23/86

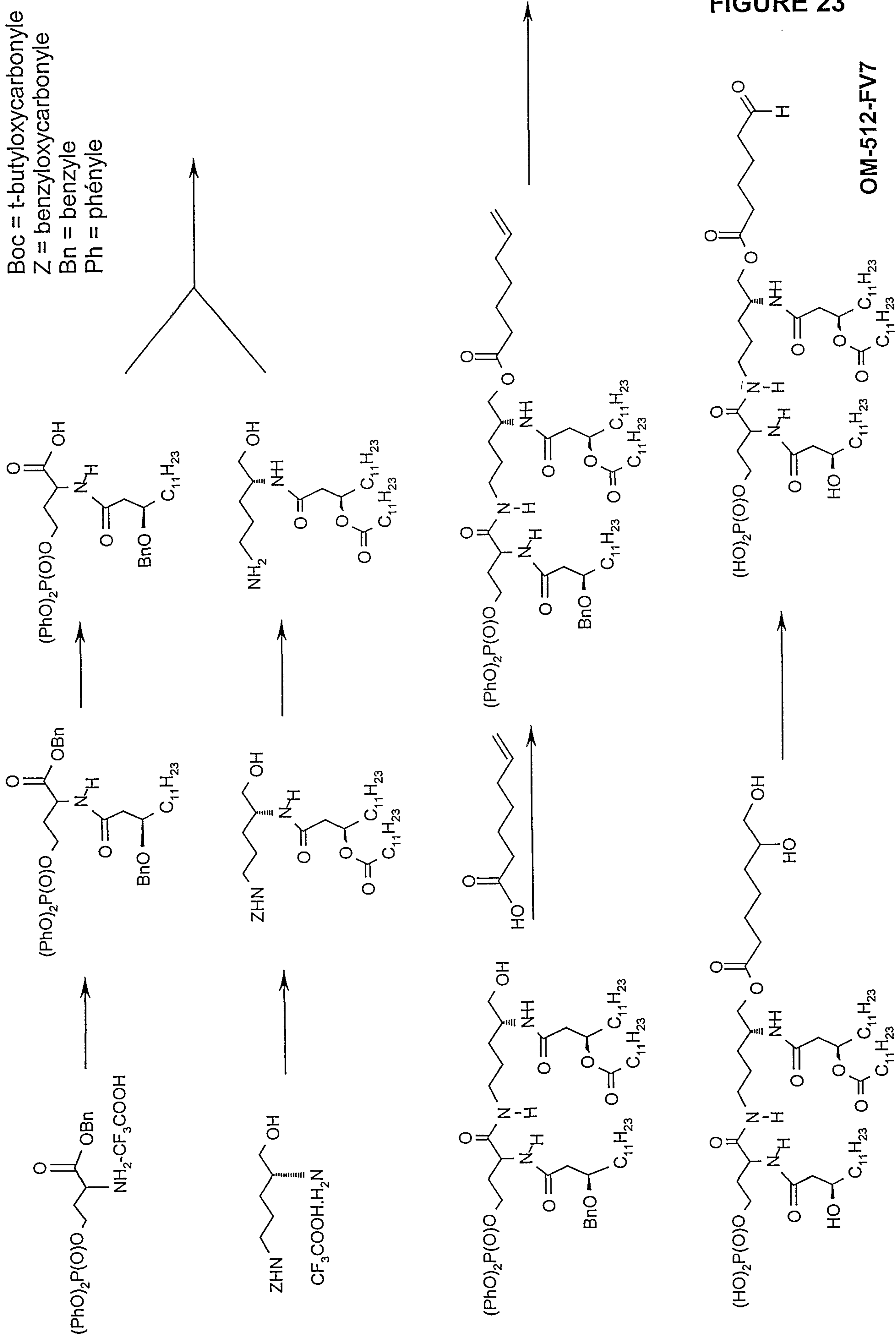


FIGURE 23

OM-512-FV7



24/86

FIGURE 24

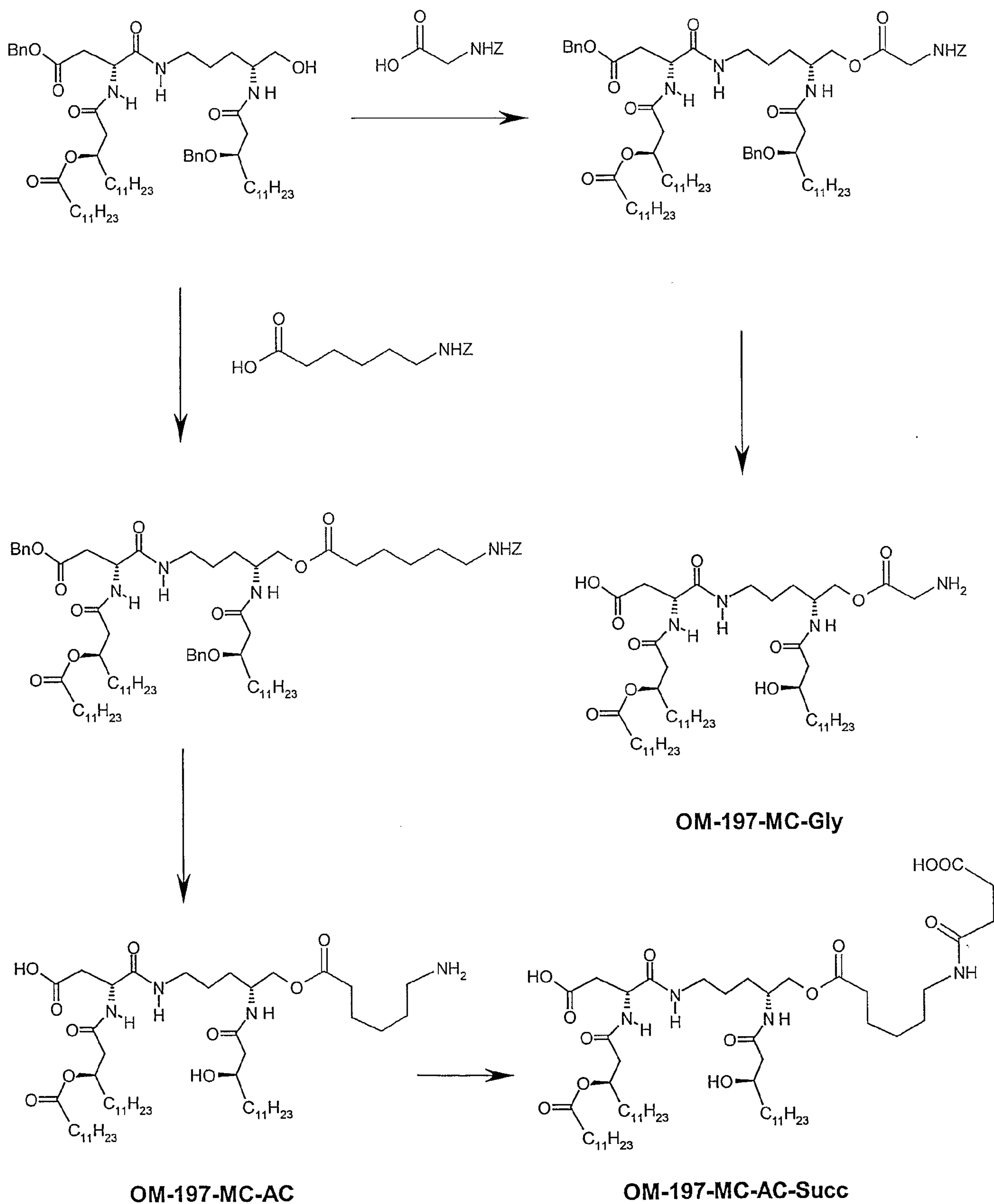


FIGURE 25

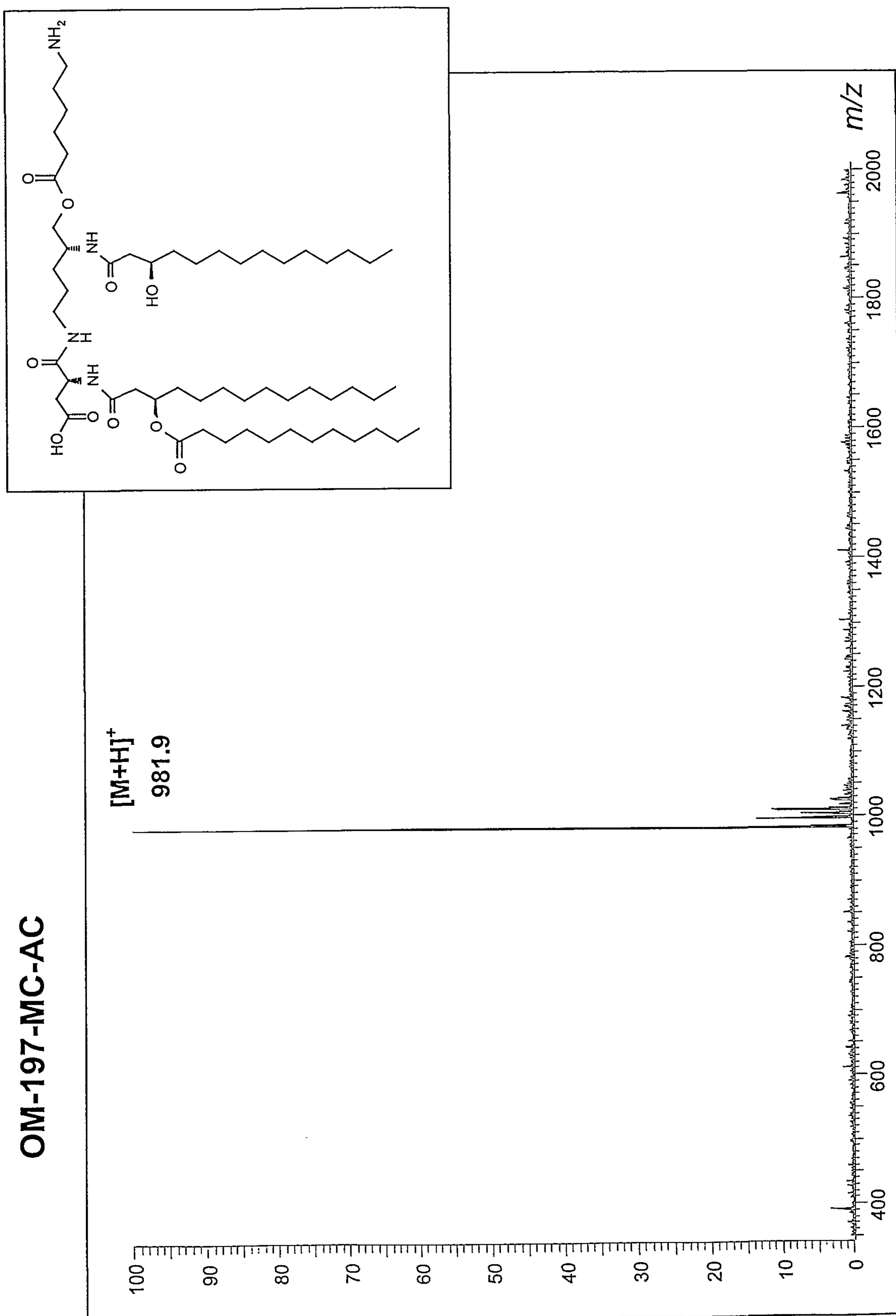
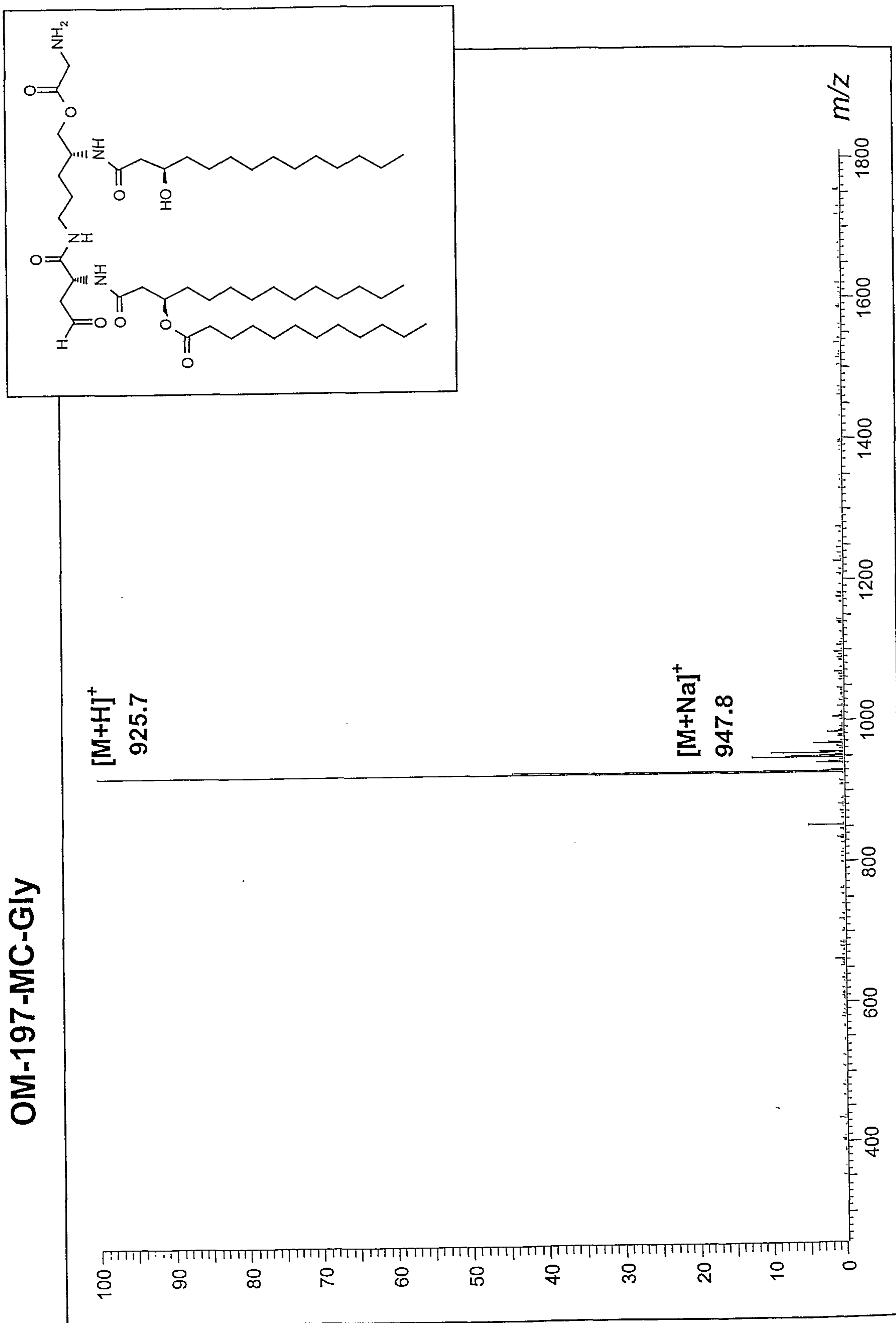


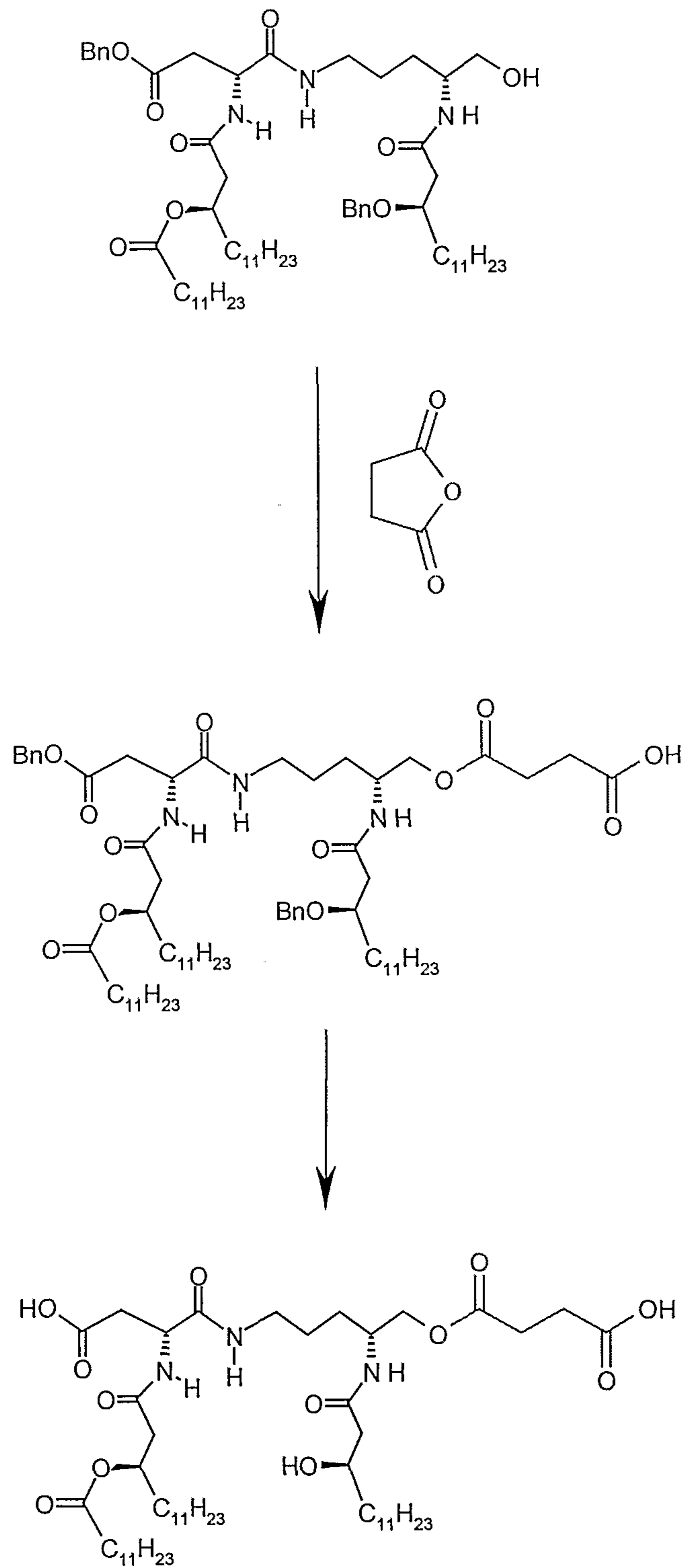


FIGURE 26



27/86

FIGURE 27



OM-197-MC-Succ





29/86

FIGURE 29

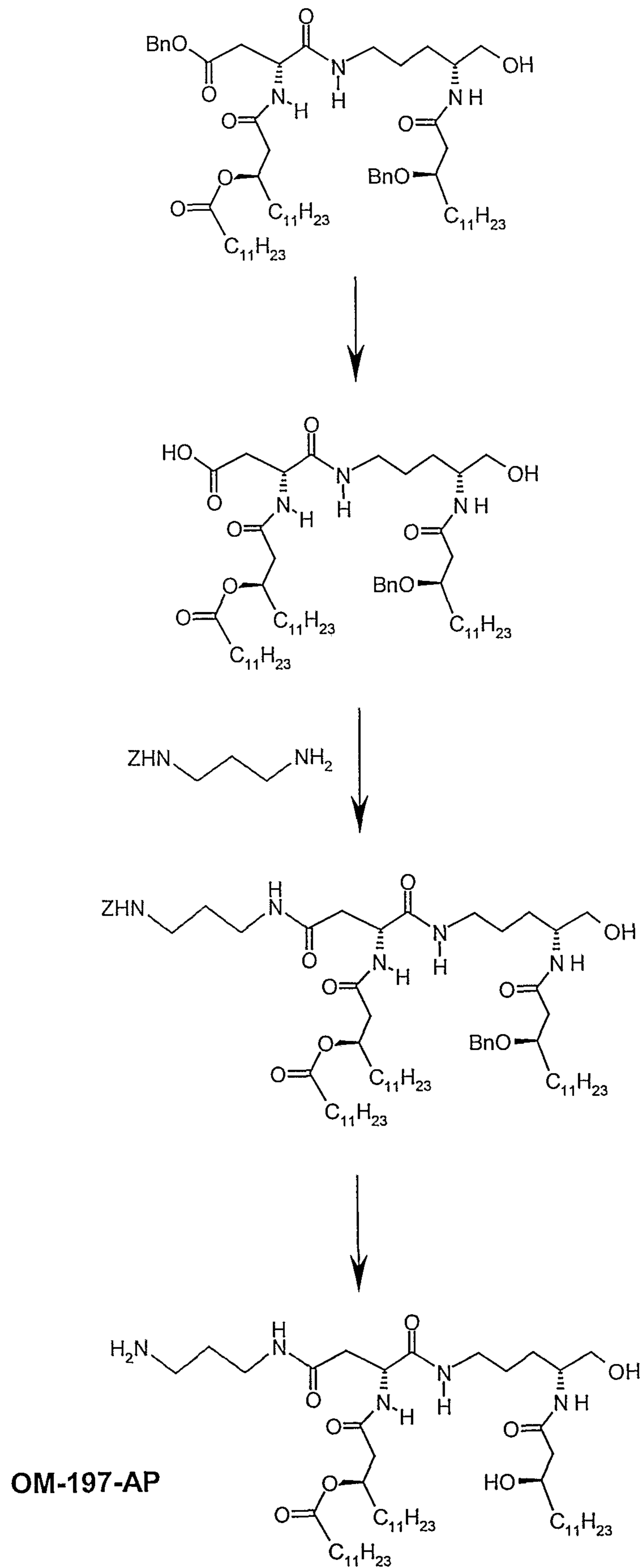
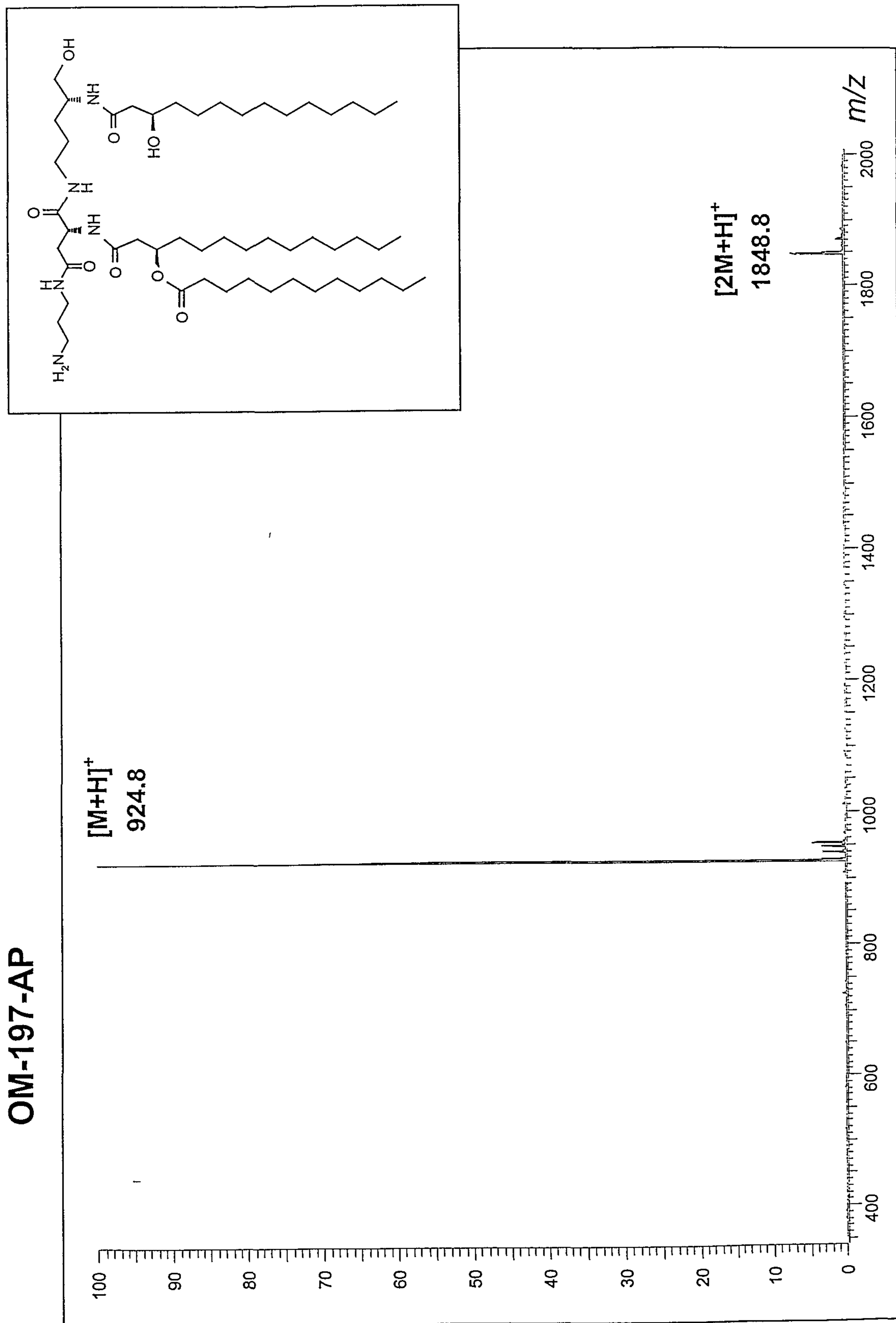
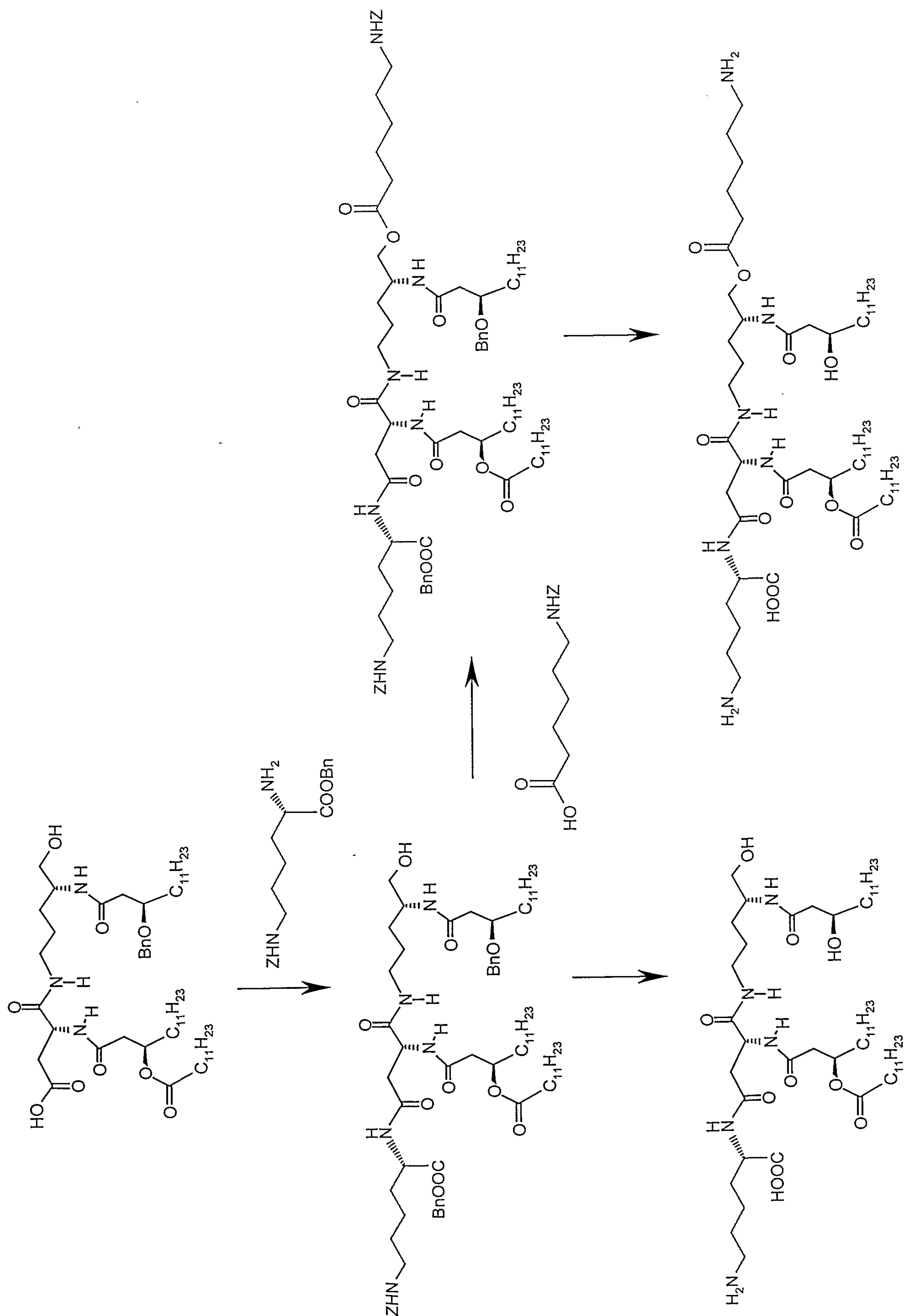




FIGURE 30

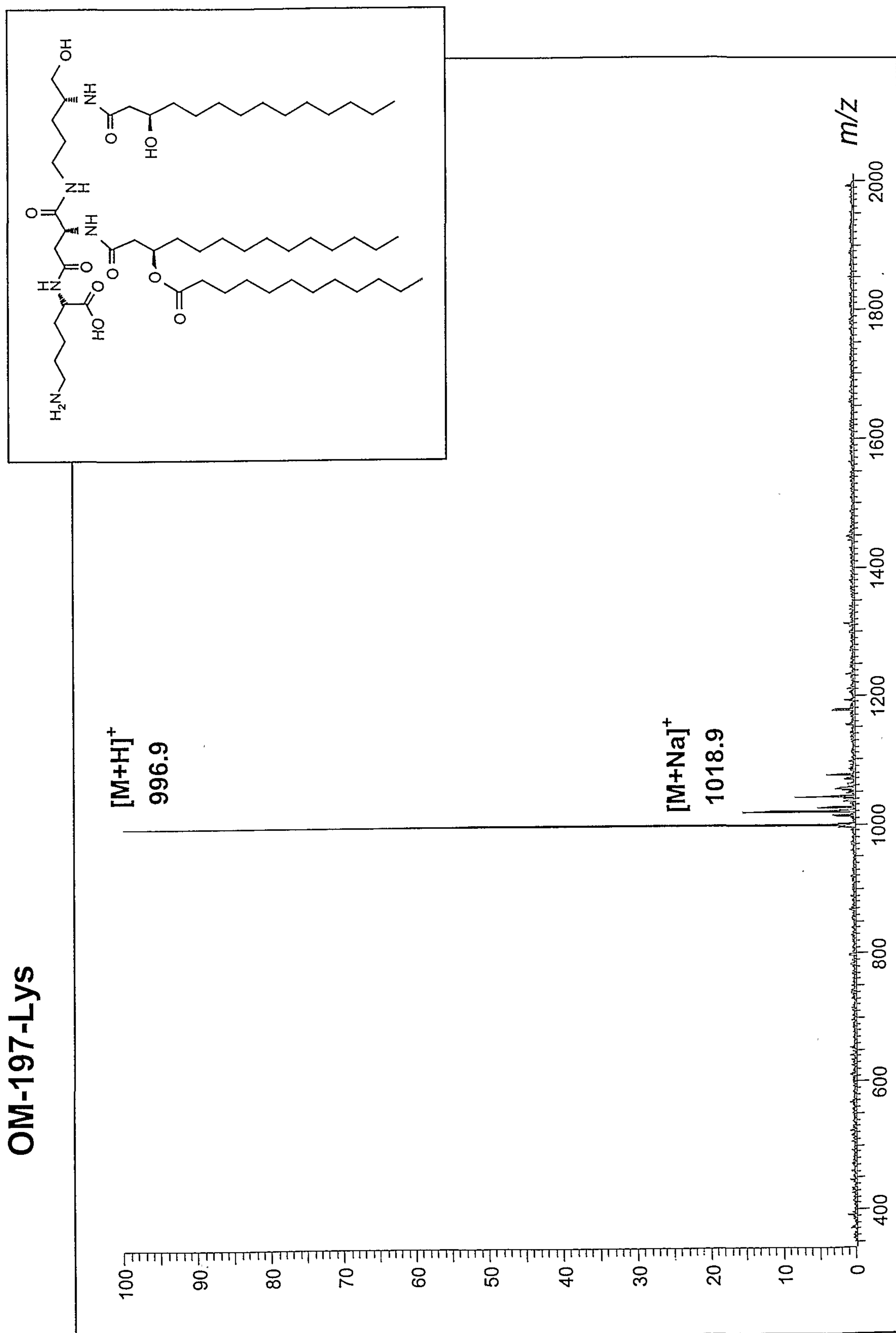




OM-197-Lys-AC

OM-197-Lys





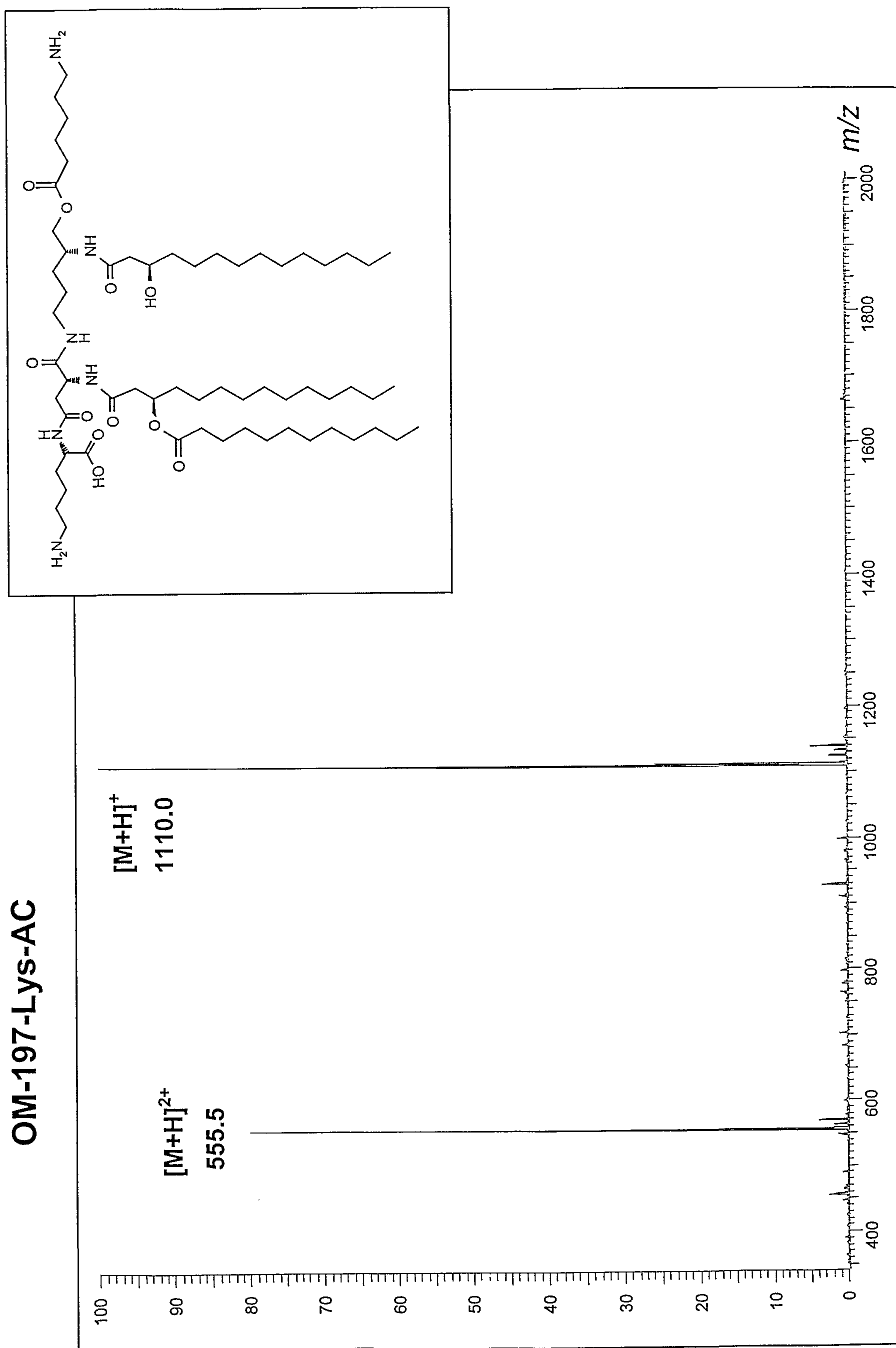
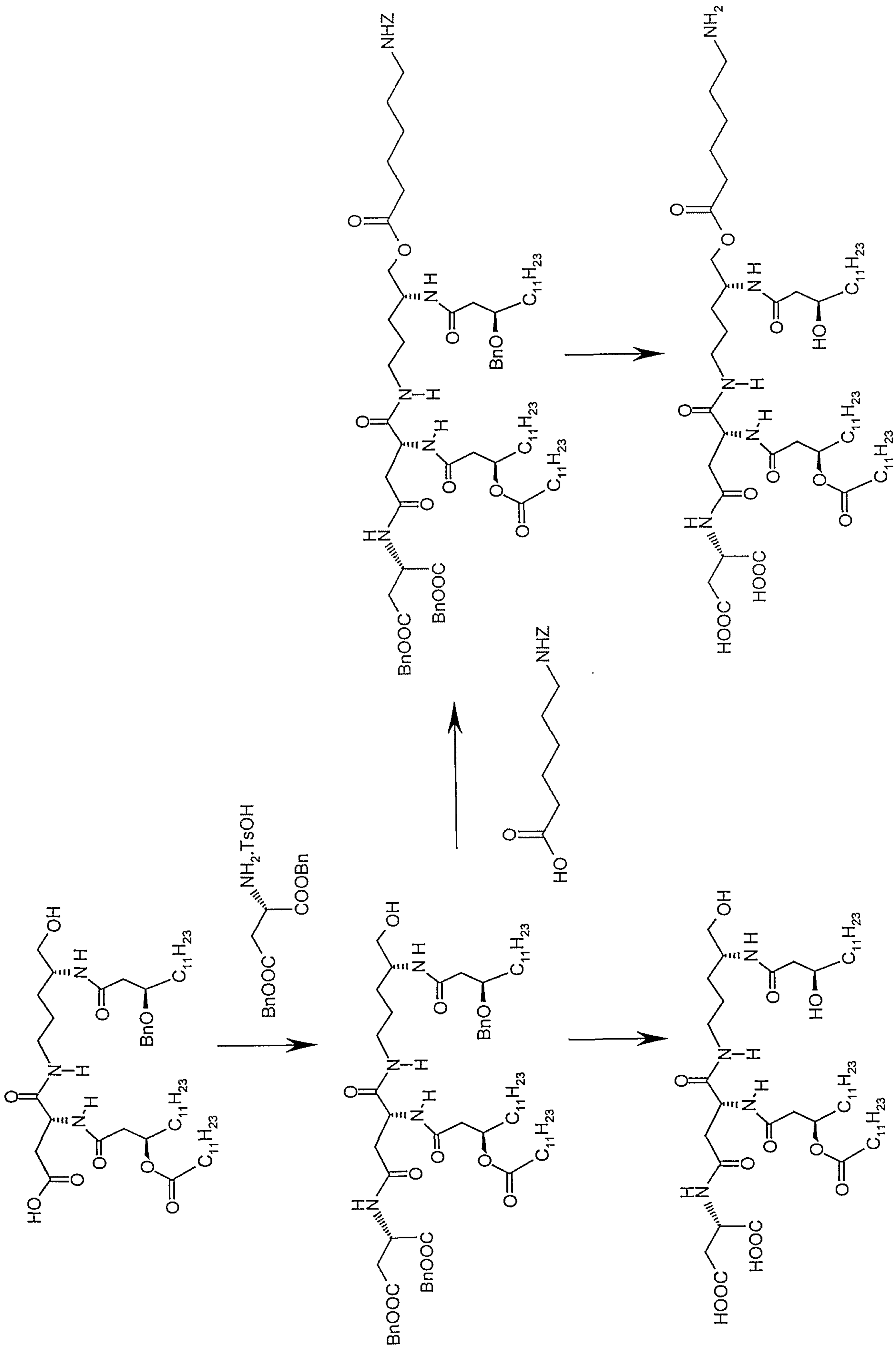




FIGURE 34



OM-197-Asp-AC

OM-197-Asp

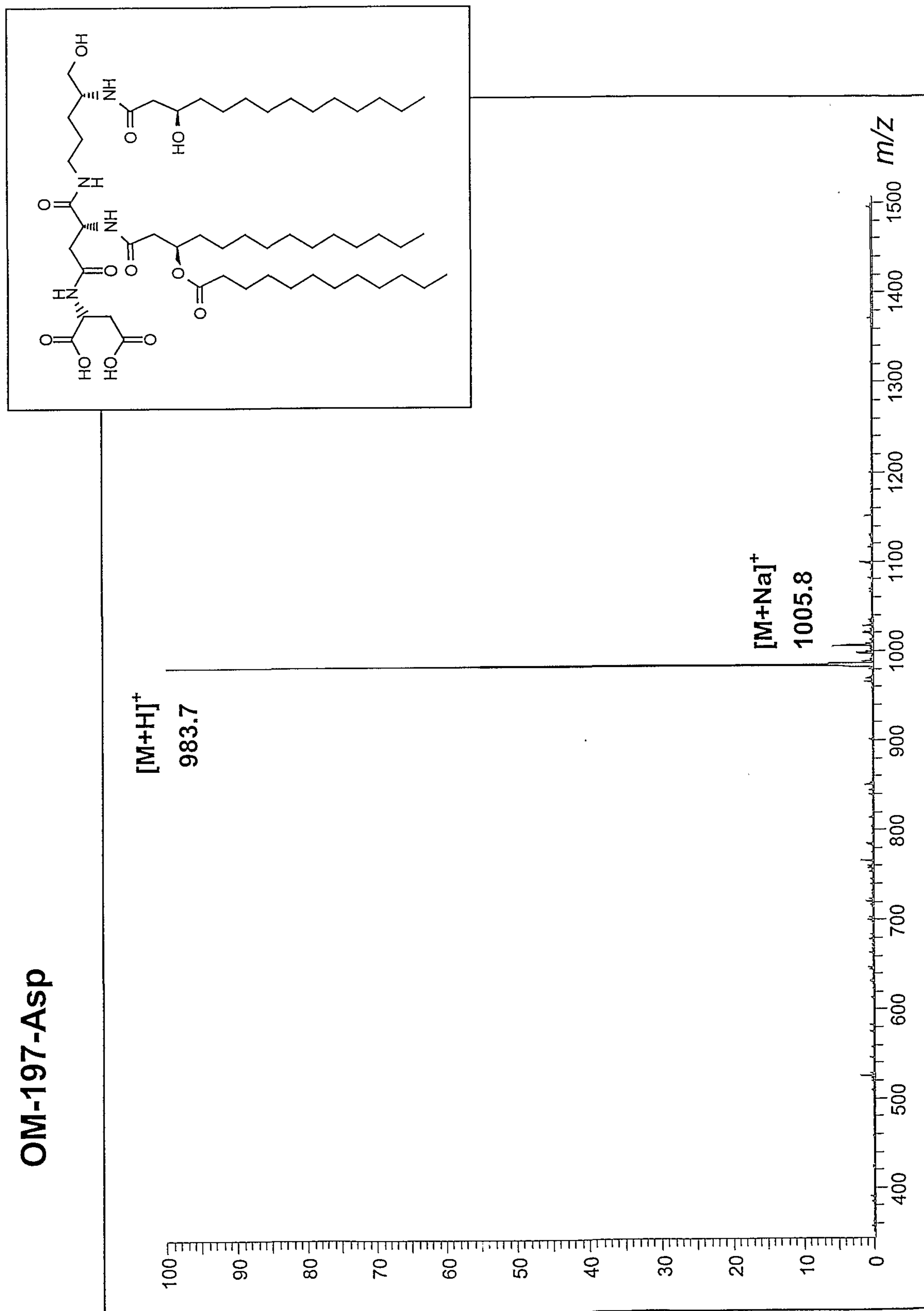
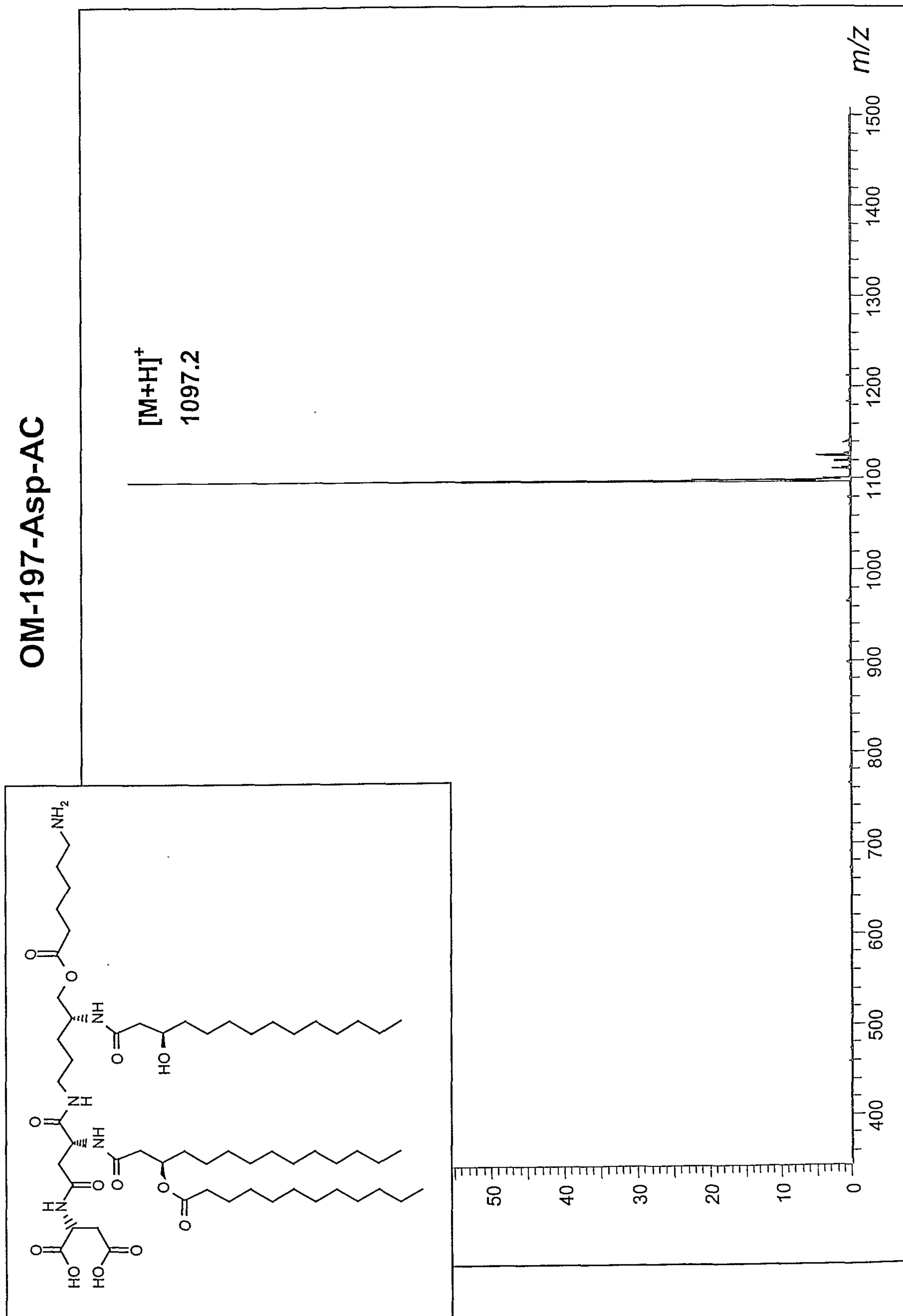


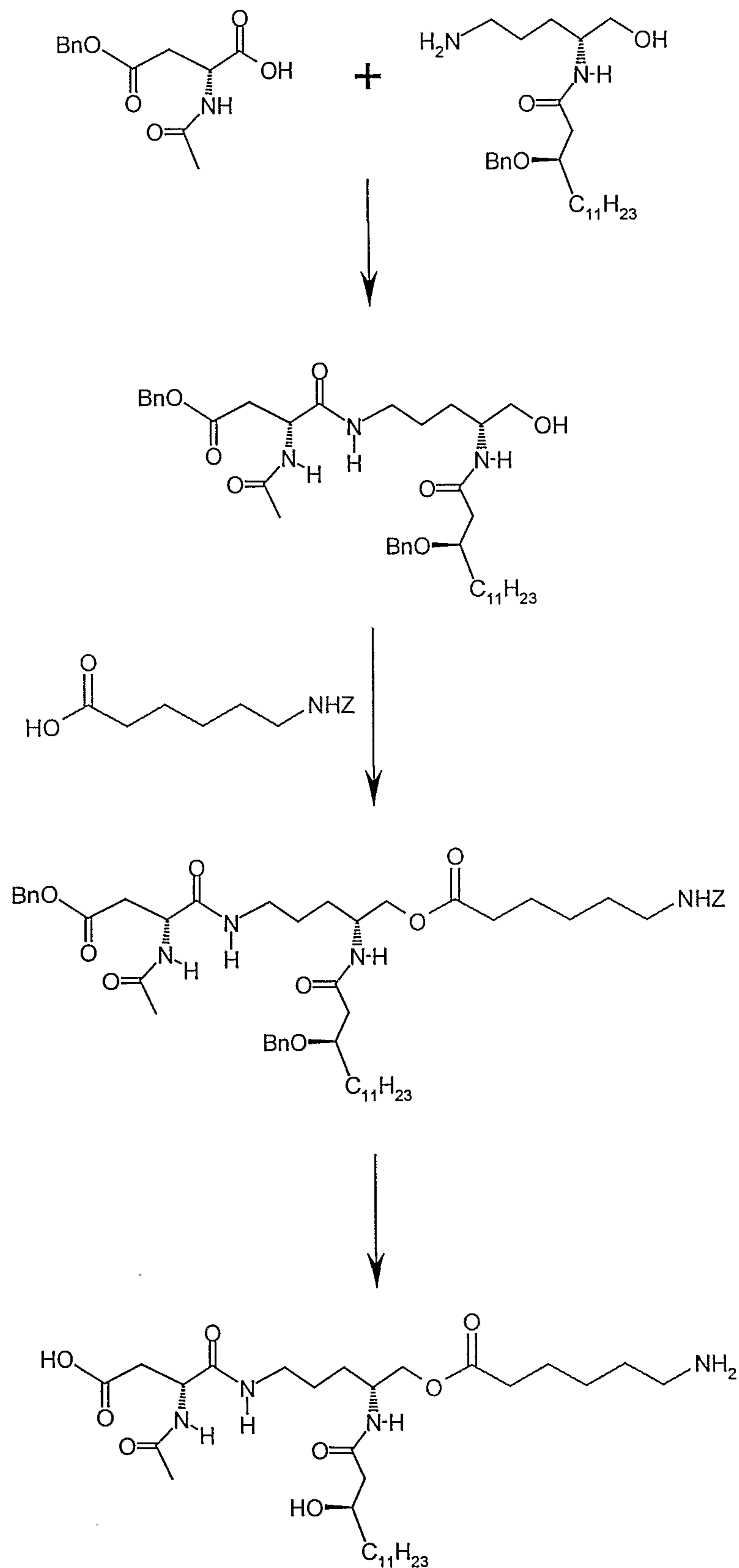


FIGURE 36



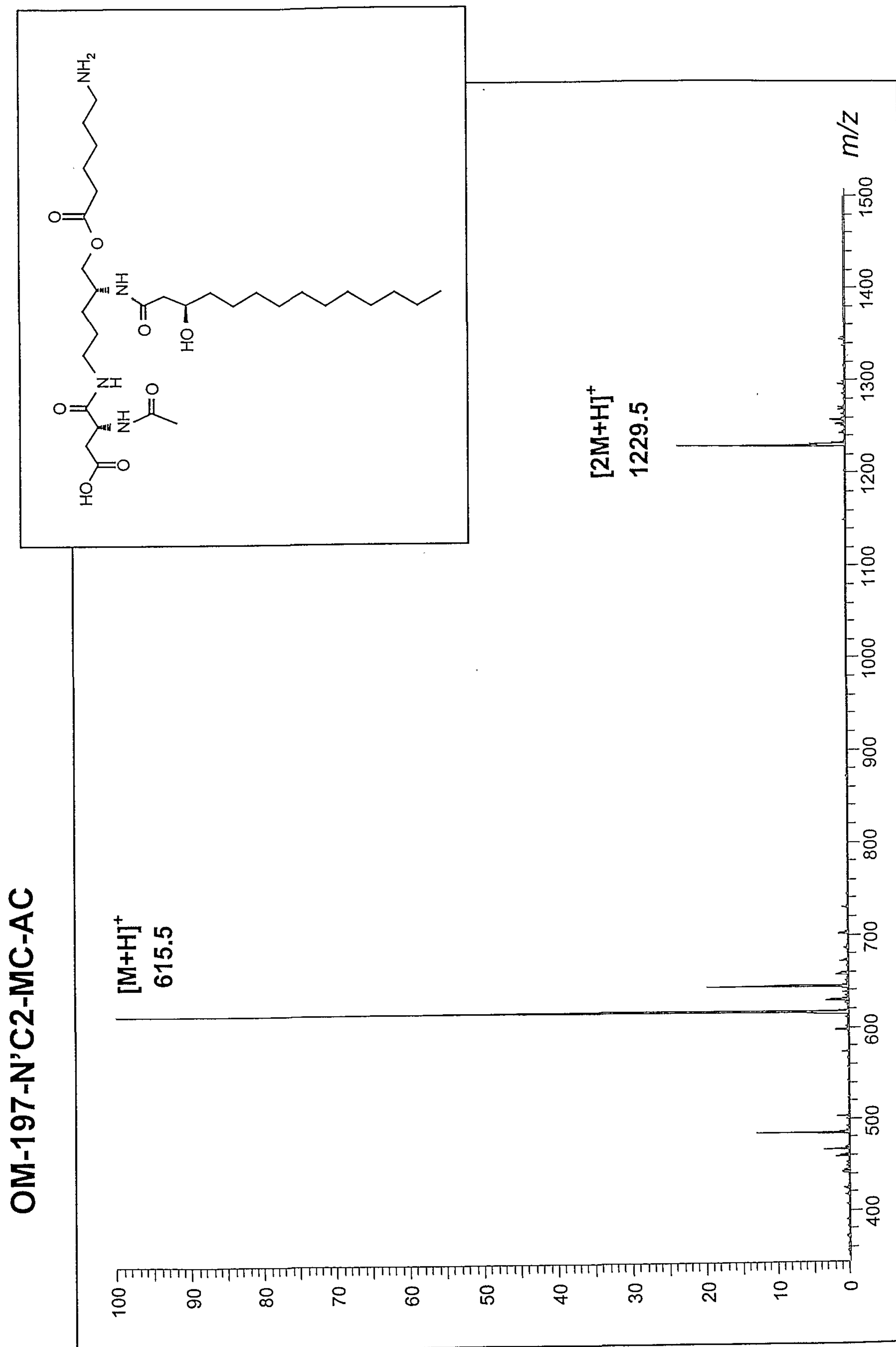
37/86

FIGURE 37



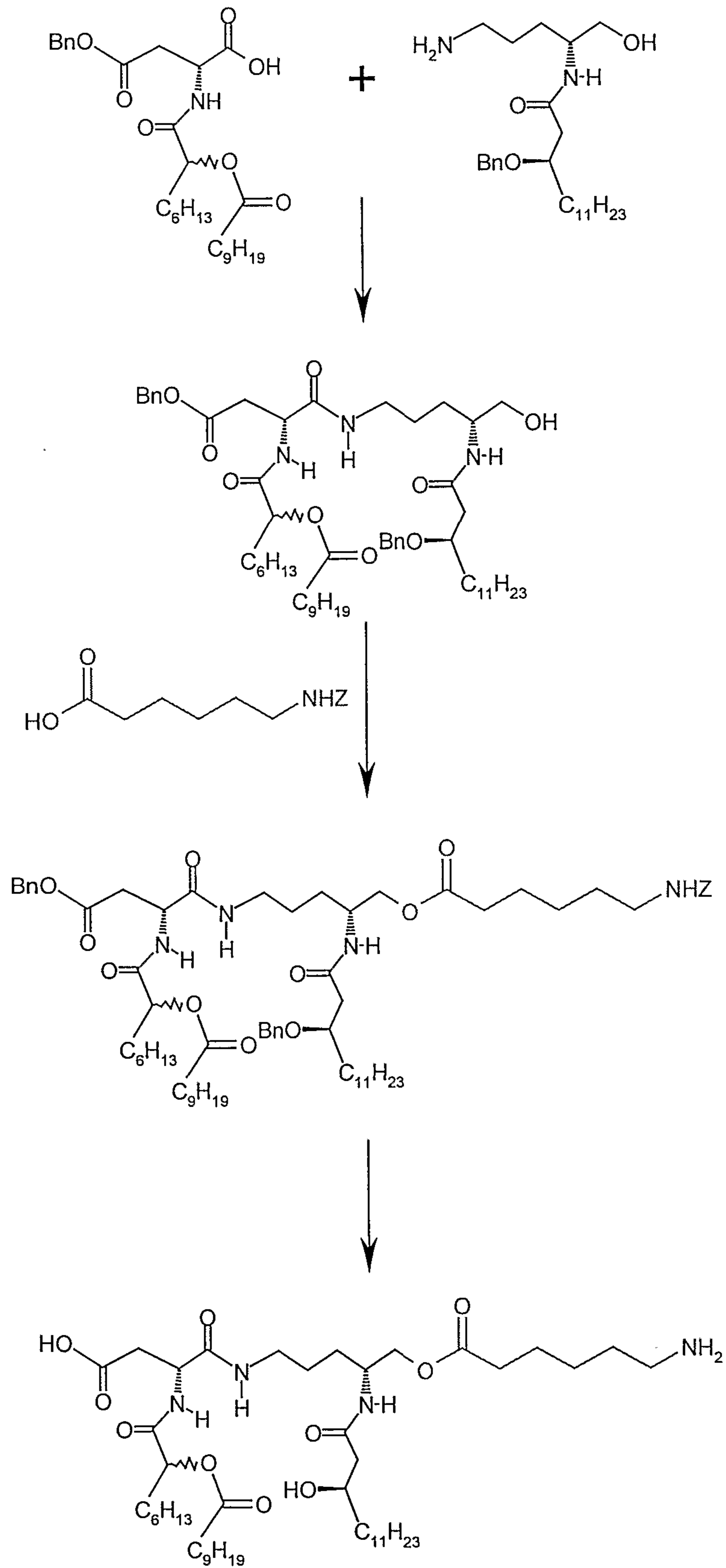
OM-197-N'C2-MC-AC





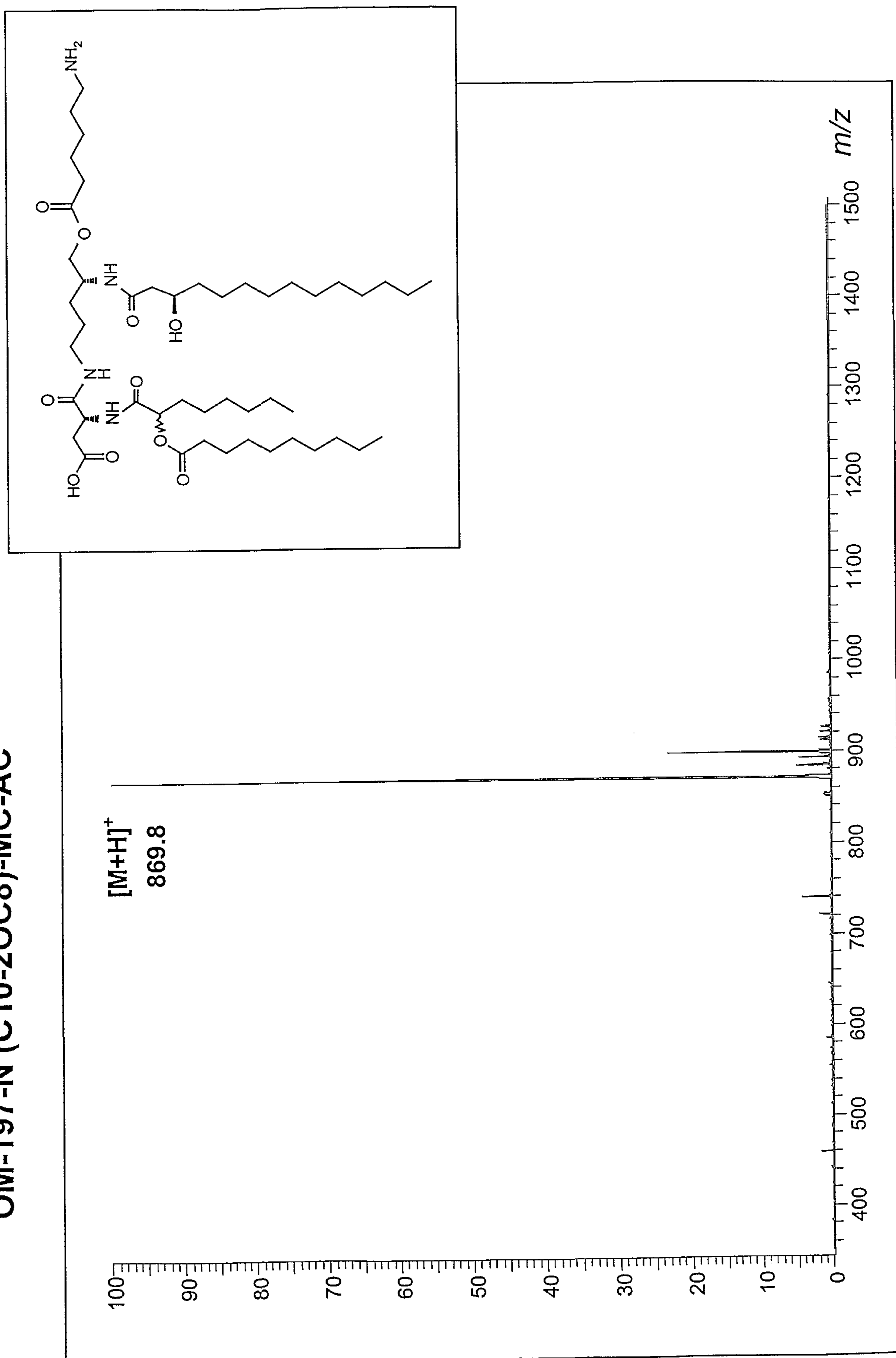
39/86

FIGURE 39



OM-197-N'(C10-20C8)-MC-AC



**OM-197-N'(C10-2OC8)-MC-AC**

41/86

FIGURE 41

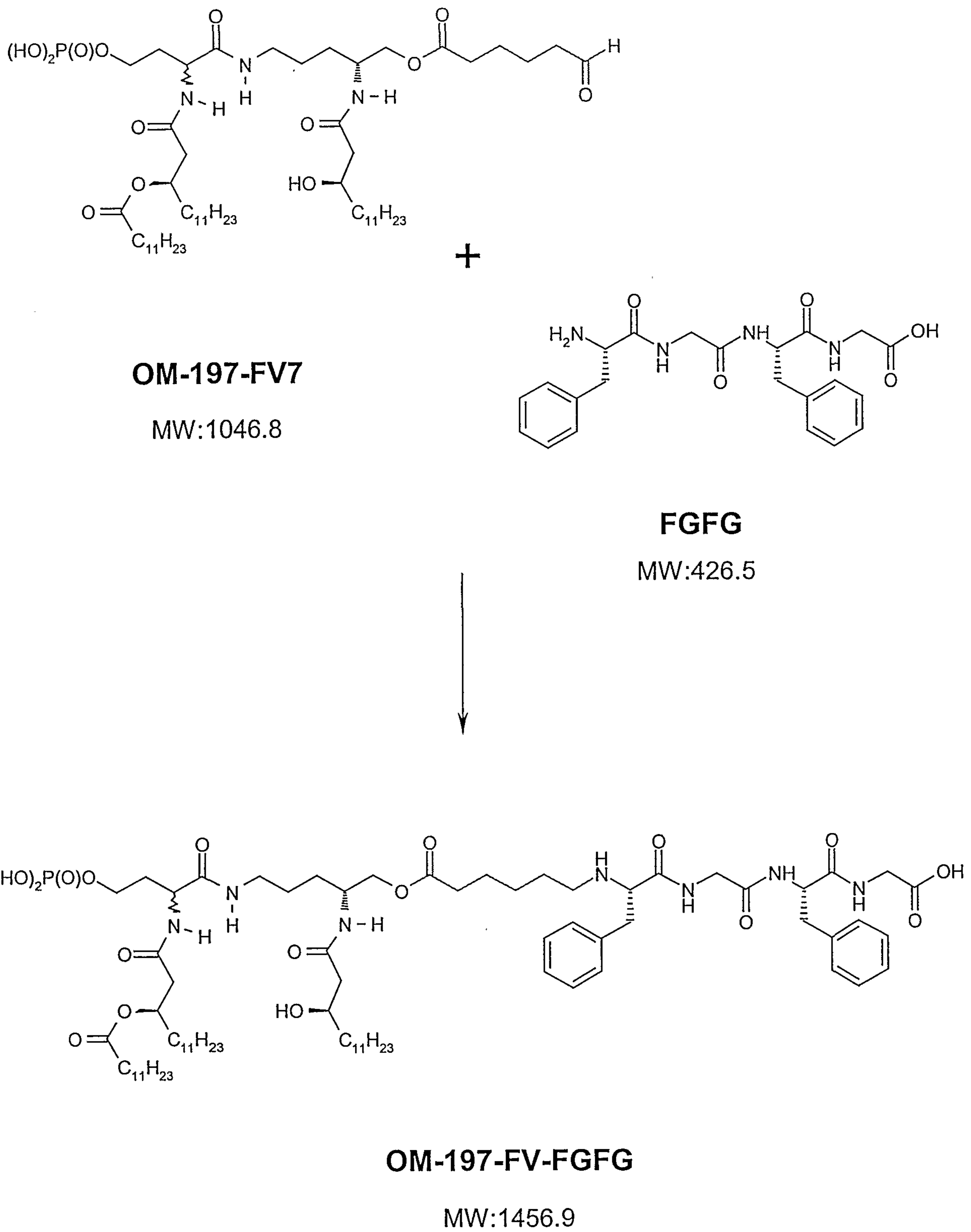




FIGURE 42

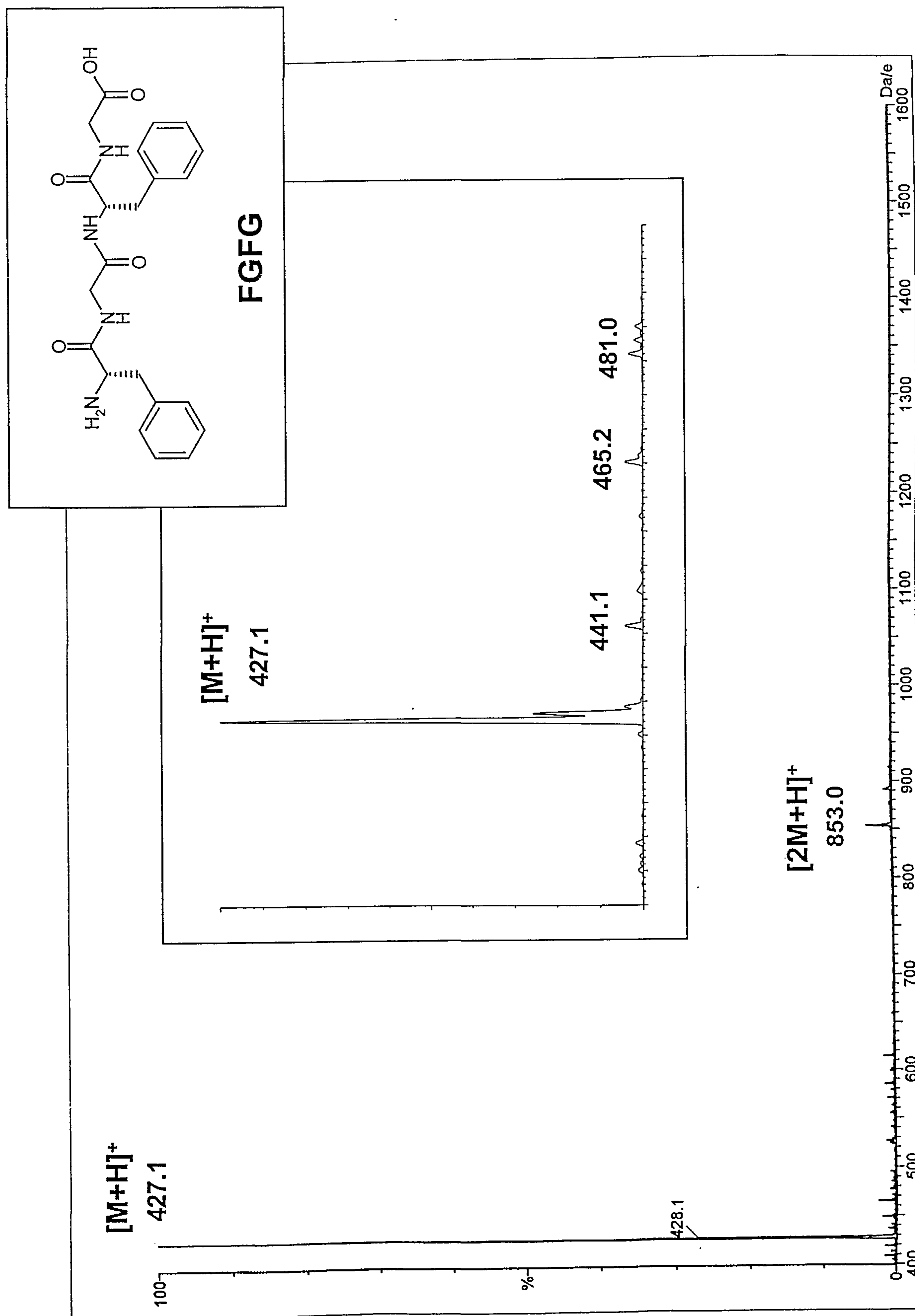


FIGURE 43

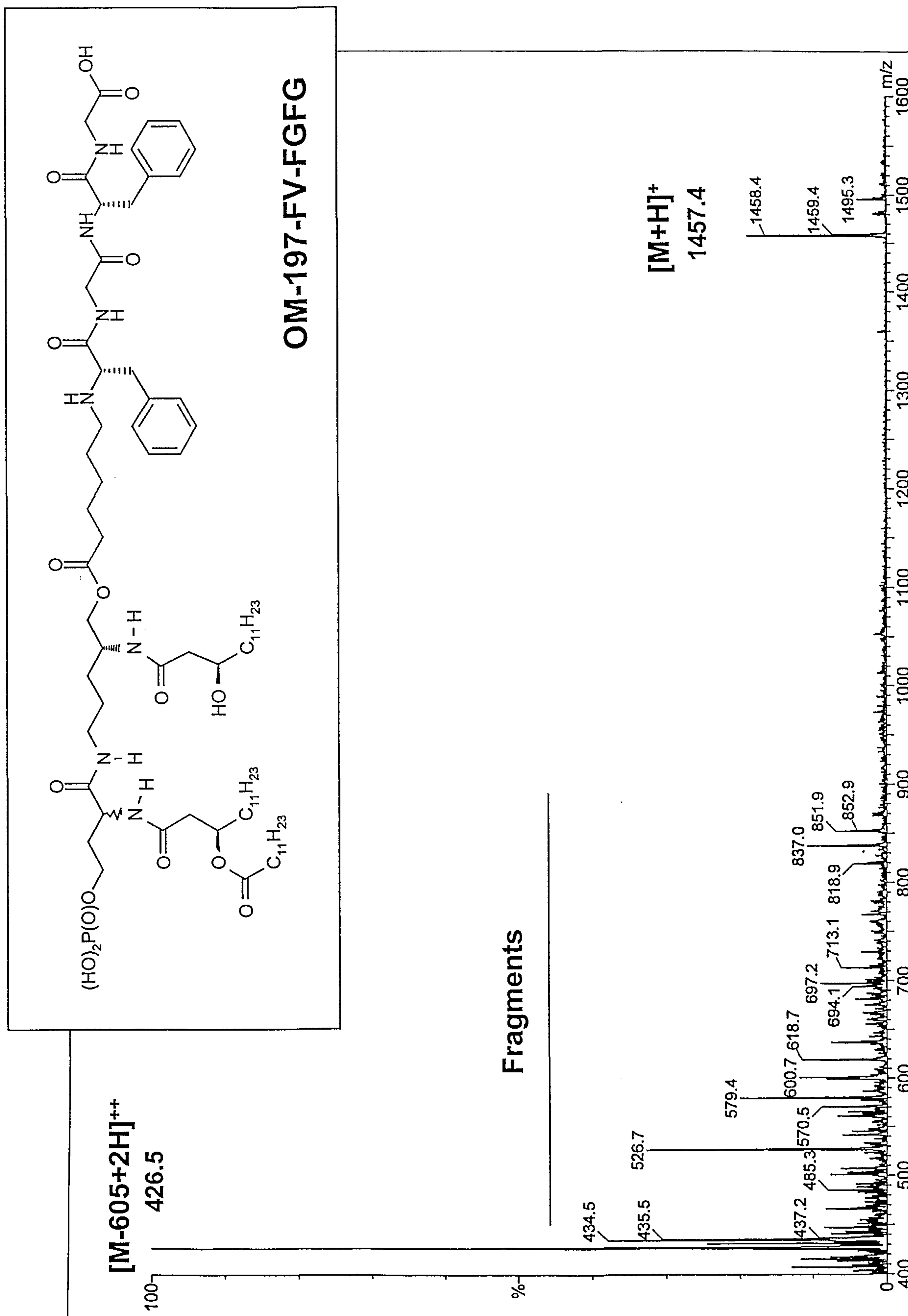




FIGURE 44

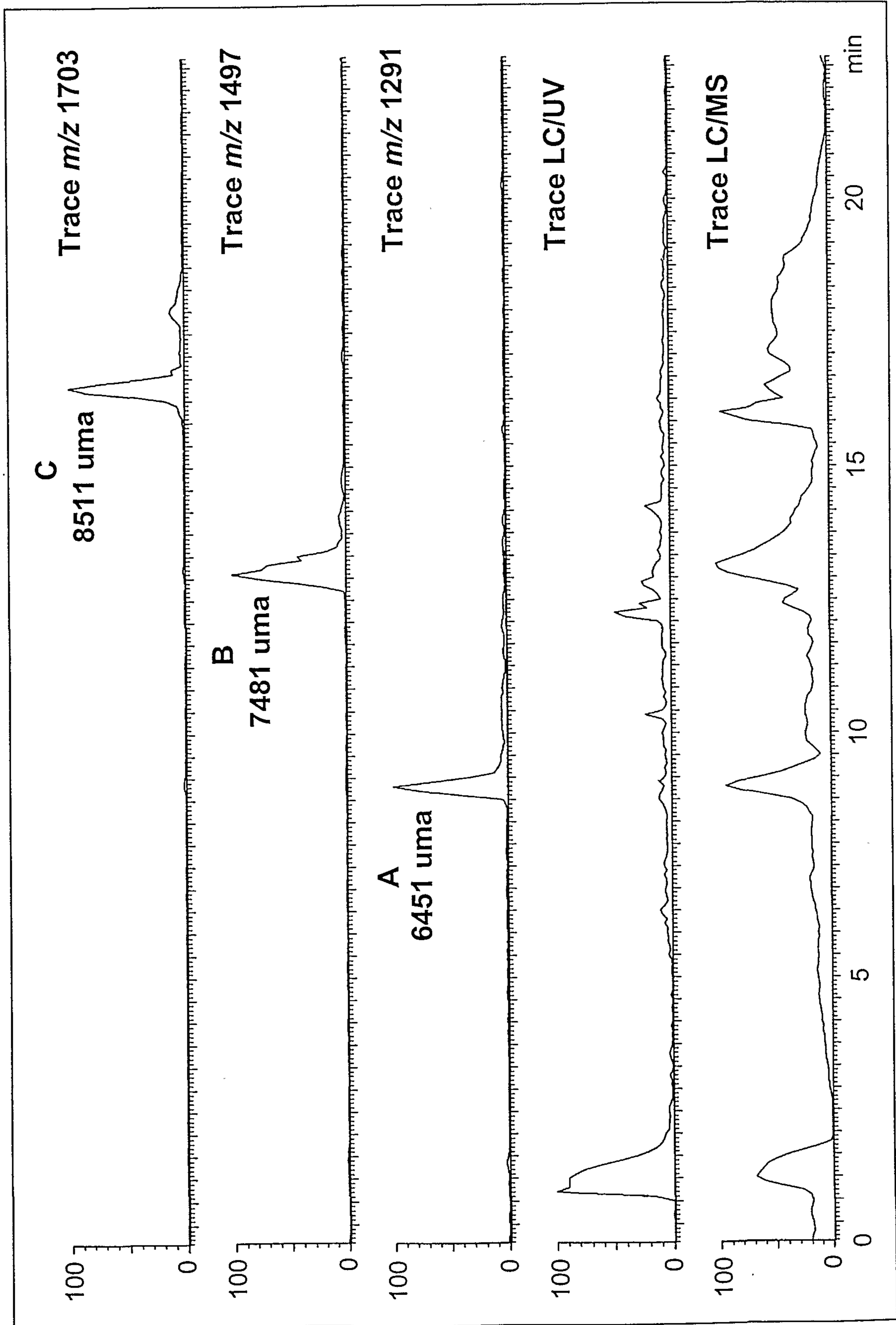


FIGURE 45

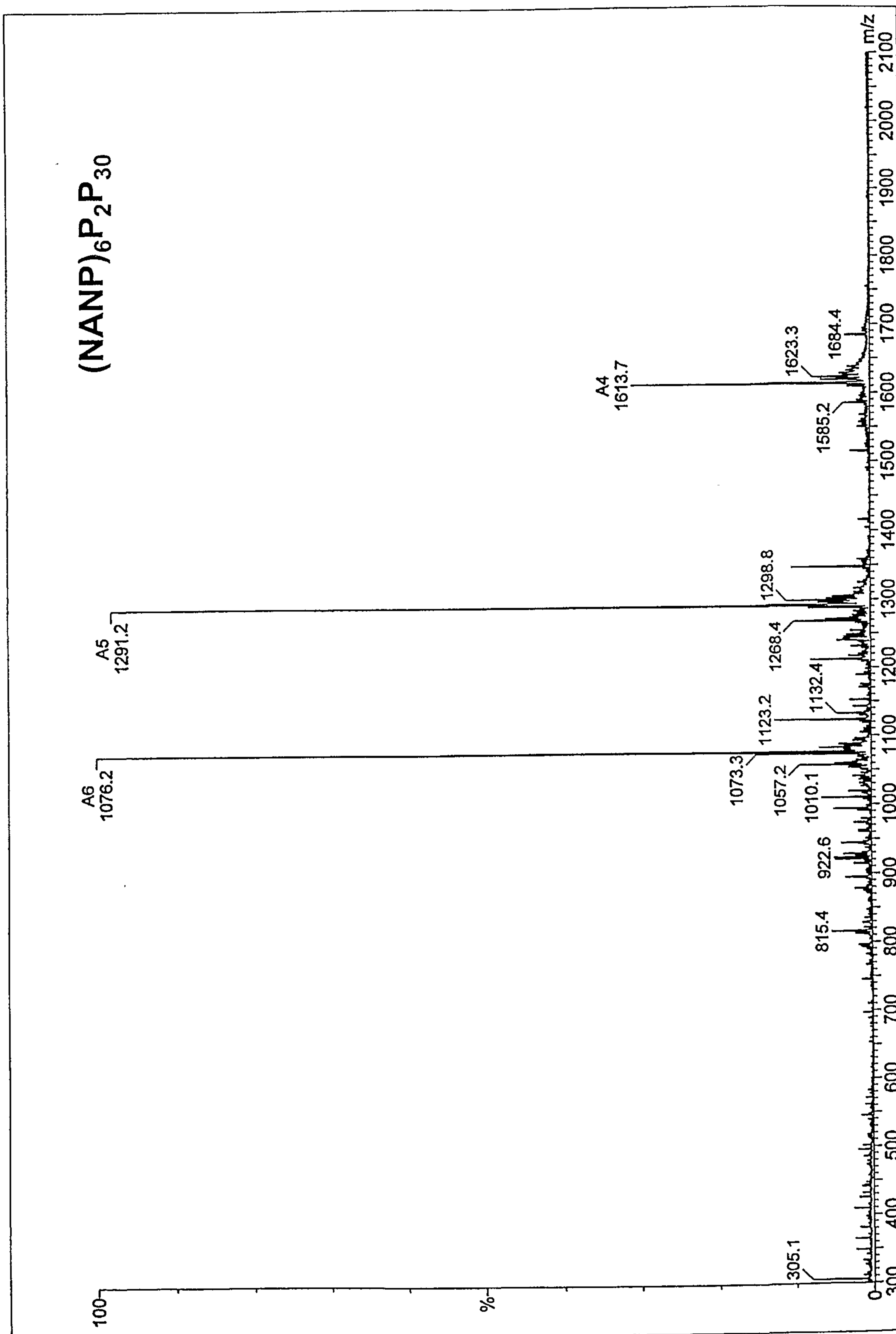




FIGURE 46

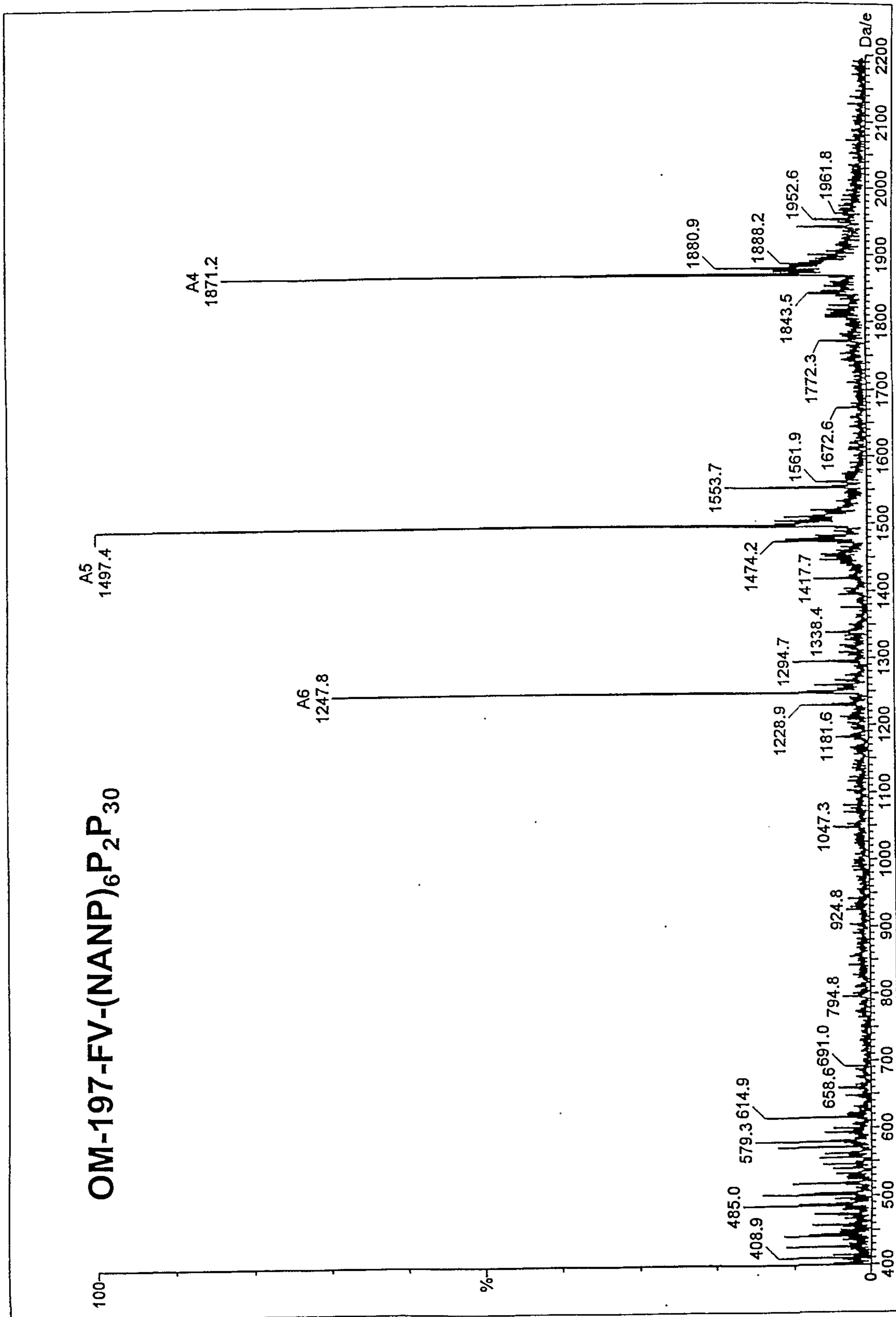


FIGURE 47

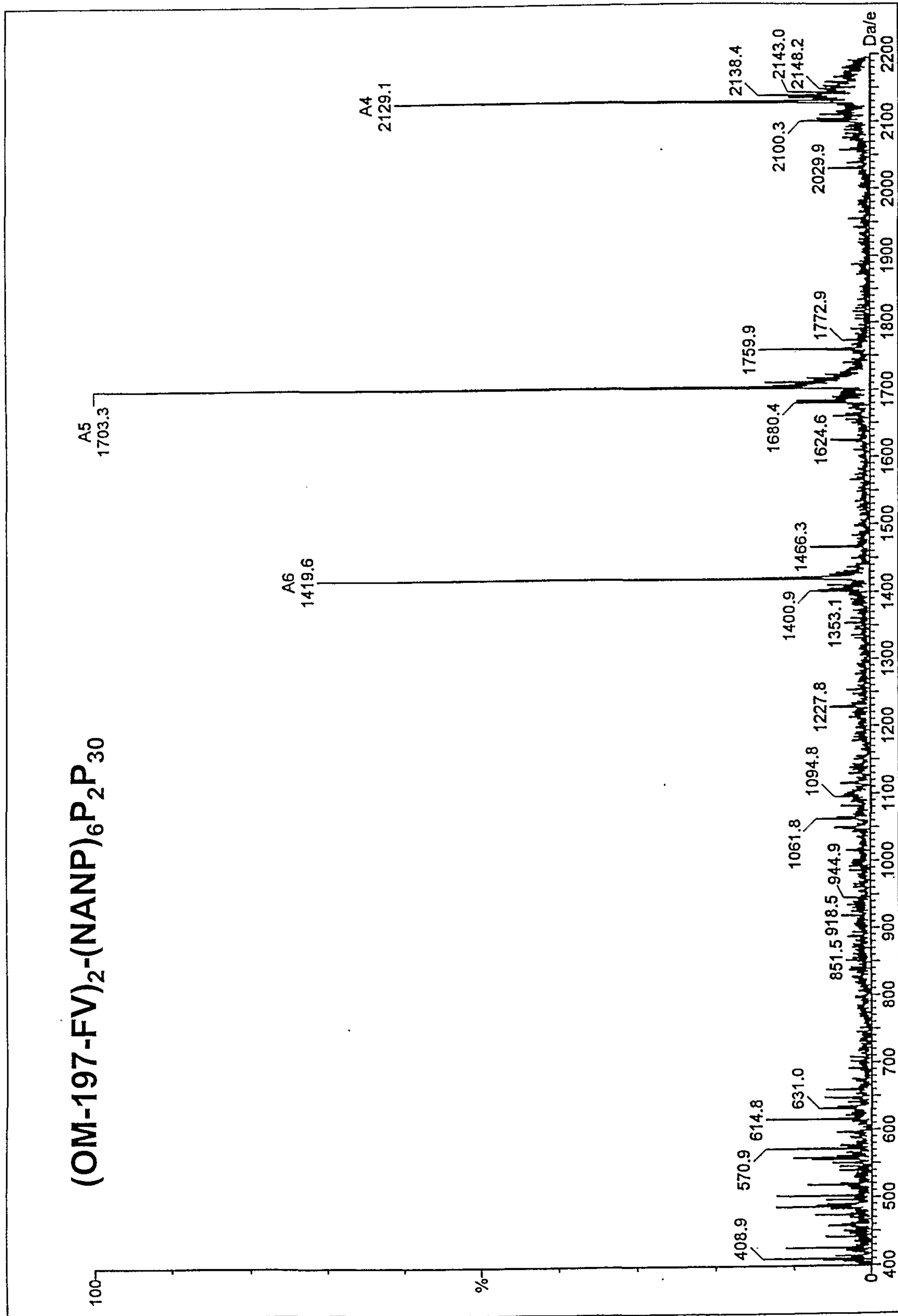




FIGURE 48

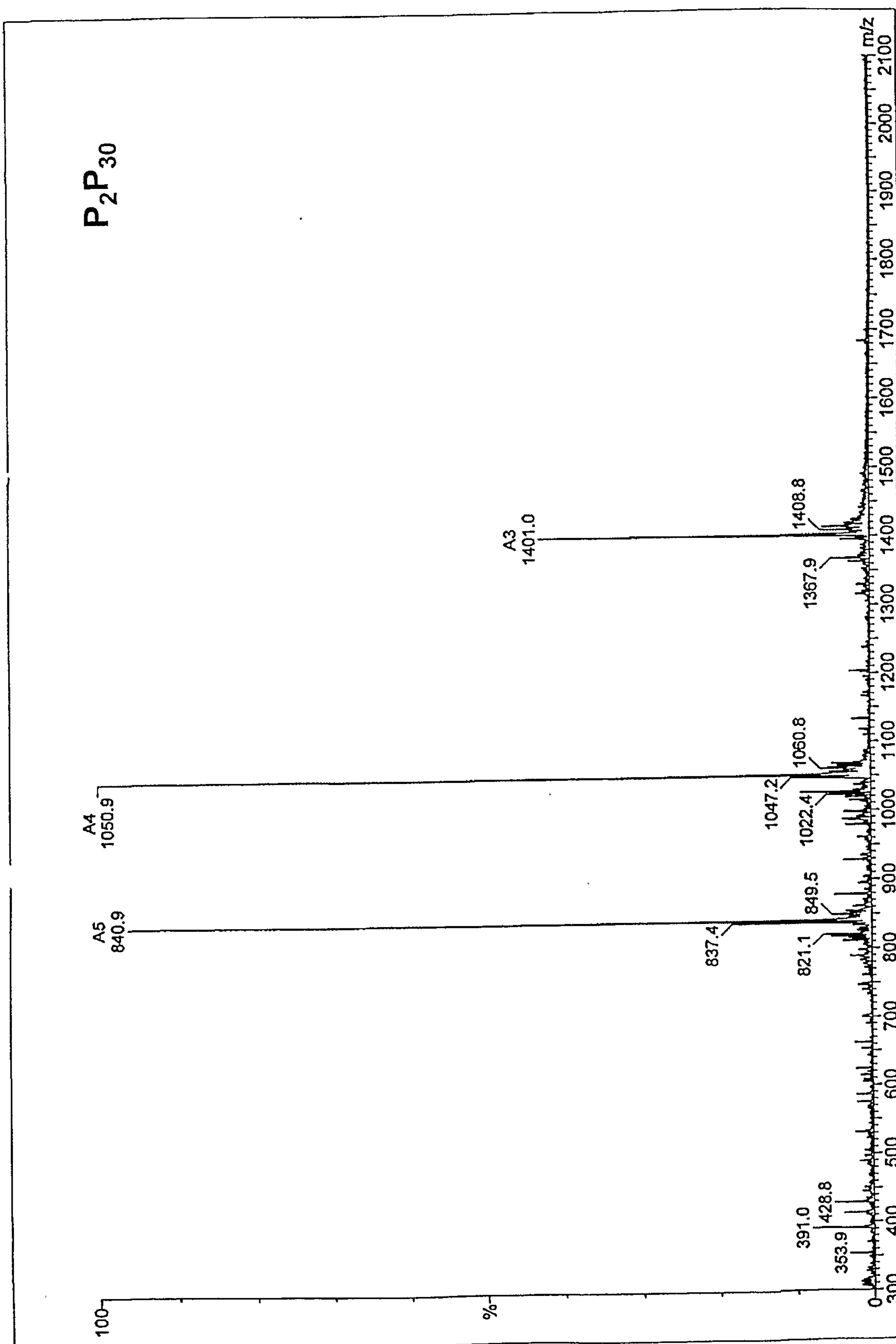
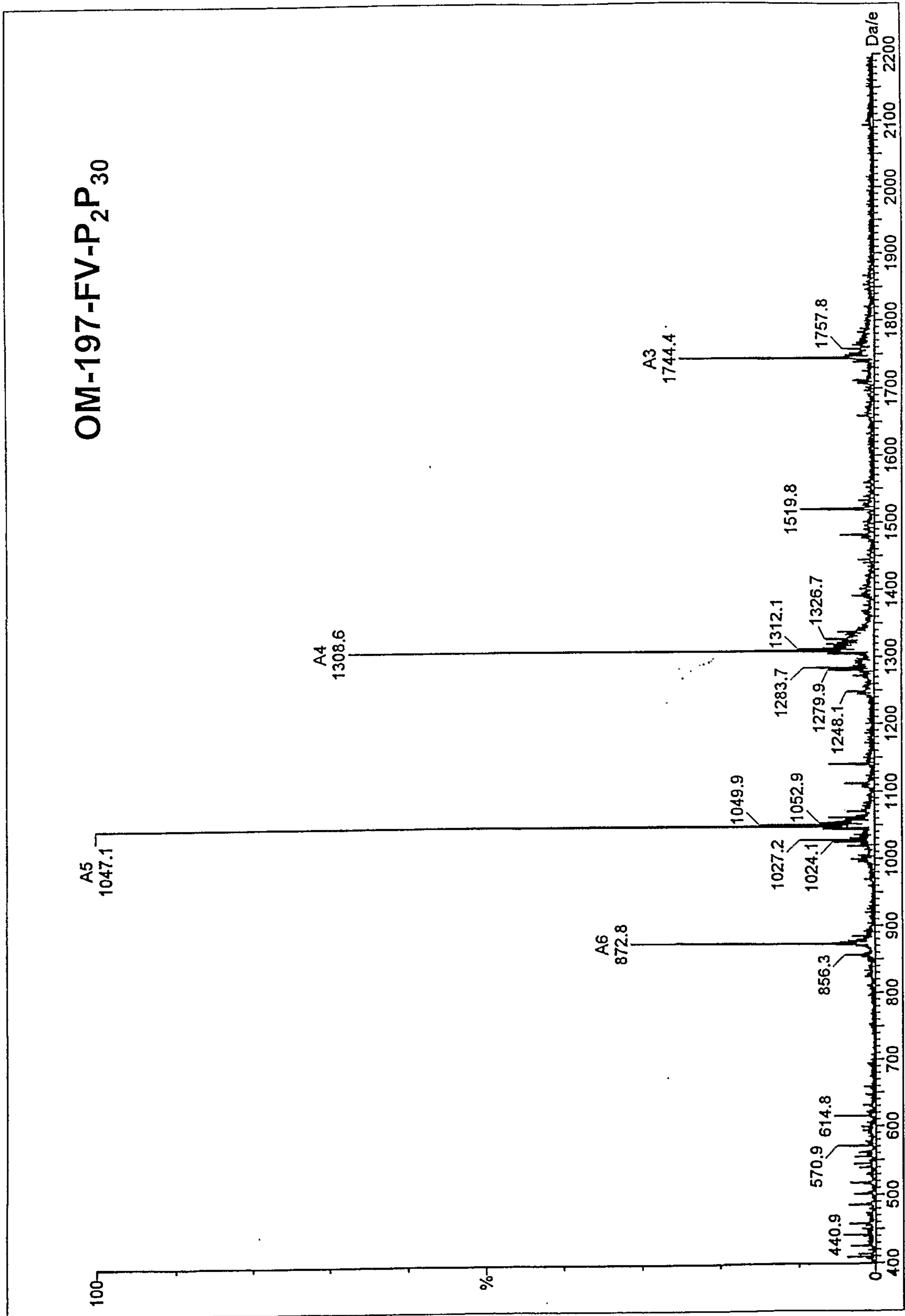
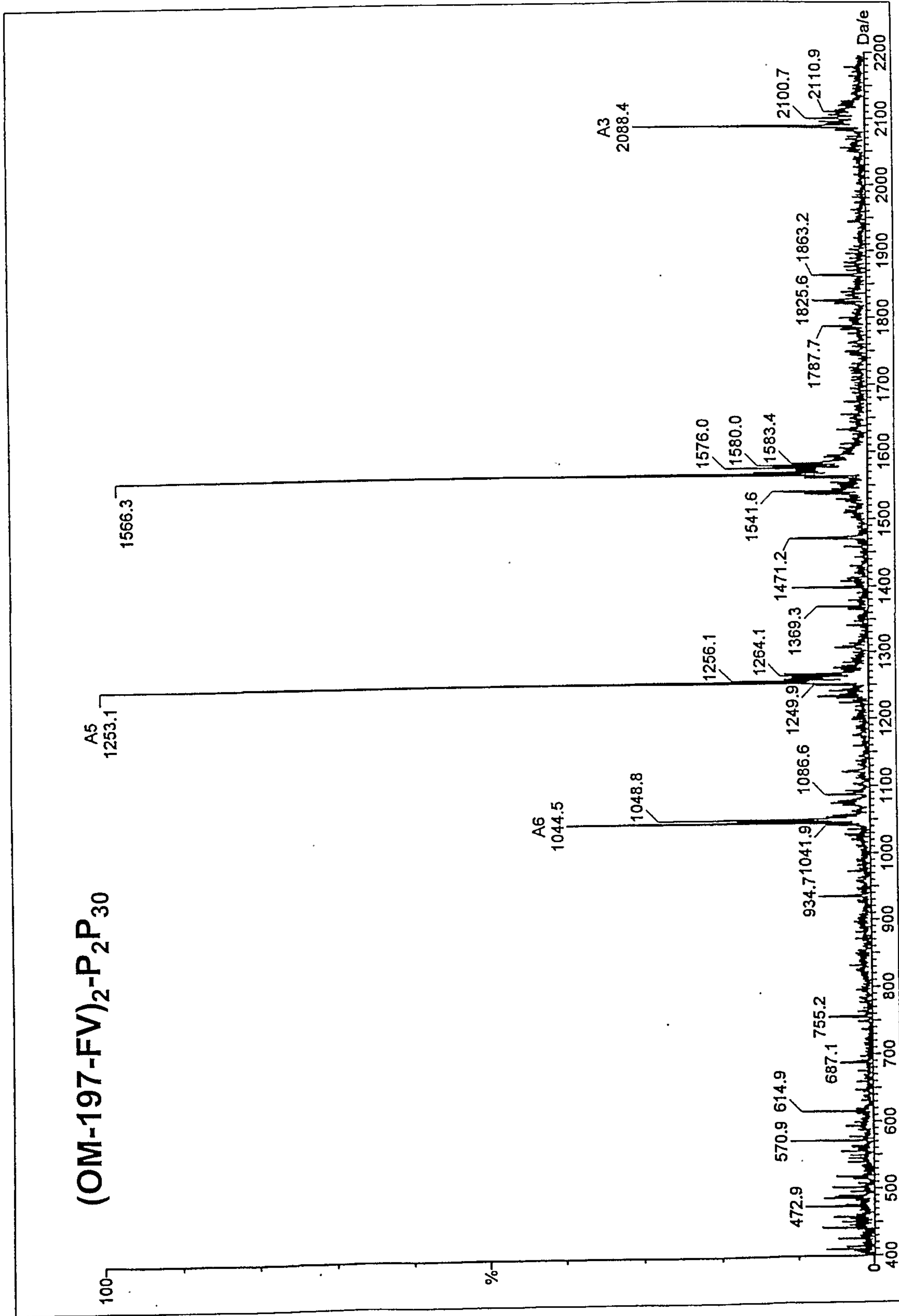


FIGURE 49







51/86

FIGURE 51

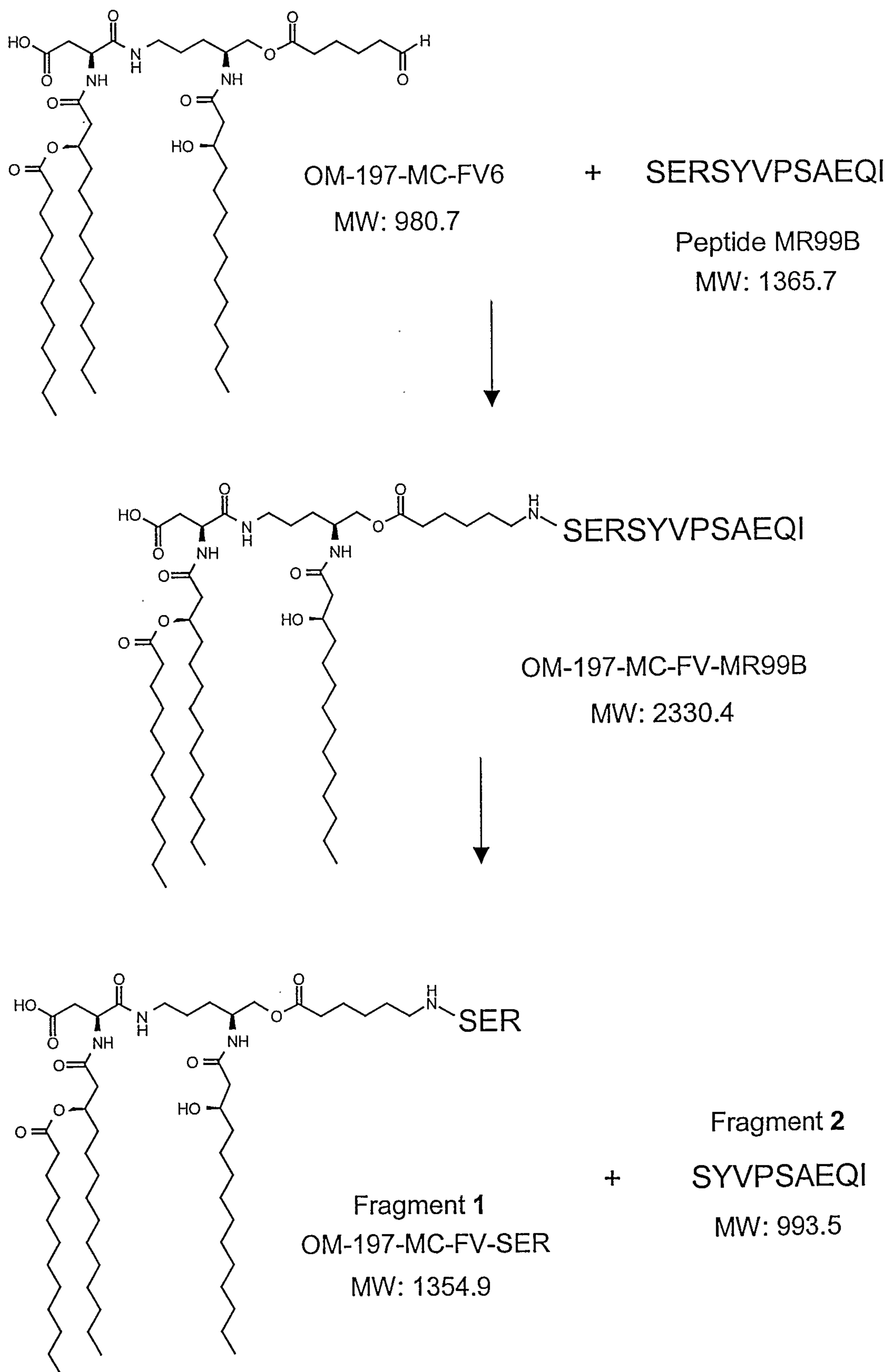
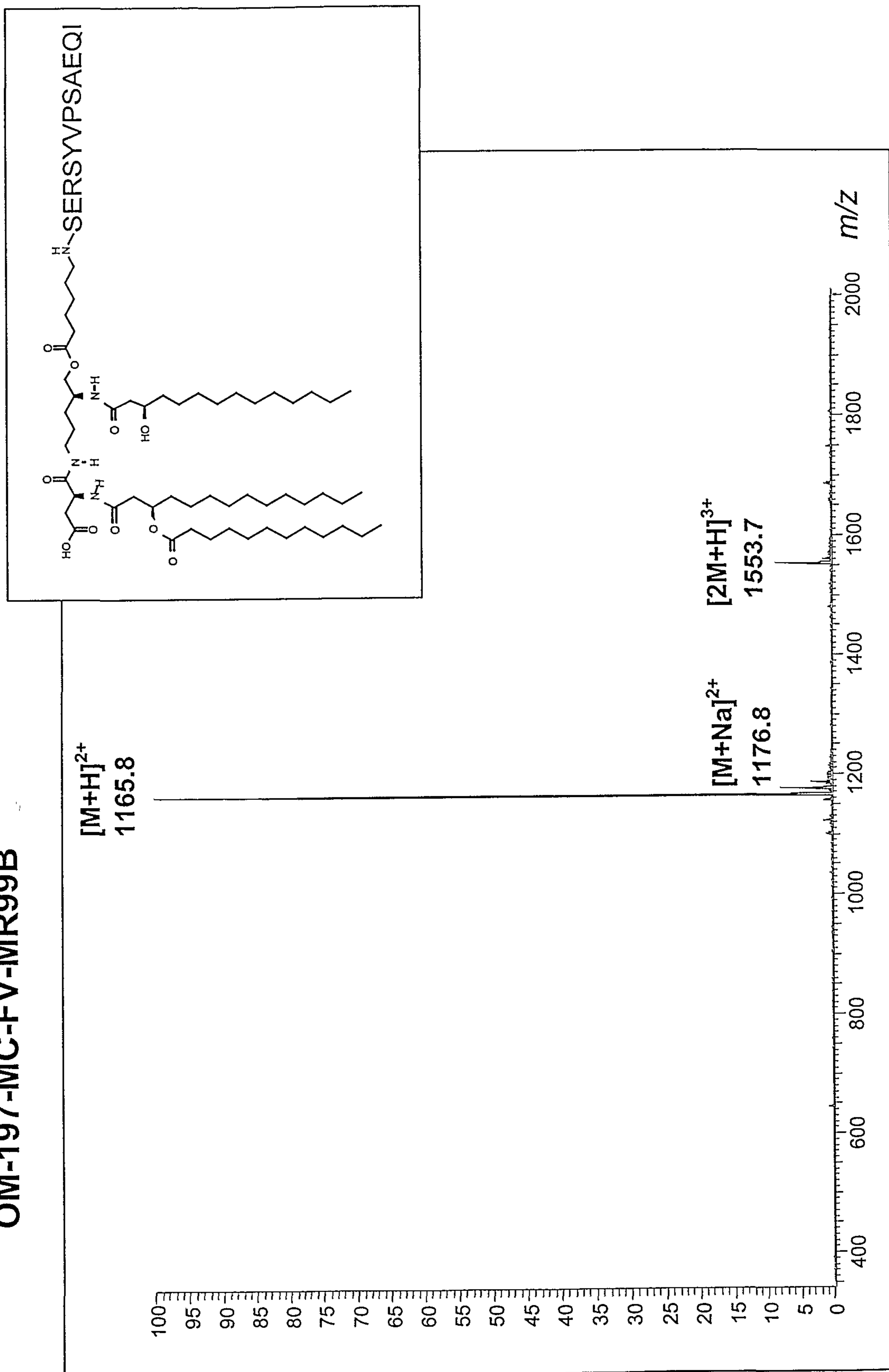


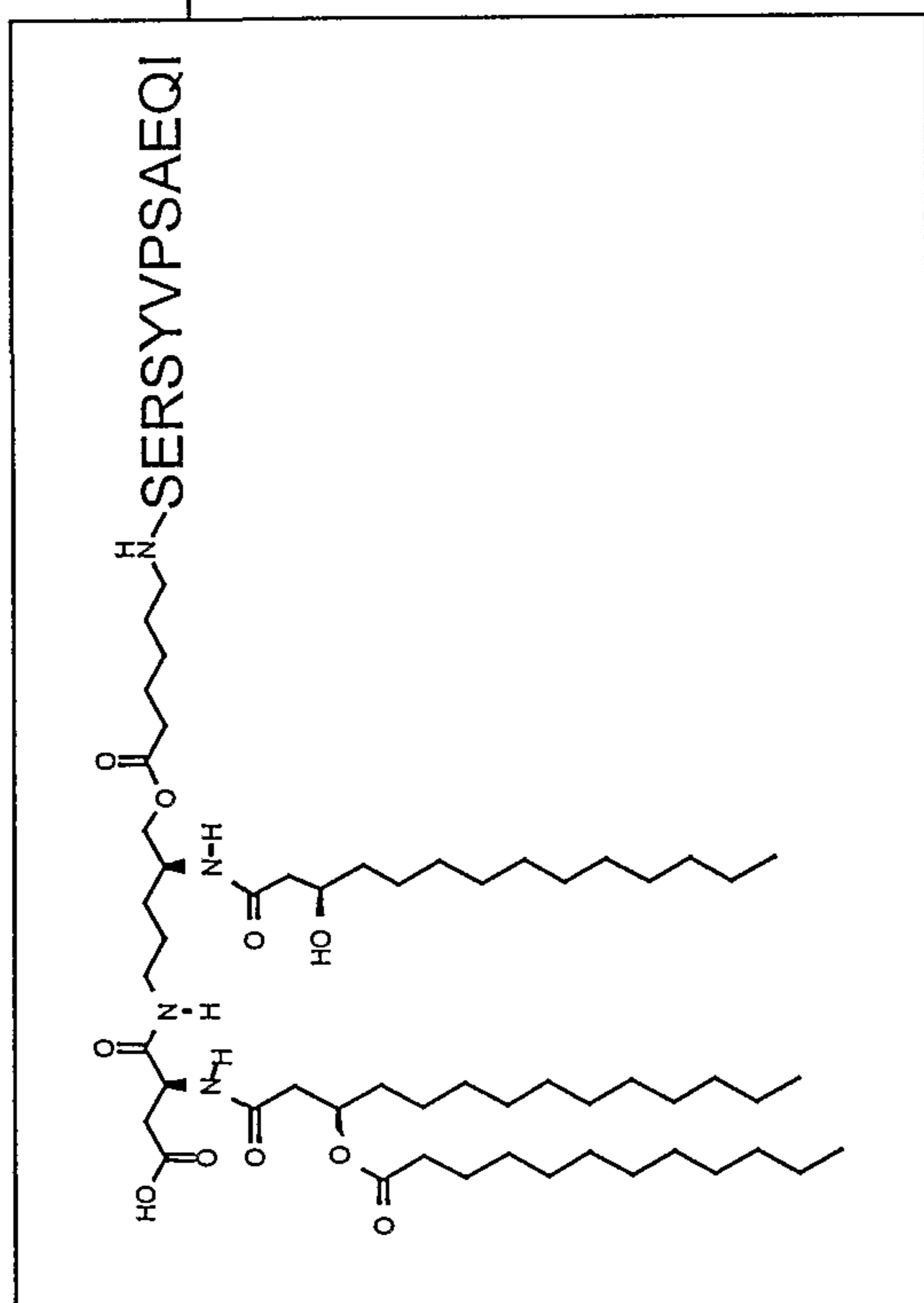
FIGURE 52

OM-197-MC-FV-MR99B





OM-197-MC-FV-MR99B



[M+H]<sup>+</sup>  
2330.0

[M+Na]<sup>+</sup>  
2352.0

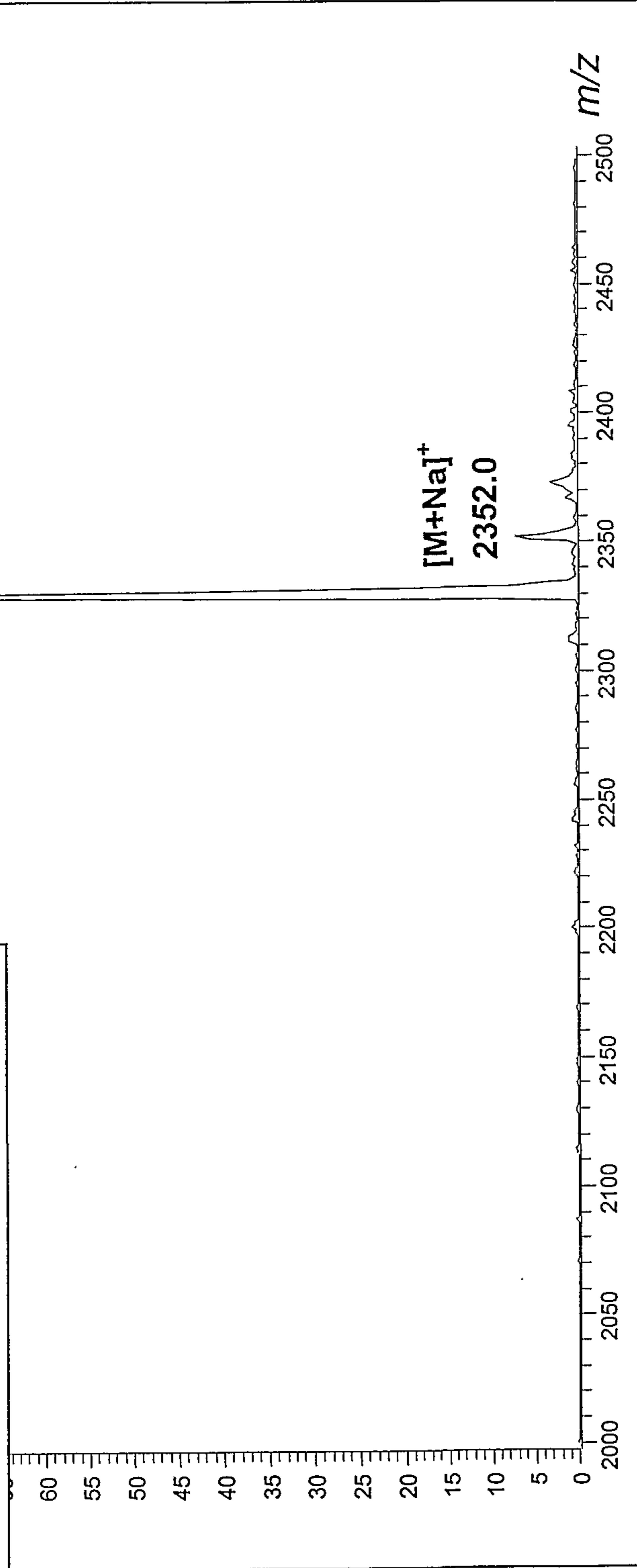
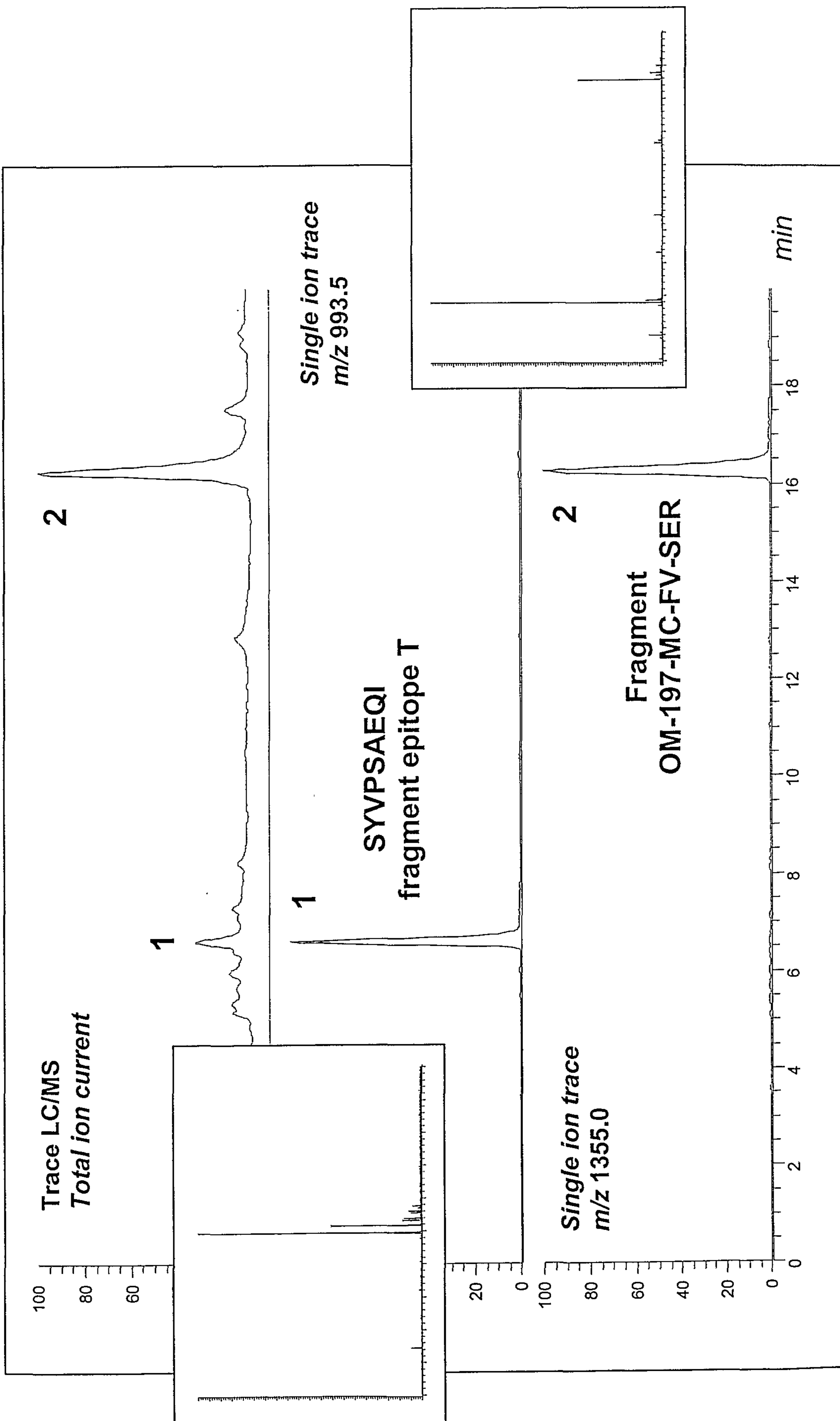
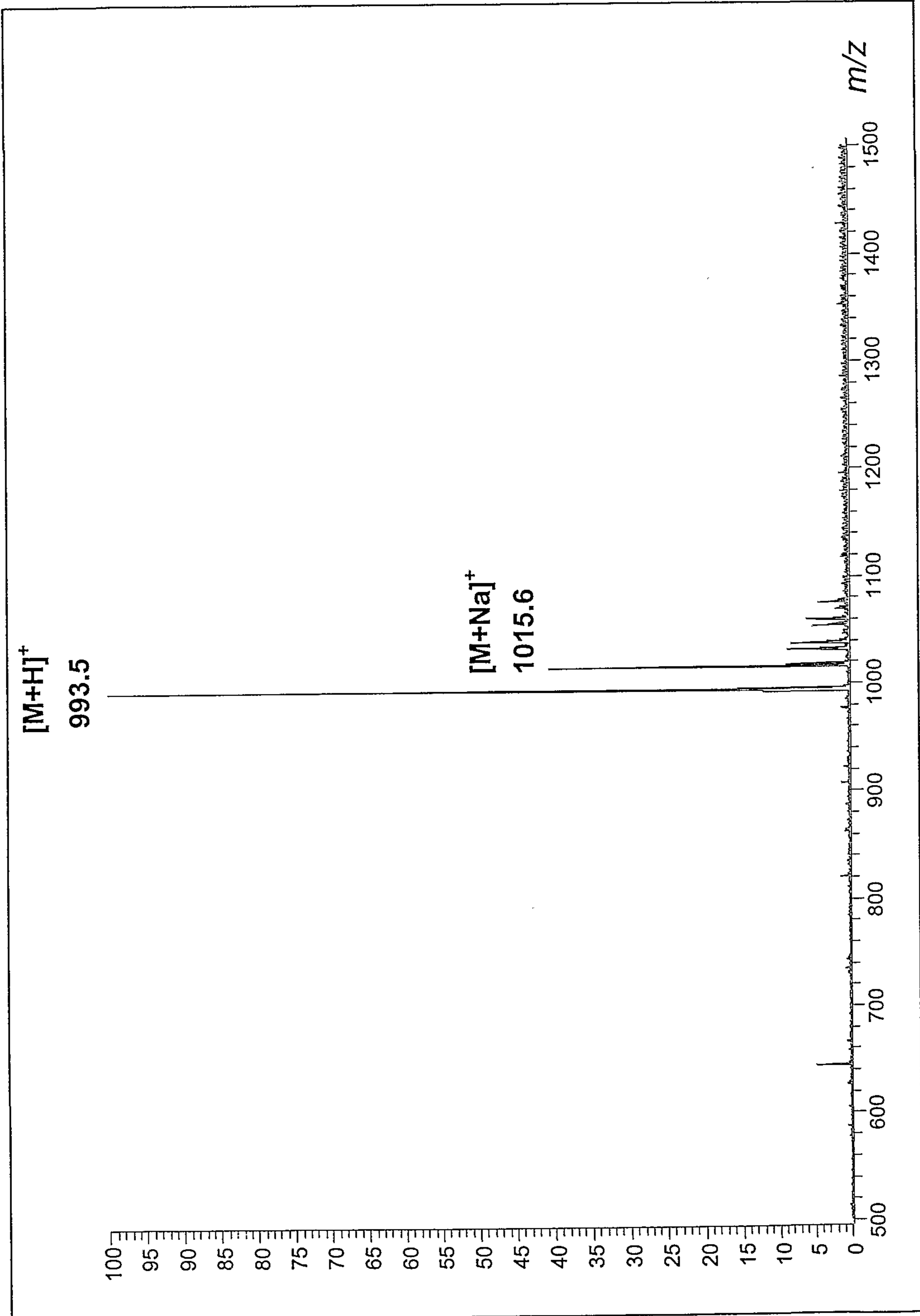


FIGURE 54

# Digestion à la trypsine de OM-197-MC-FV-MR99B Analyse LC/ES-MS



Fragment SYVPSAEQI





## Fragment OM-197-MC-FV-SER

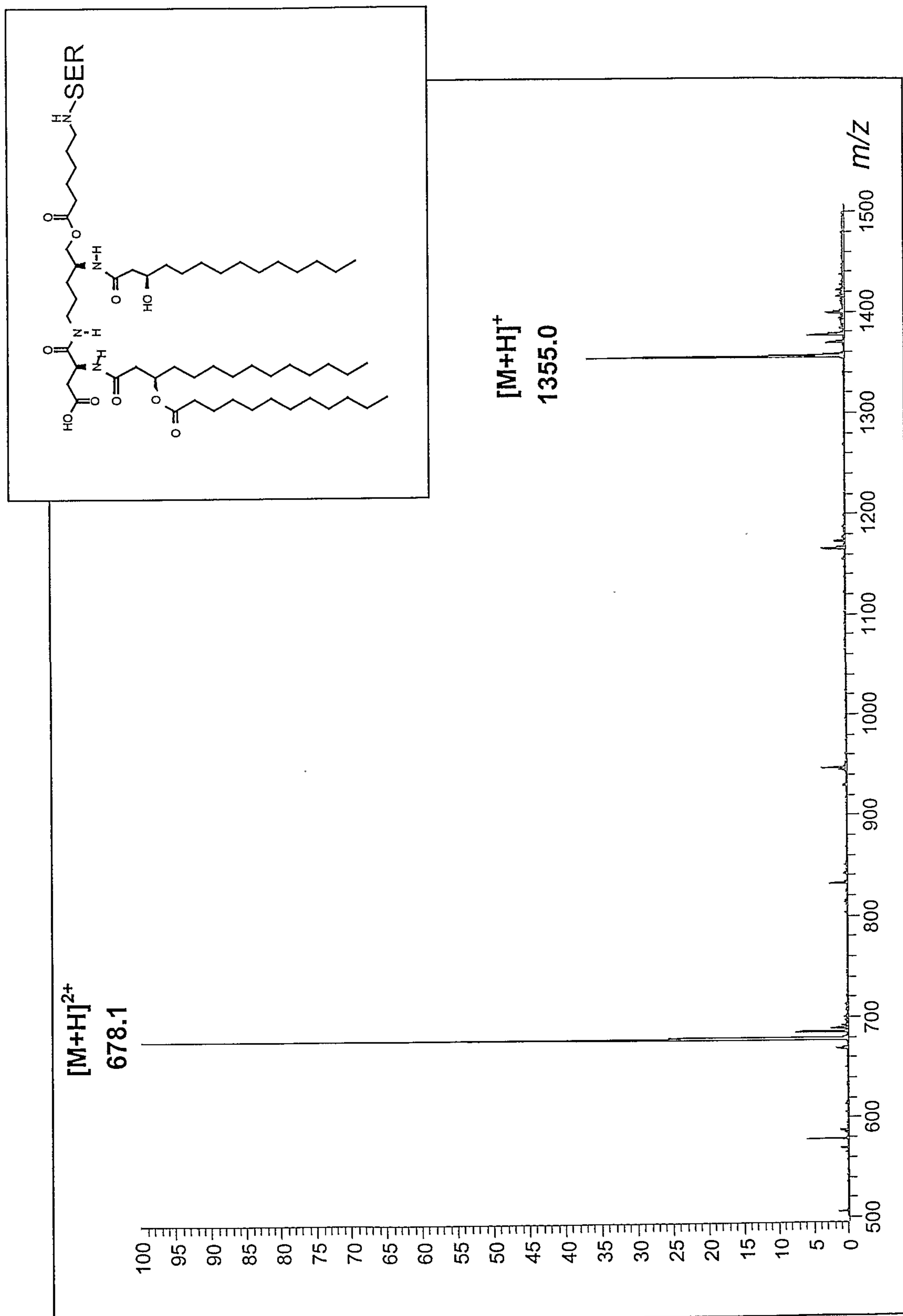


FIGURE 57

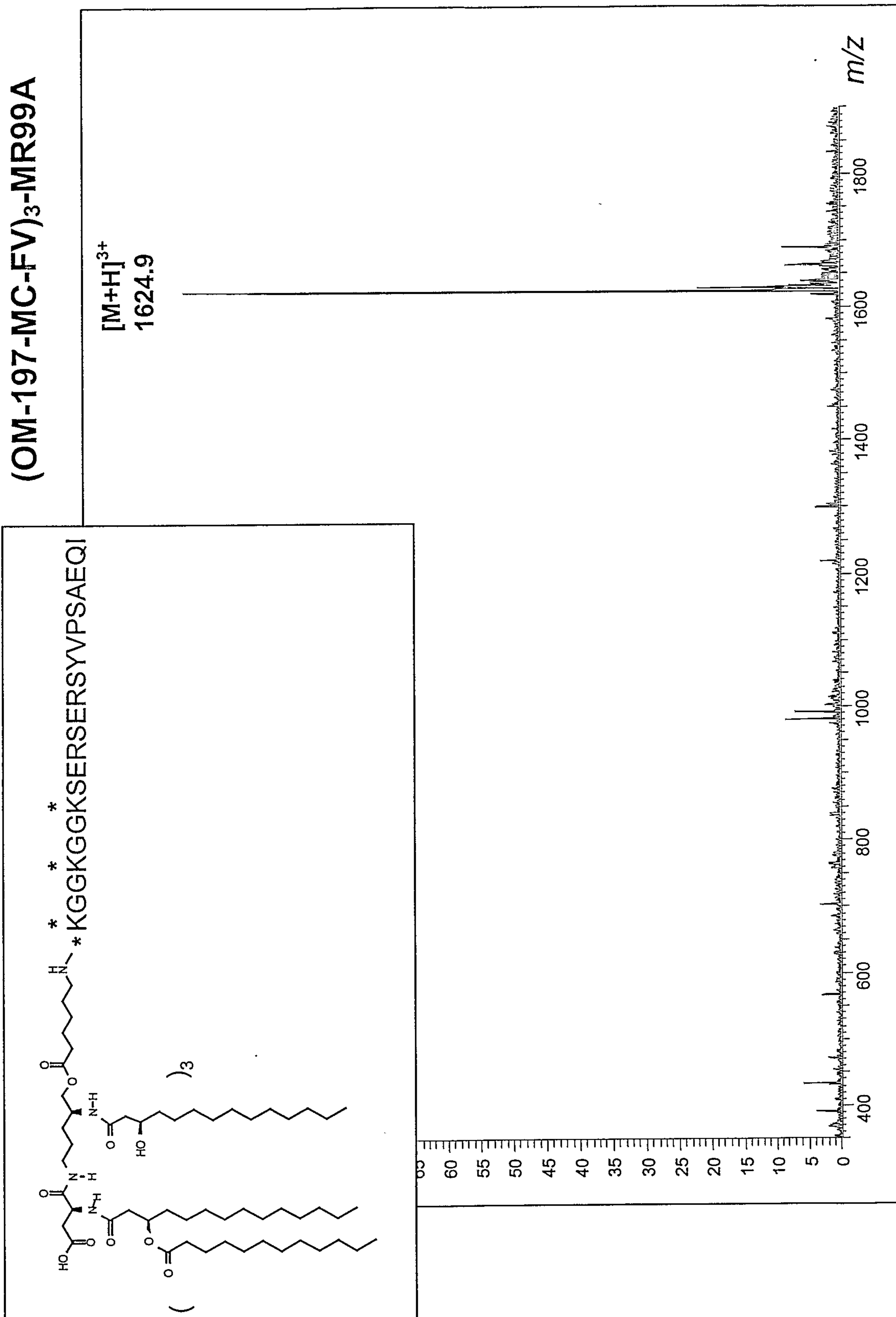


FIGURE 58

(OM-197-MC-FV)<sub>3</sub>-MR99A

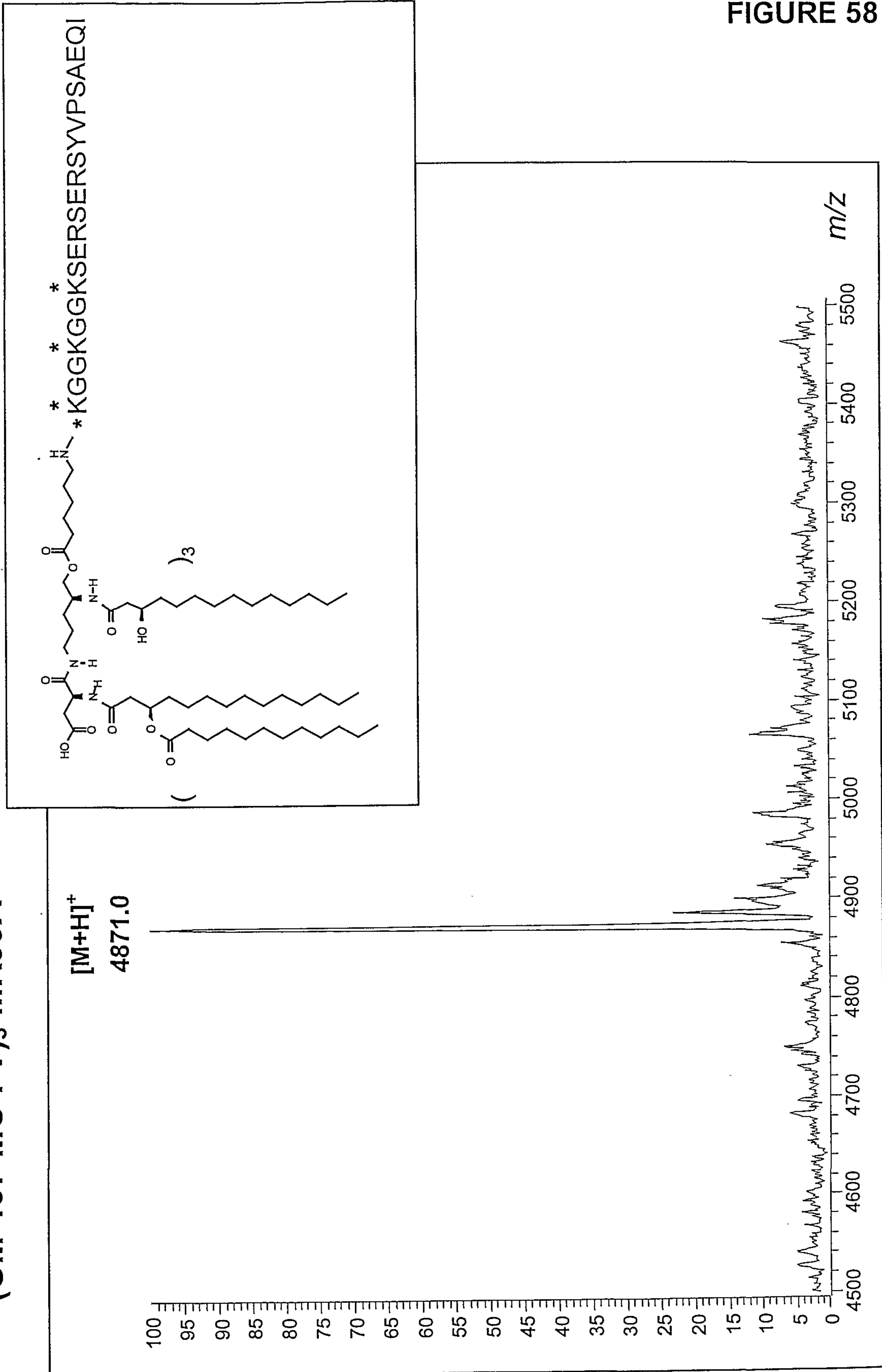
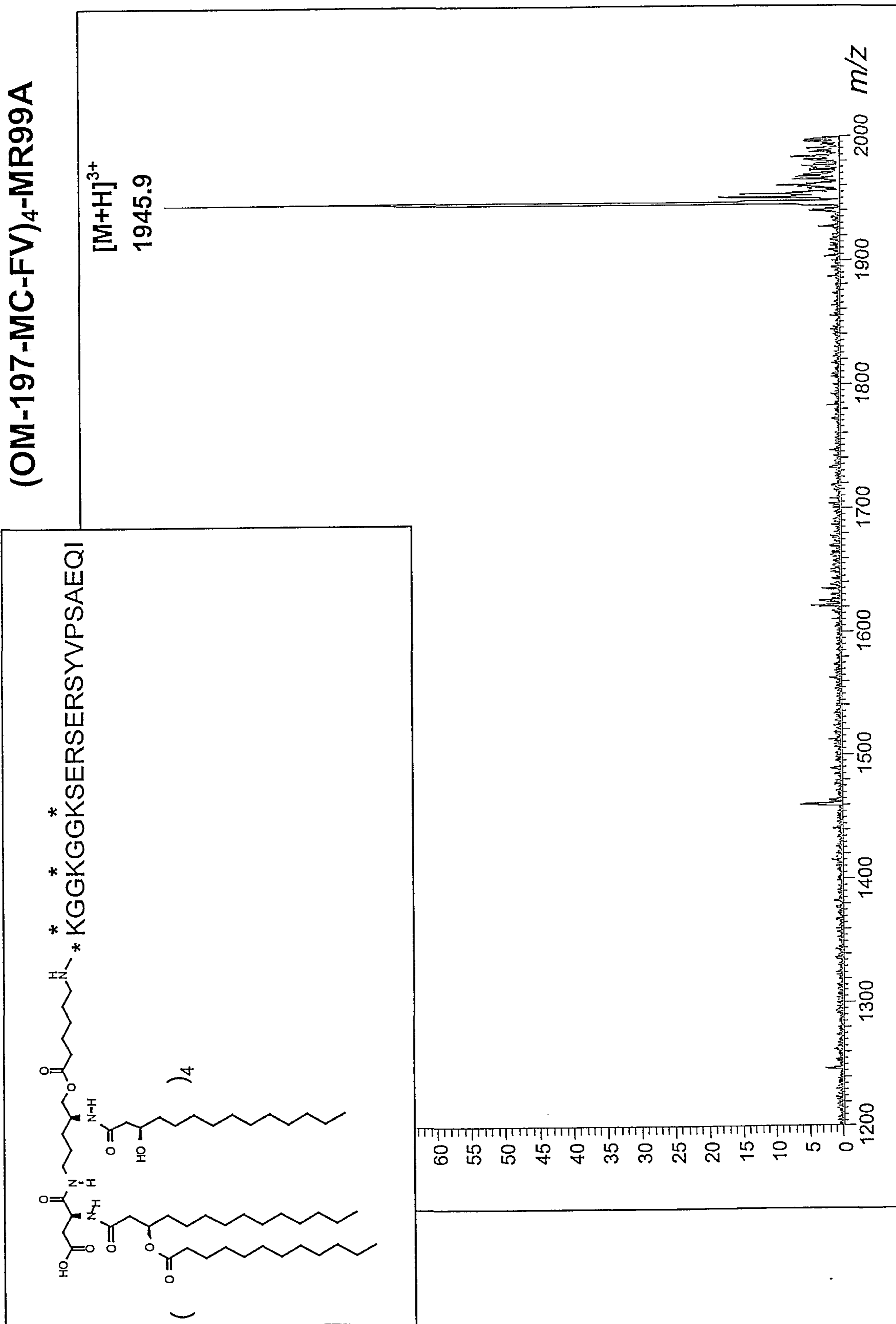
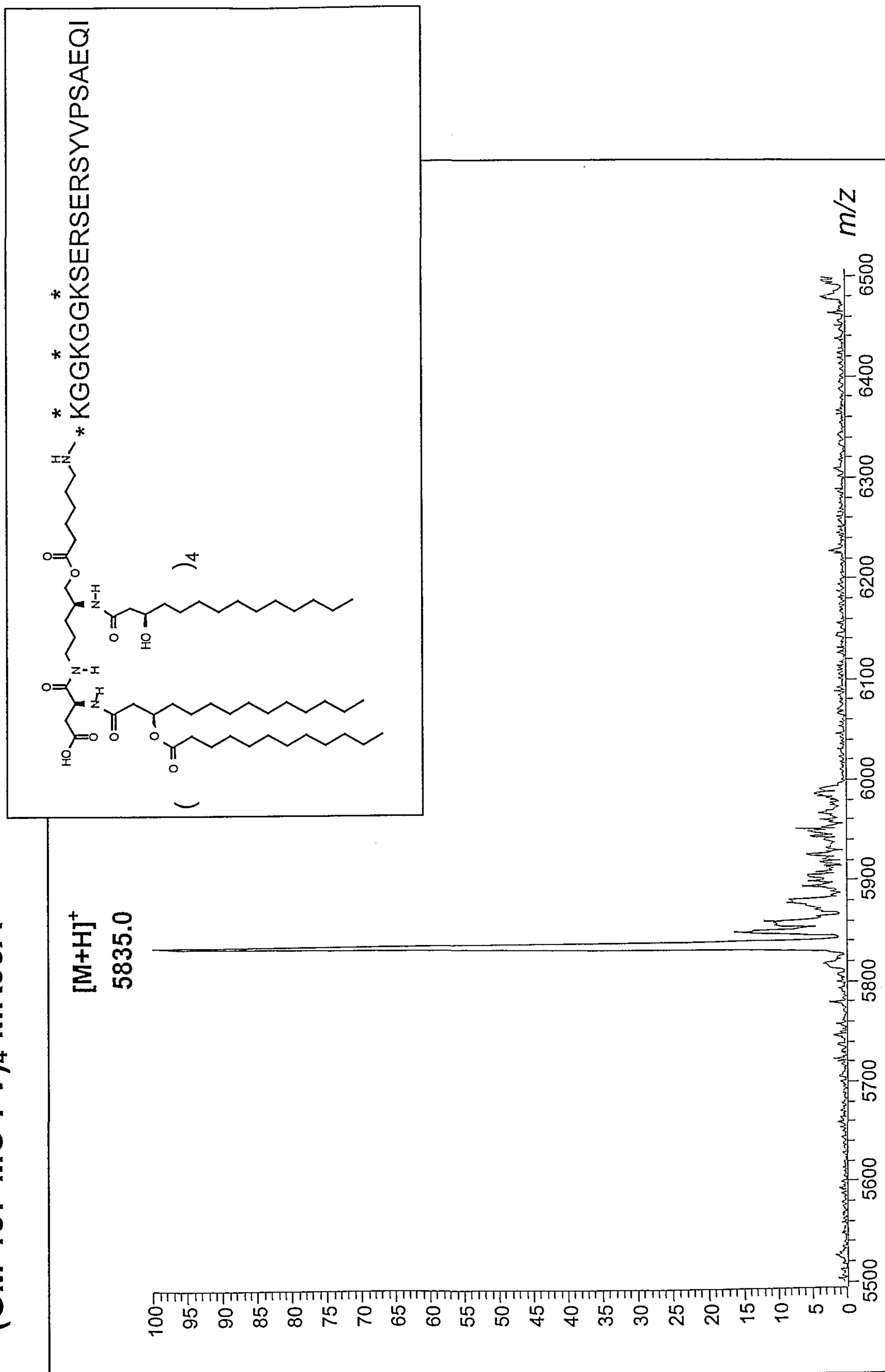




FIGURE 59



**(OM-197-MC-FV)<sub>4</sub>-MR99A**









**OM-197-MC-FV-OM-197-MC-AC**

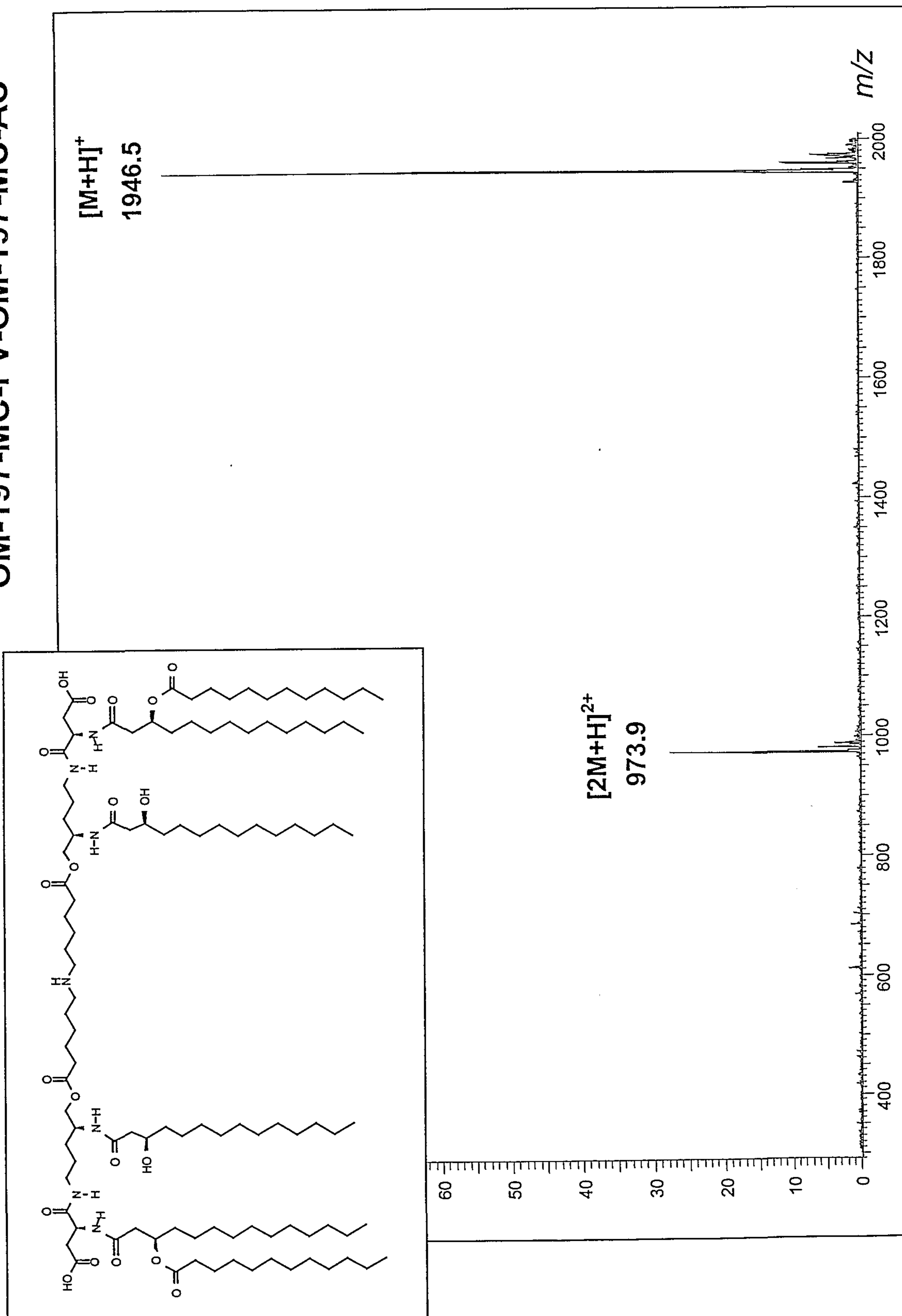
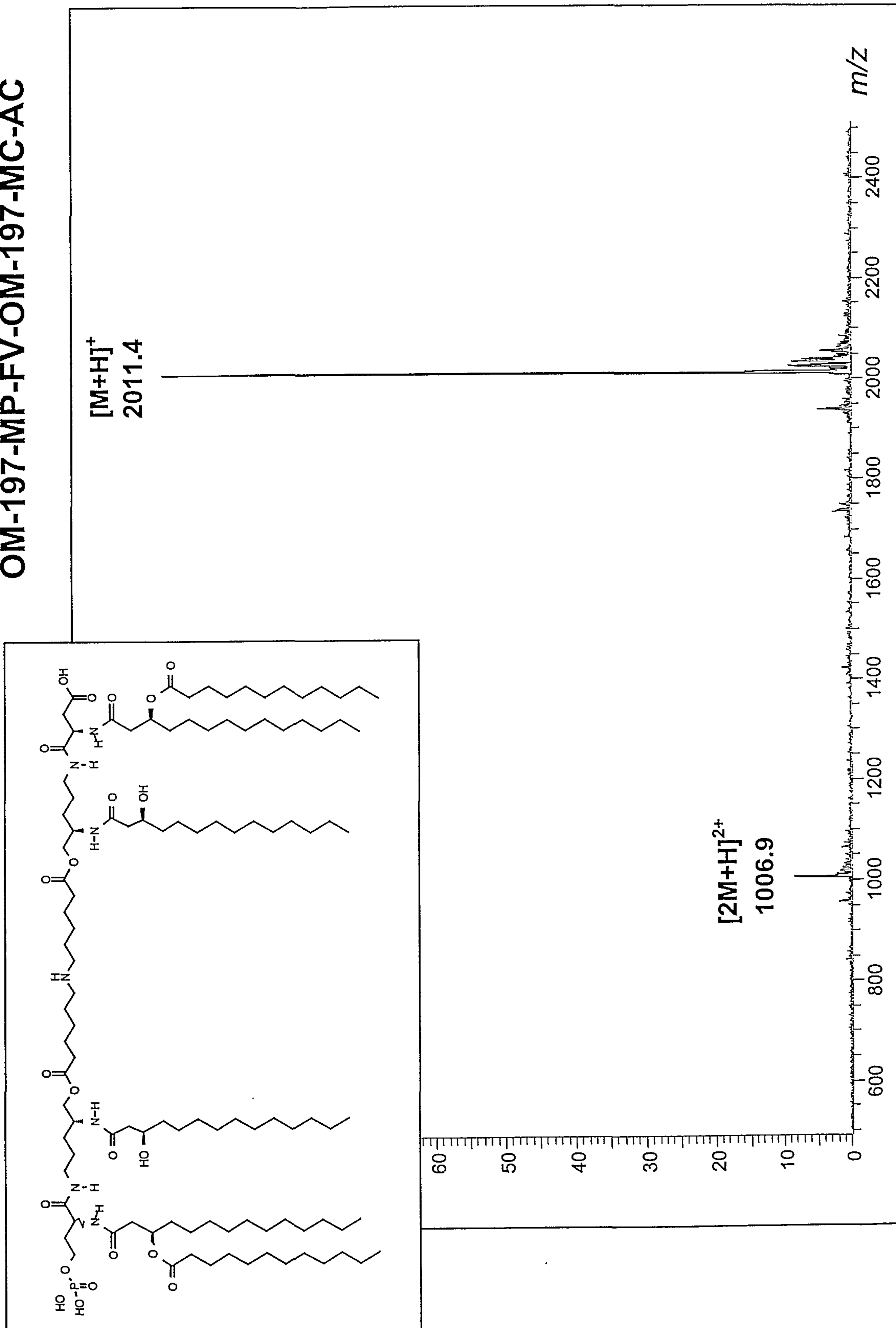


FIGURE 64

OM-197-MP-FV-OM-197-MC-AC





65/86

FIGURE 65

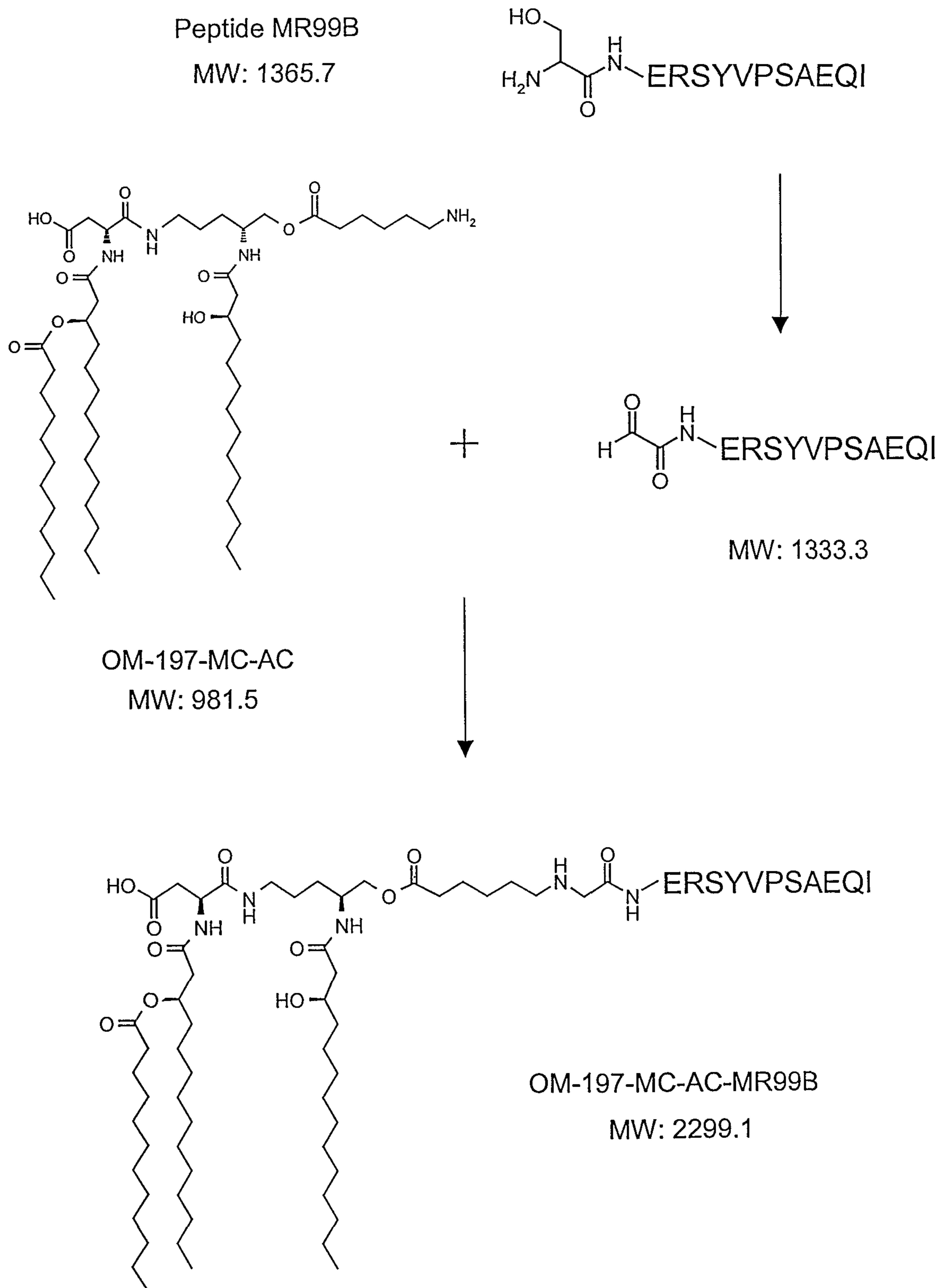
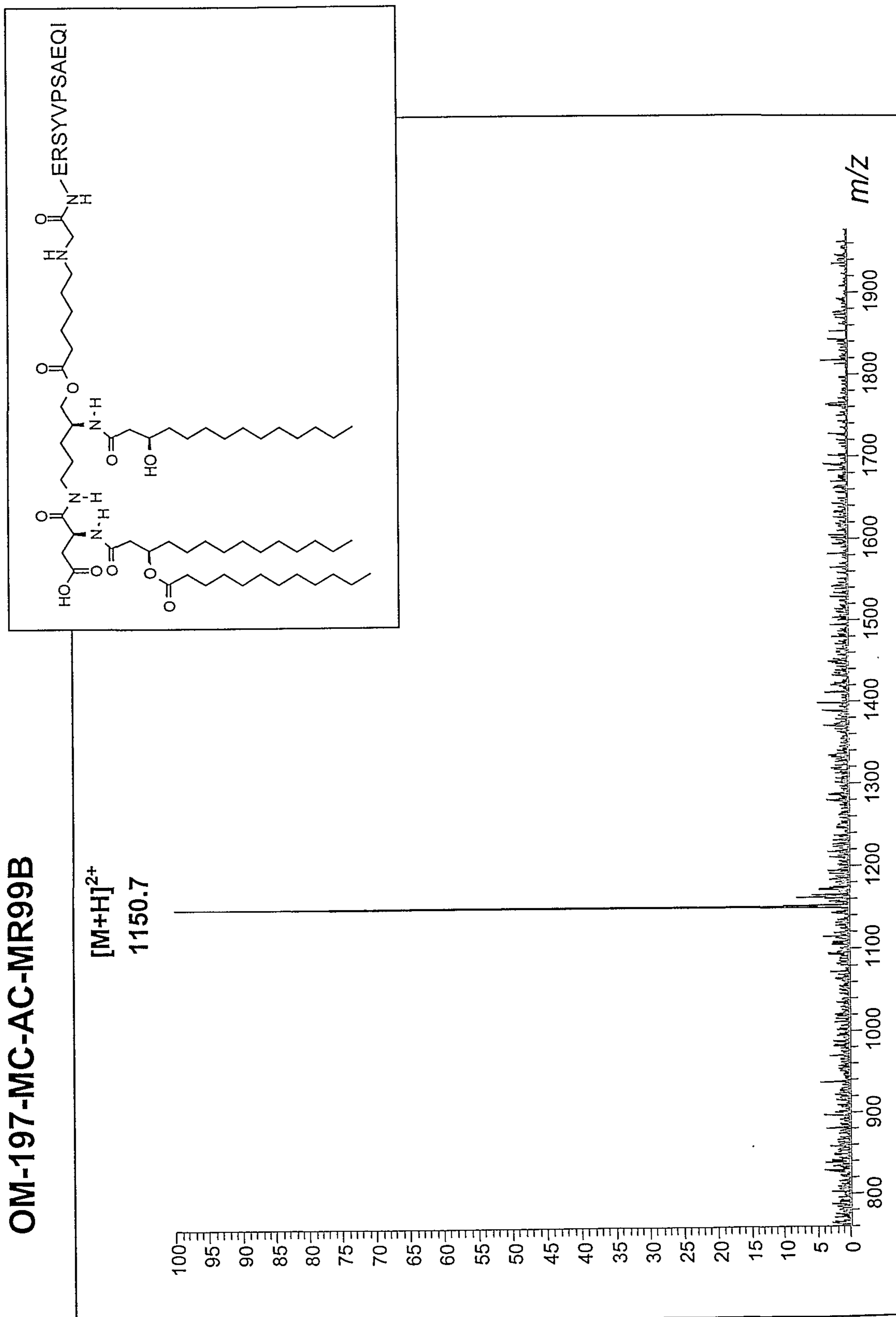
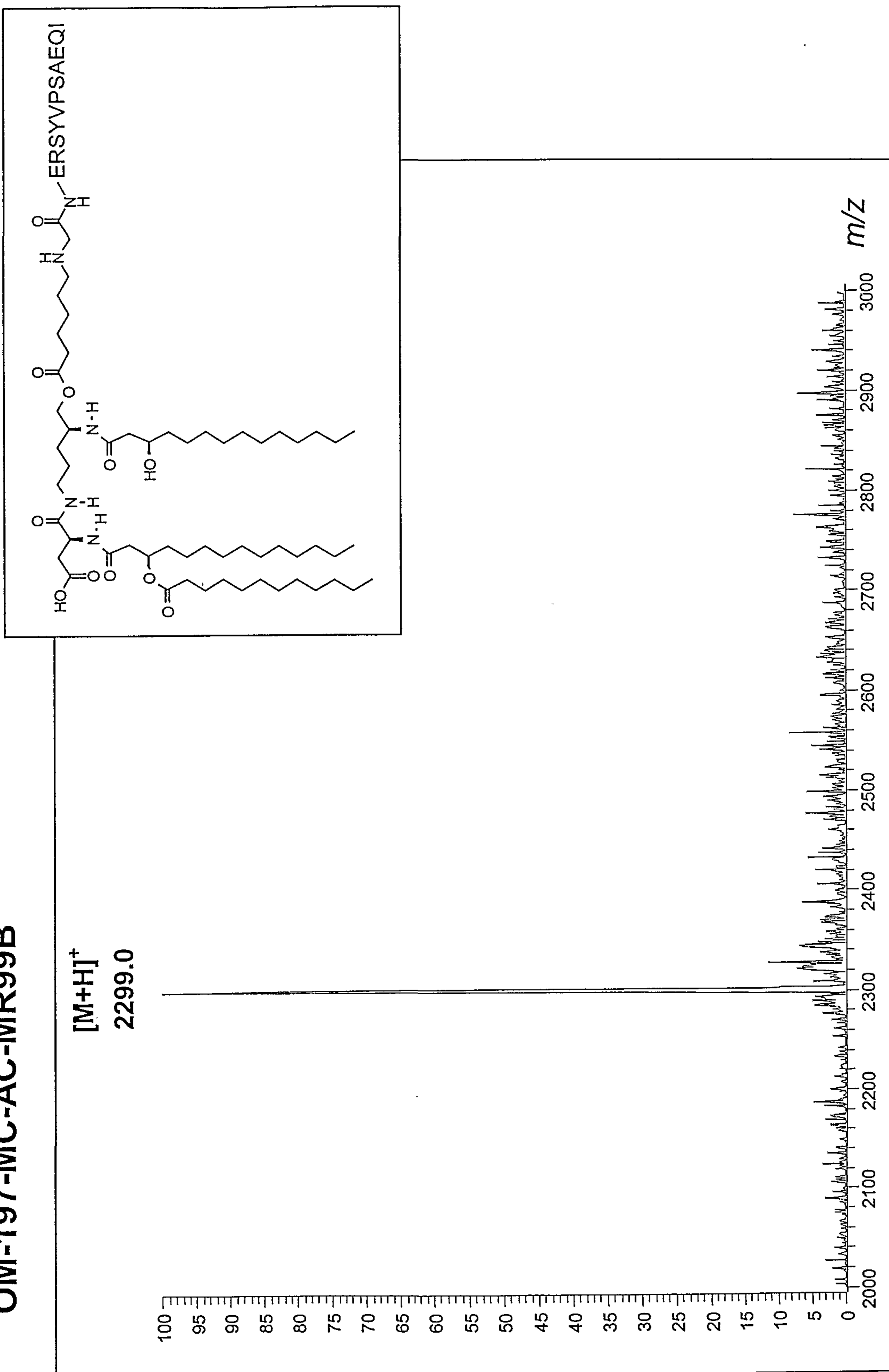


FIGURE 66



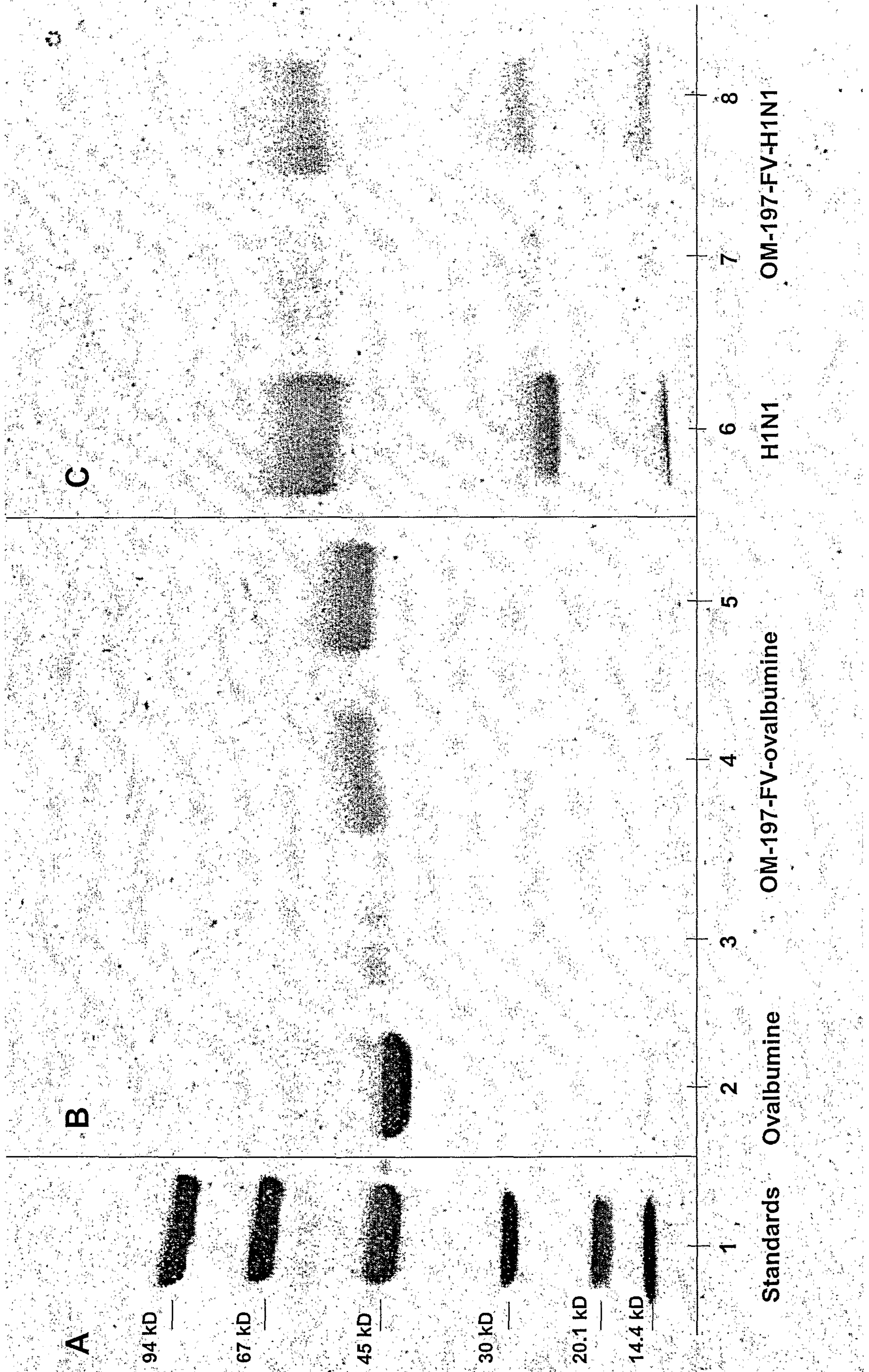
**OM-197-MC-AC-MR99B**

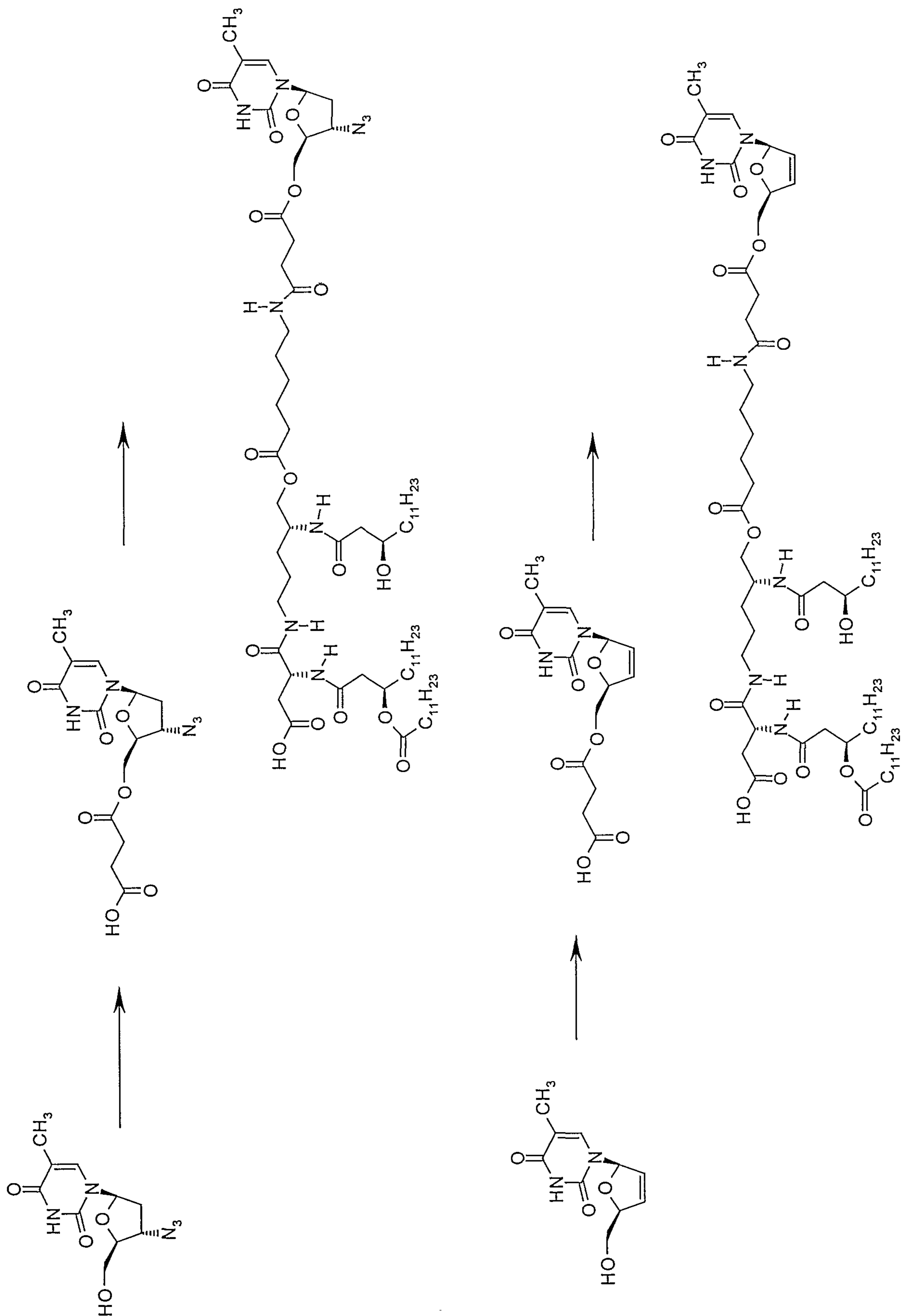




68/86

FIGURE 68

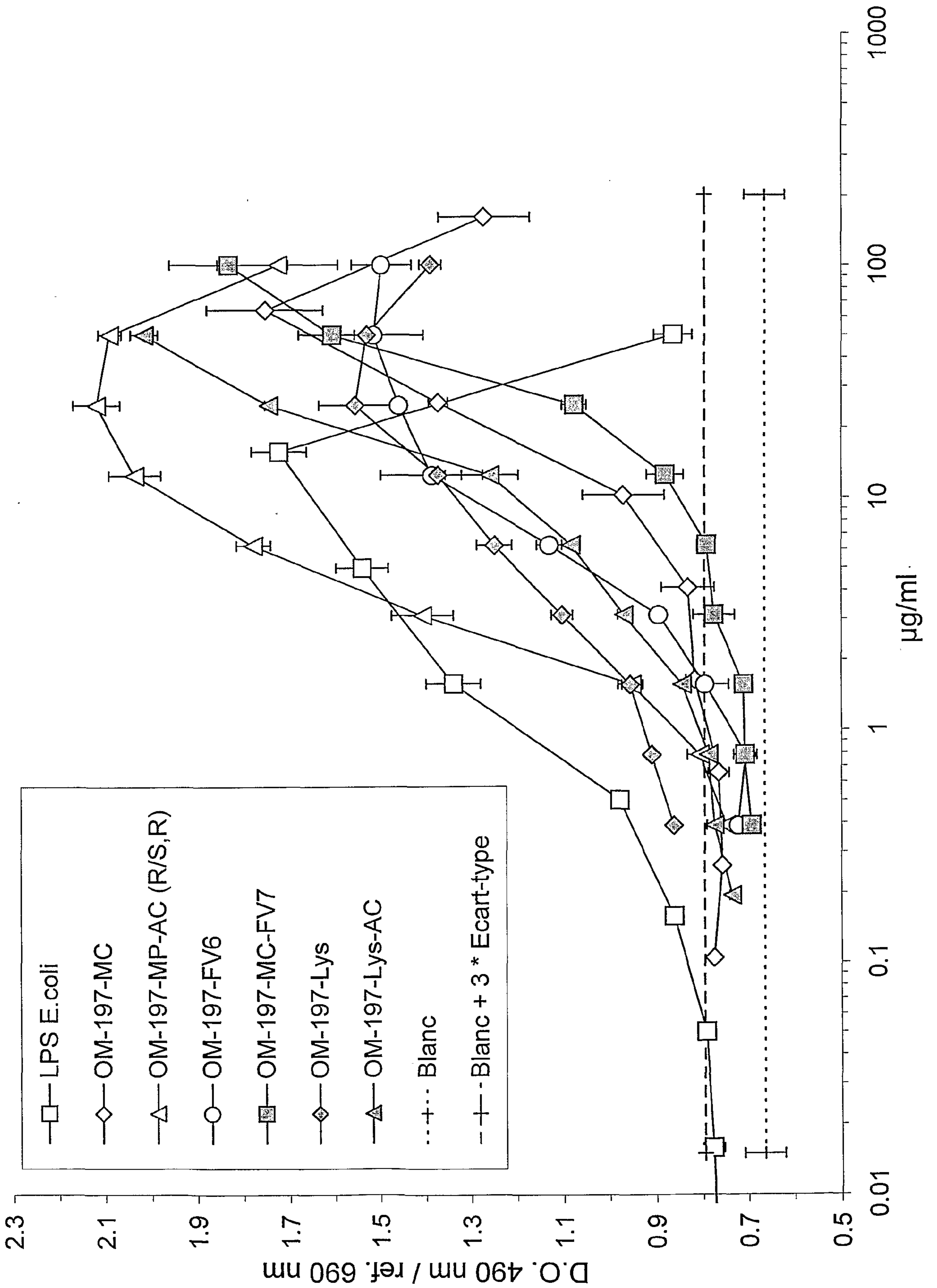






70/86

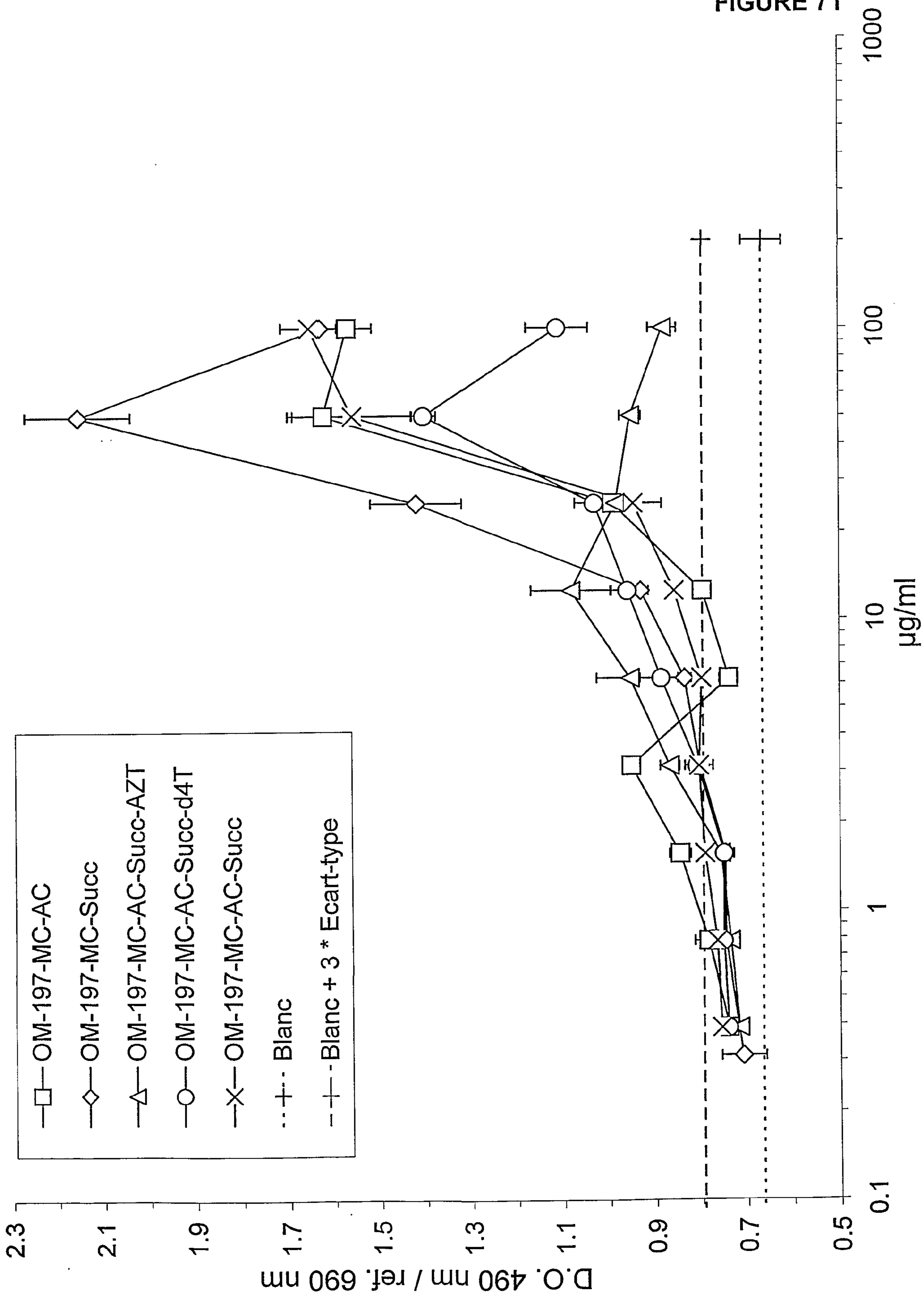
FIGURE 70





71/86

FIGURE 71



□ OM-197-MC-AC  
◇ OM-197-MC-Succ  
△ OM-197-MC-AC-Succ-AZT  
○ OM-197-MC-AC-Succ-d4T  
× OM-197-MC-AC-Succ  
...+... Blanc  
--+-- Blanc + 3 \* Ecart-type



73/86

FIGURE 73

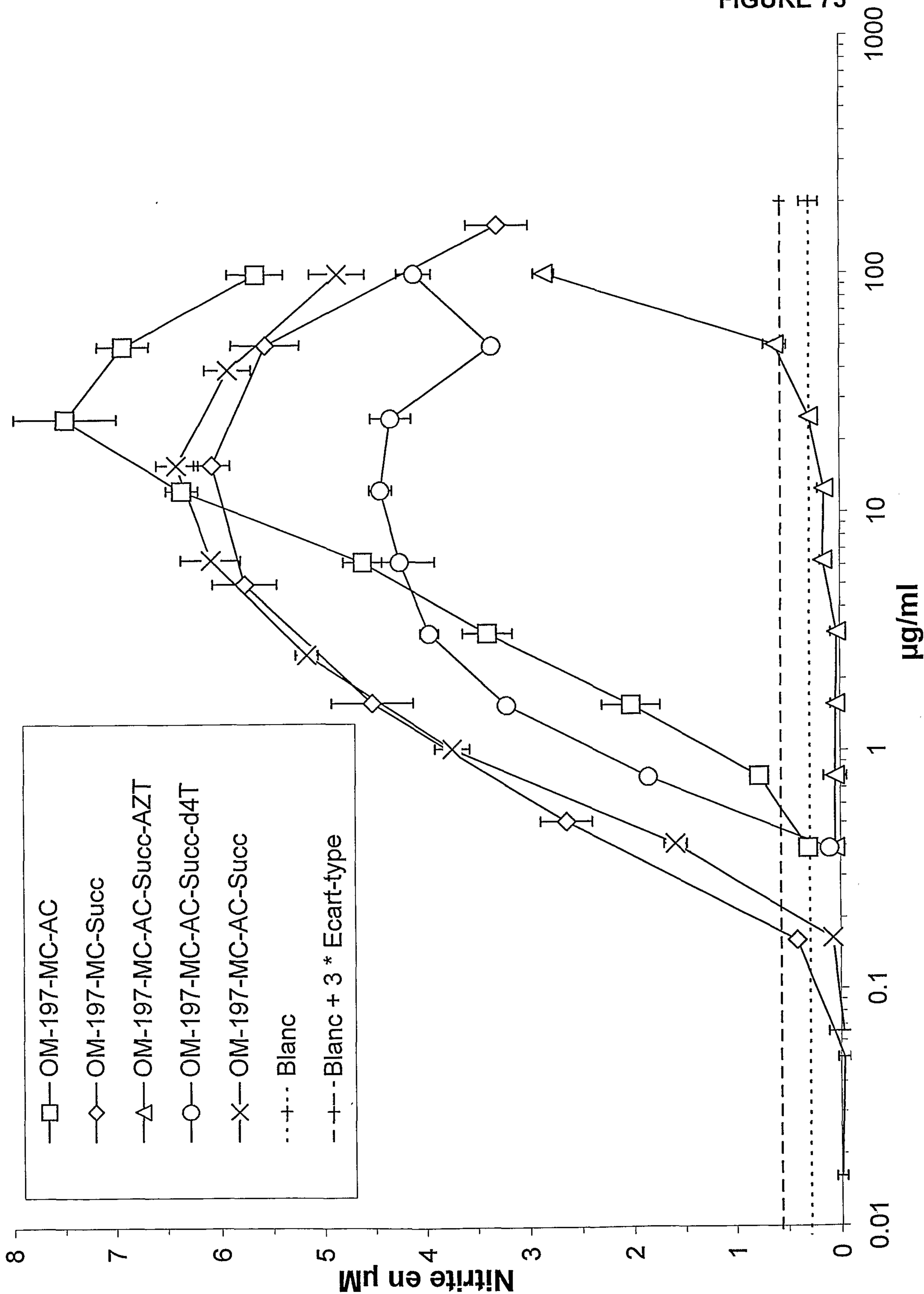
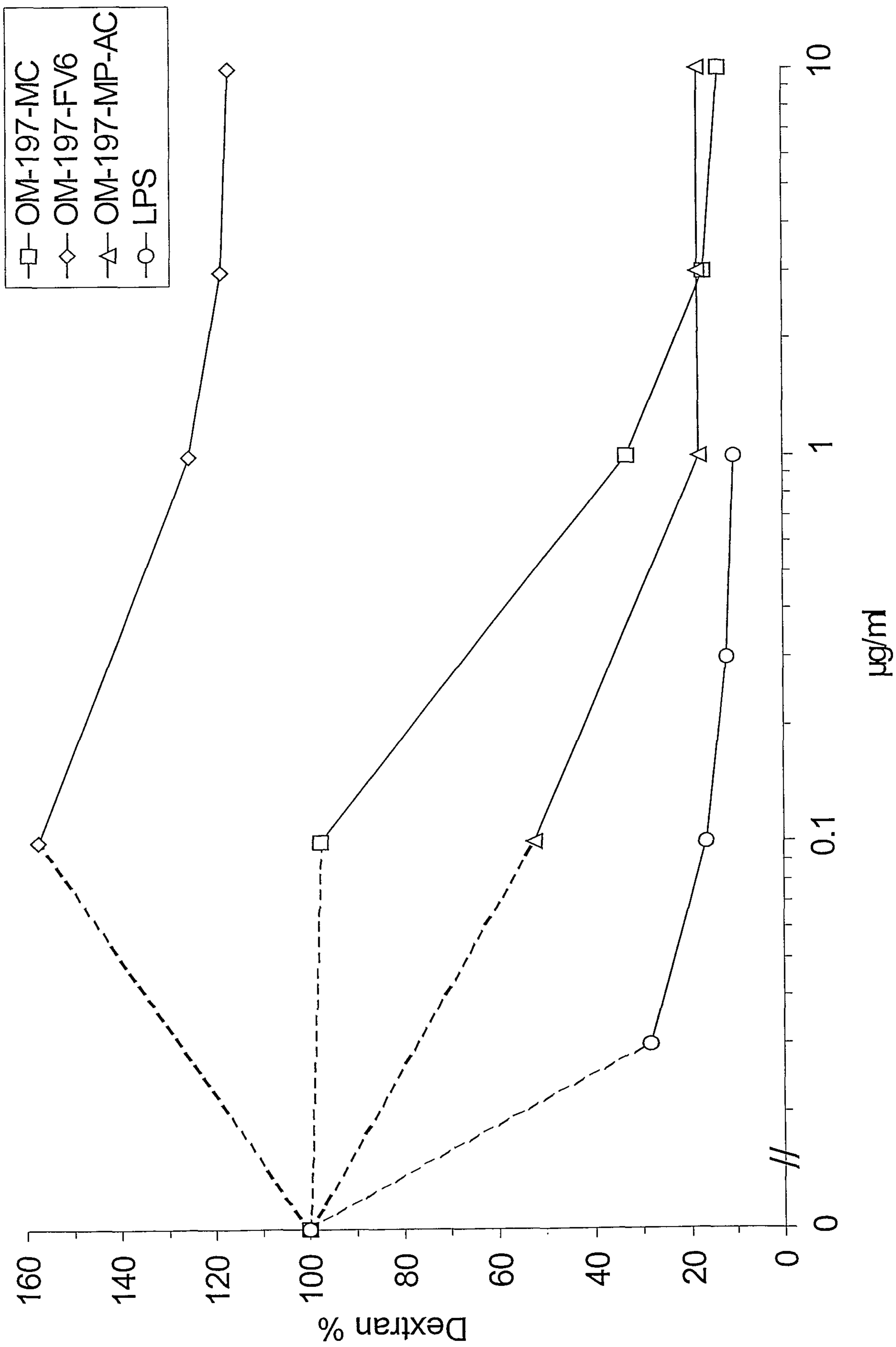


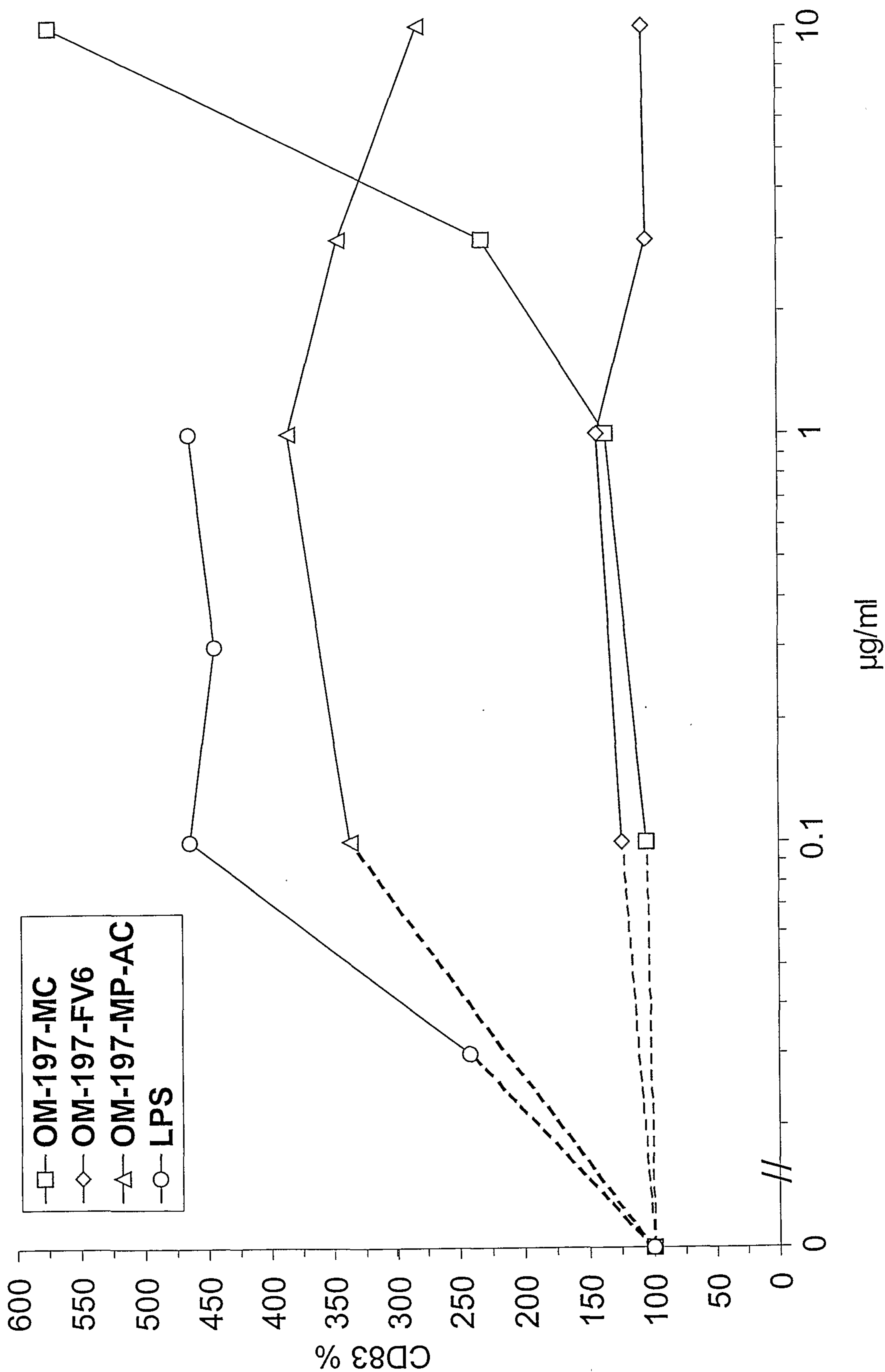


FIGURE 74



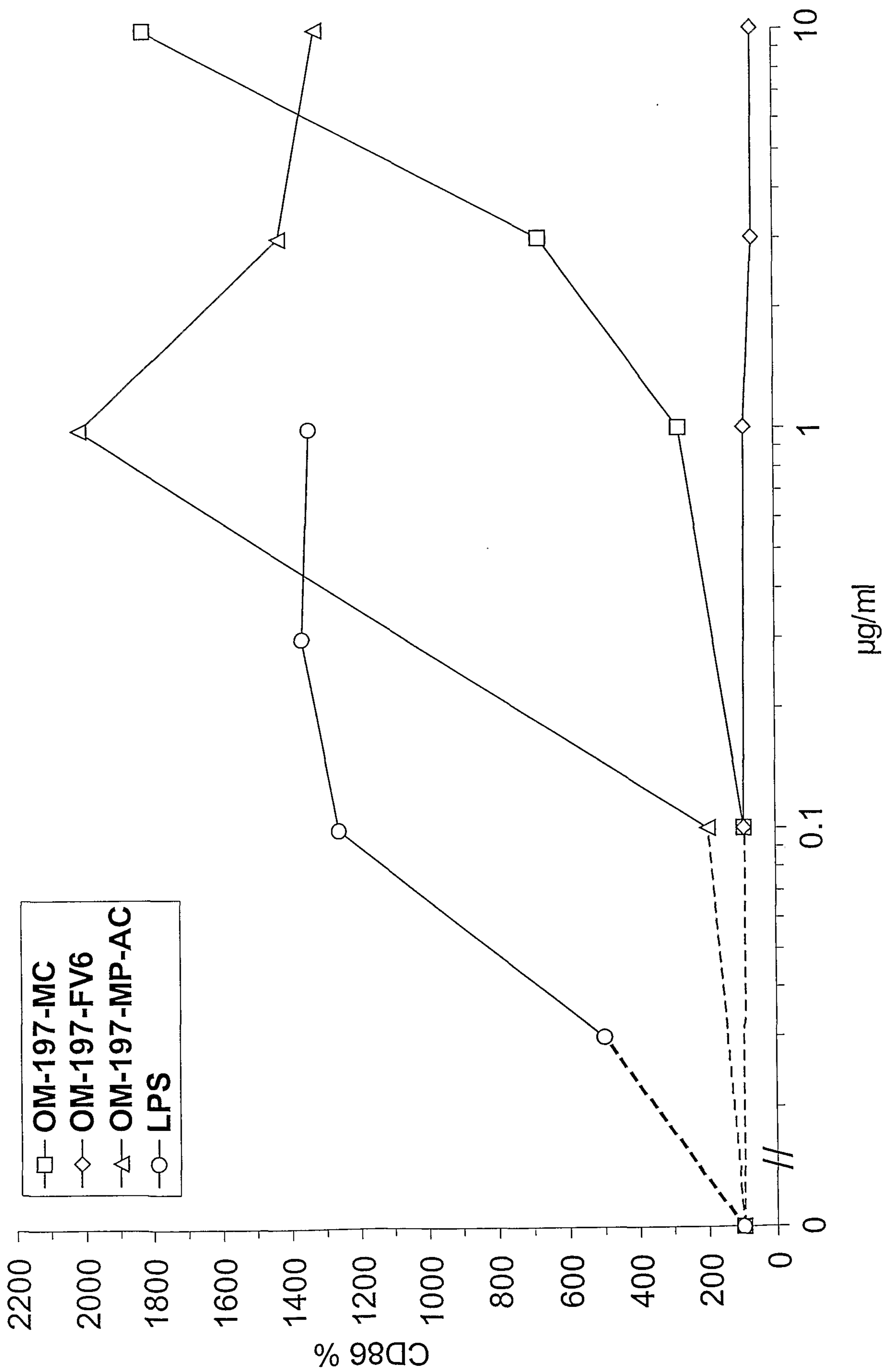
75/86

FIGURE 75



76/86

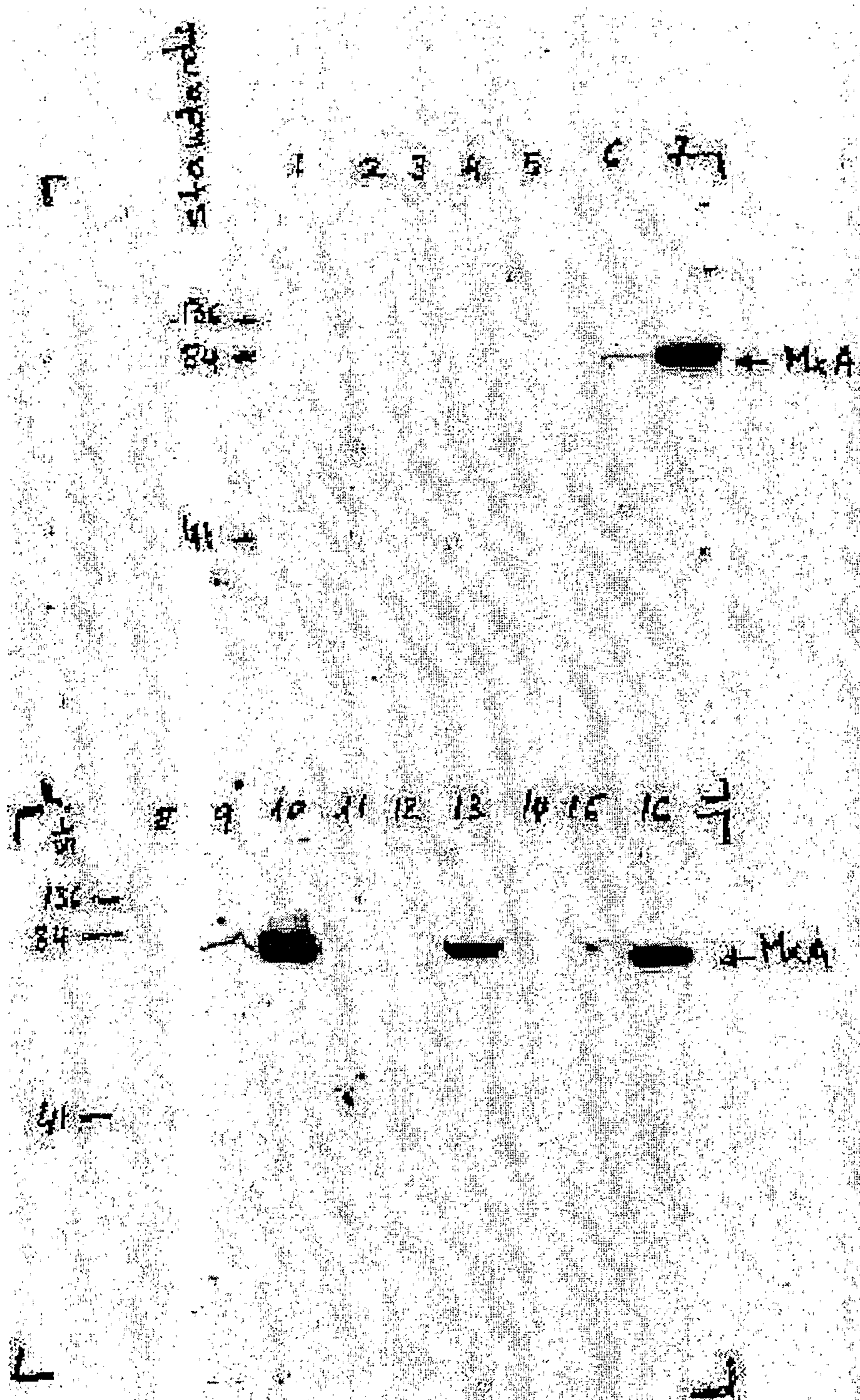
FIGURE 76





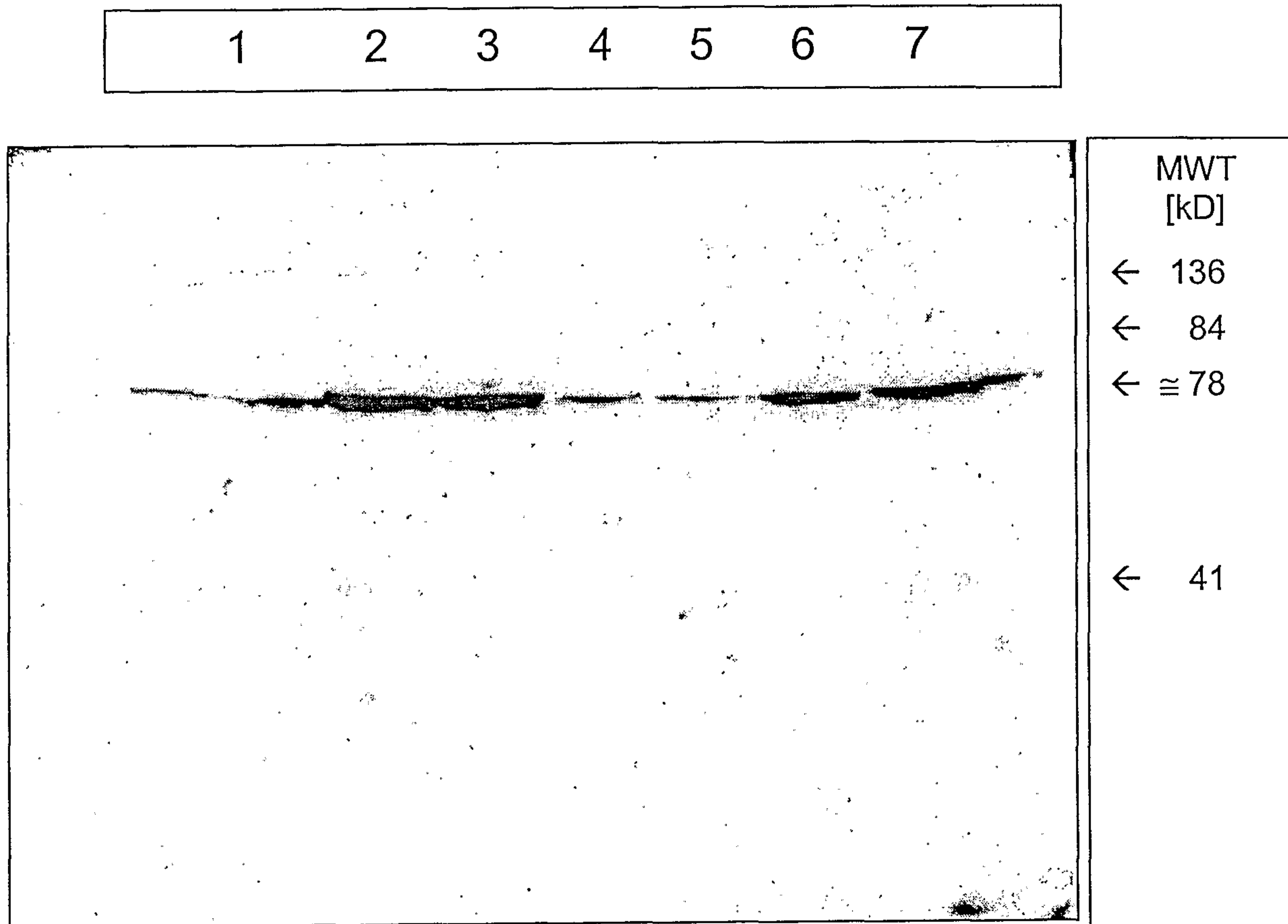
77/86

FIGURE 77



78/86

FIGURE 78





79/86

FIGURE 79

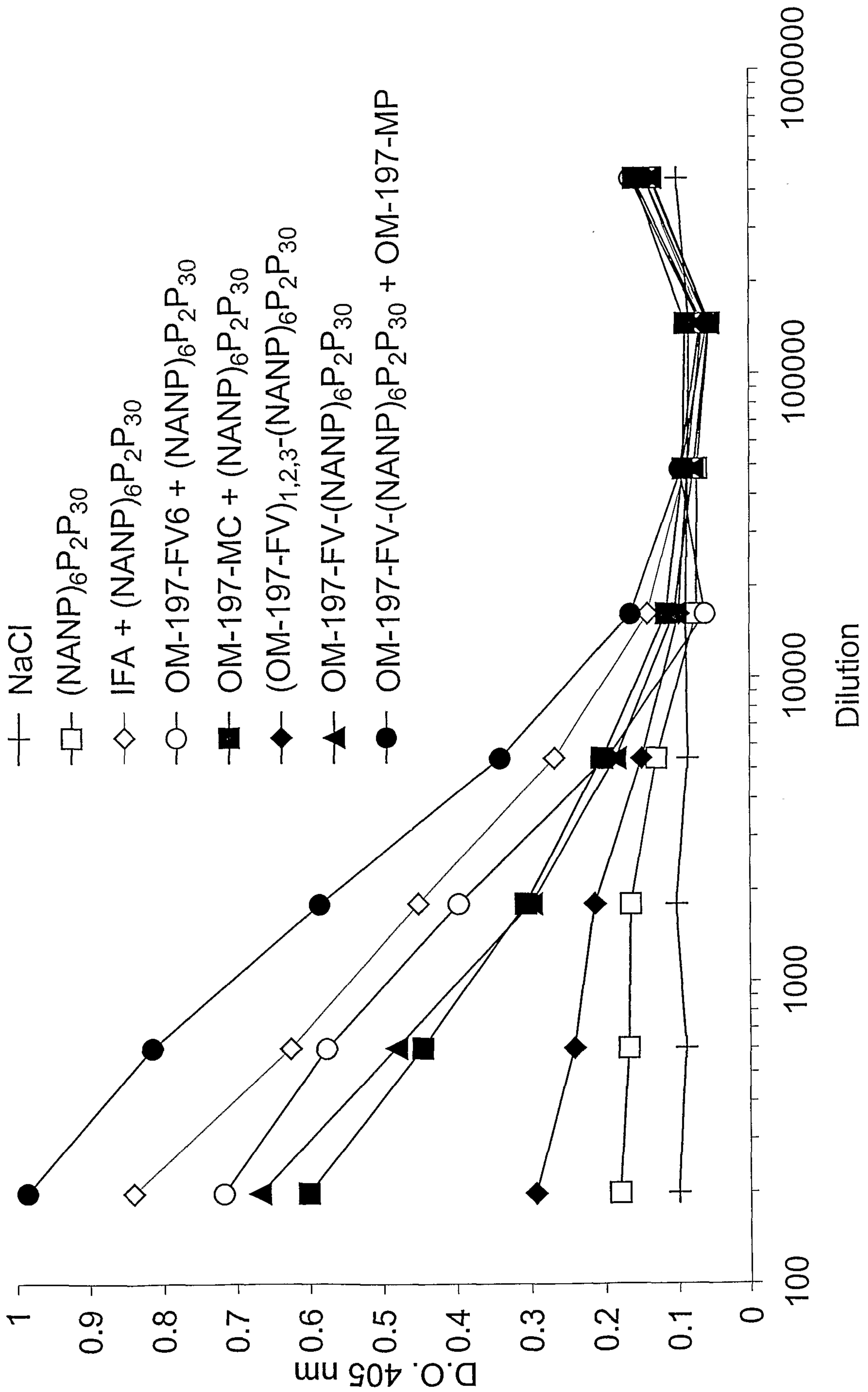






FIGURE 81

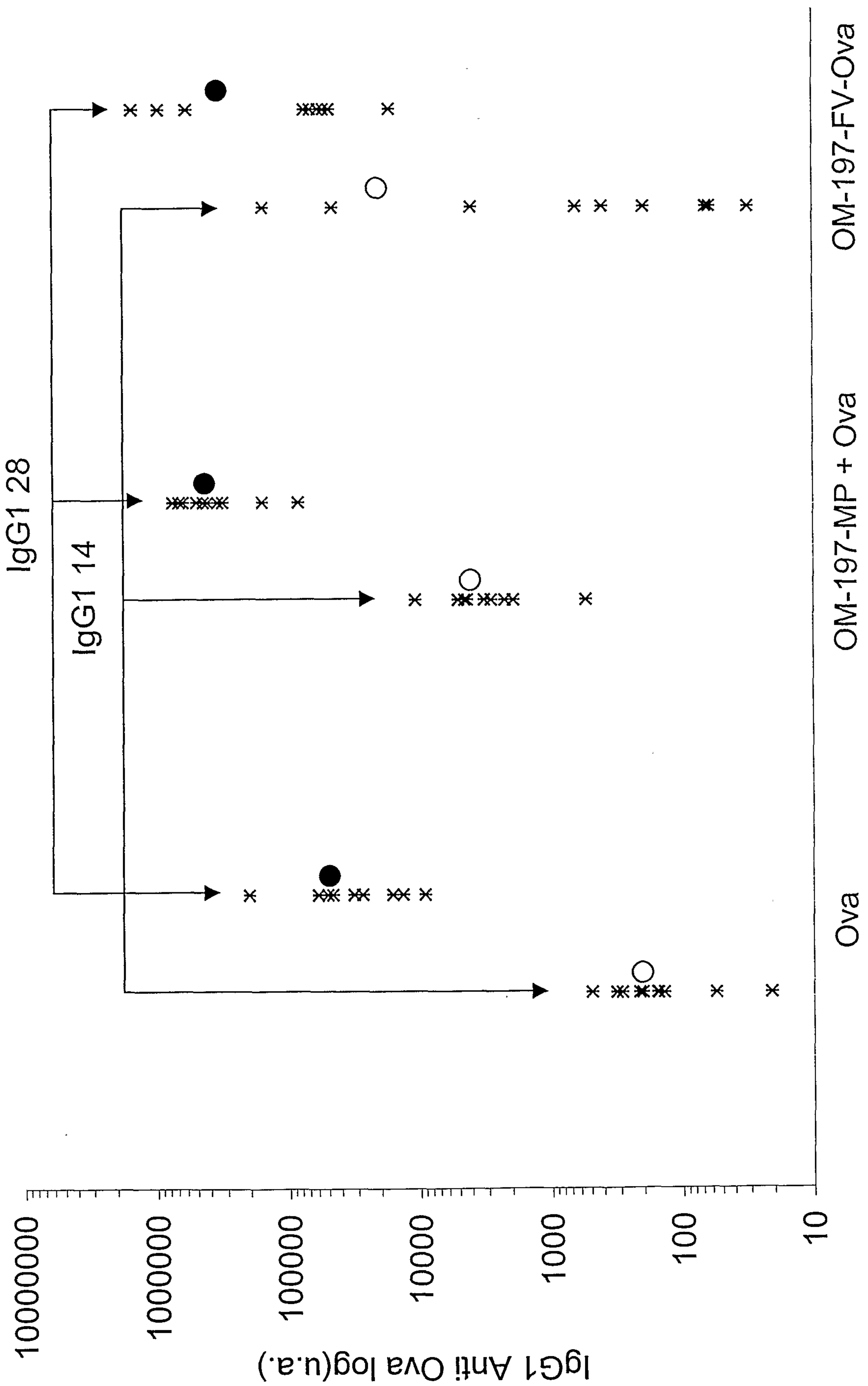


FIGURE 82

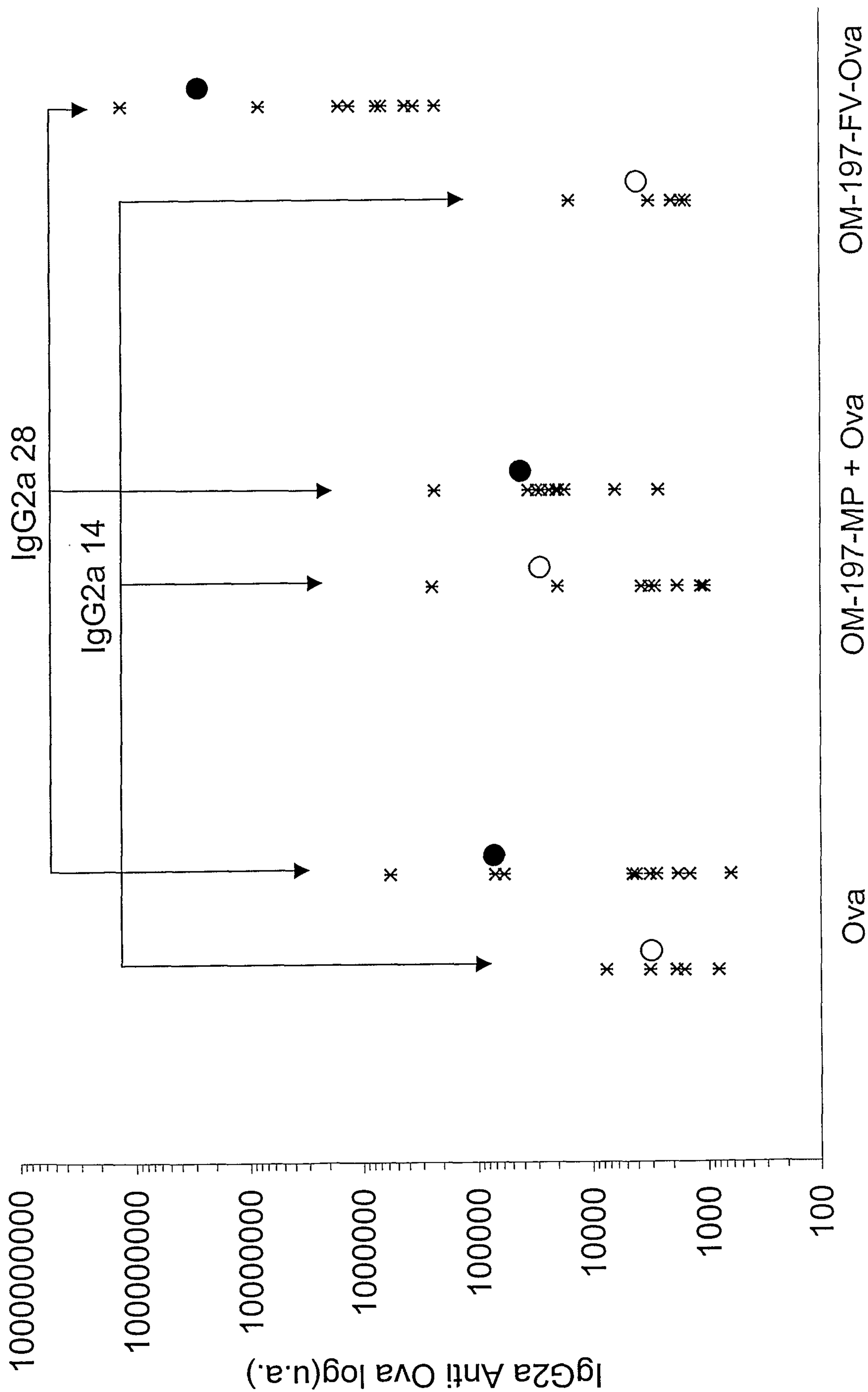




FIGURE 83

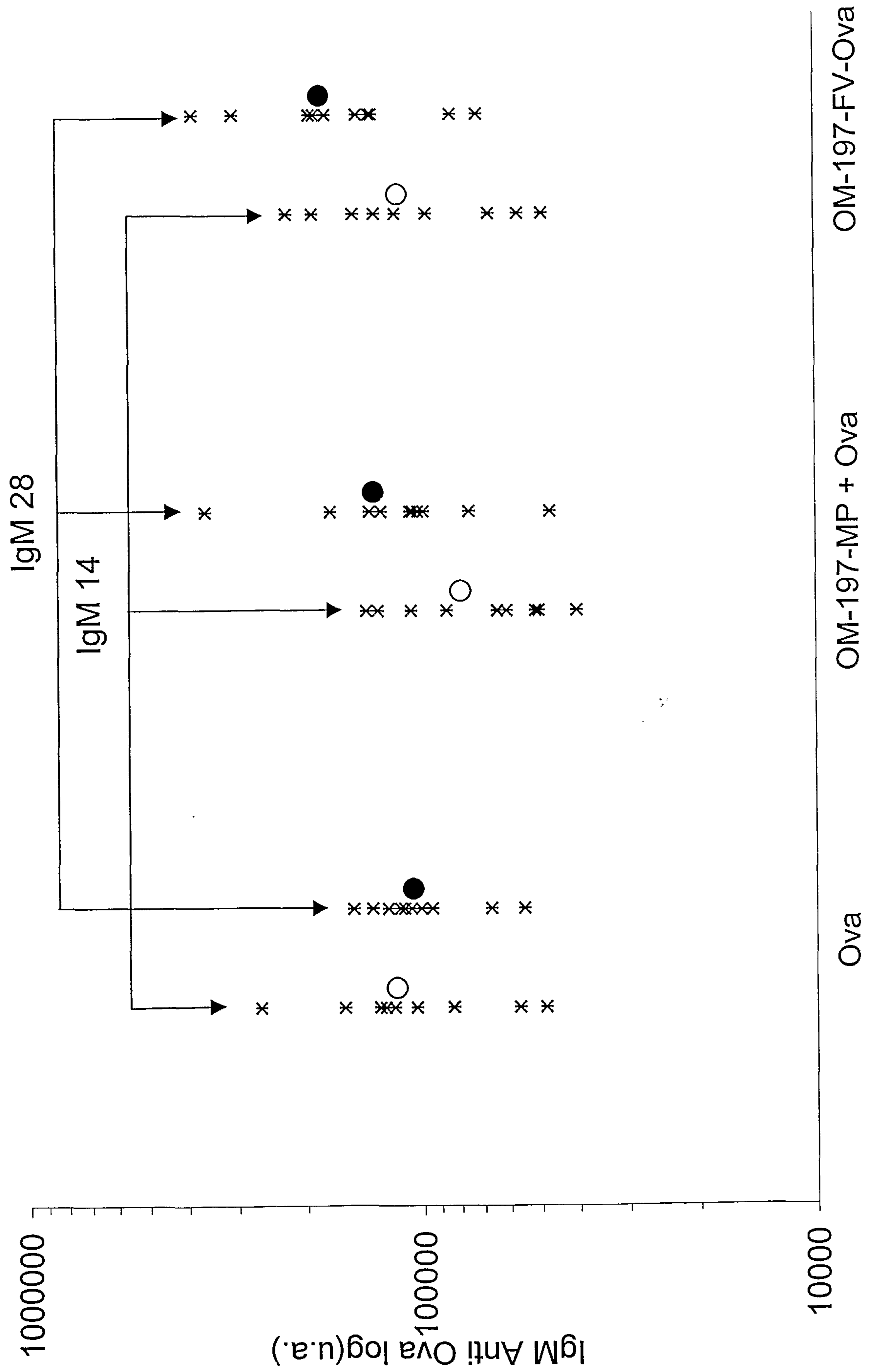


FIGURE 84

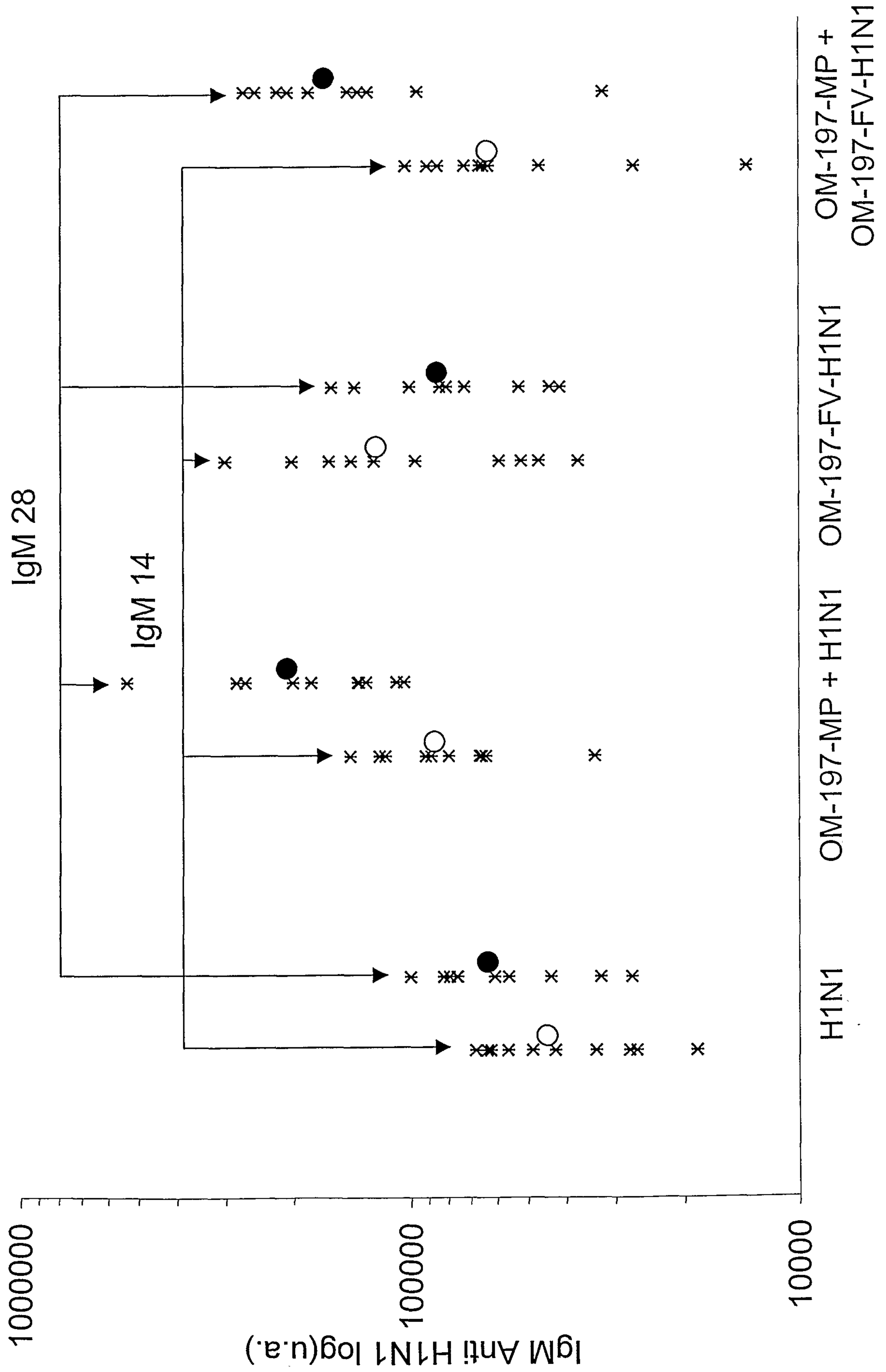
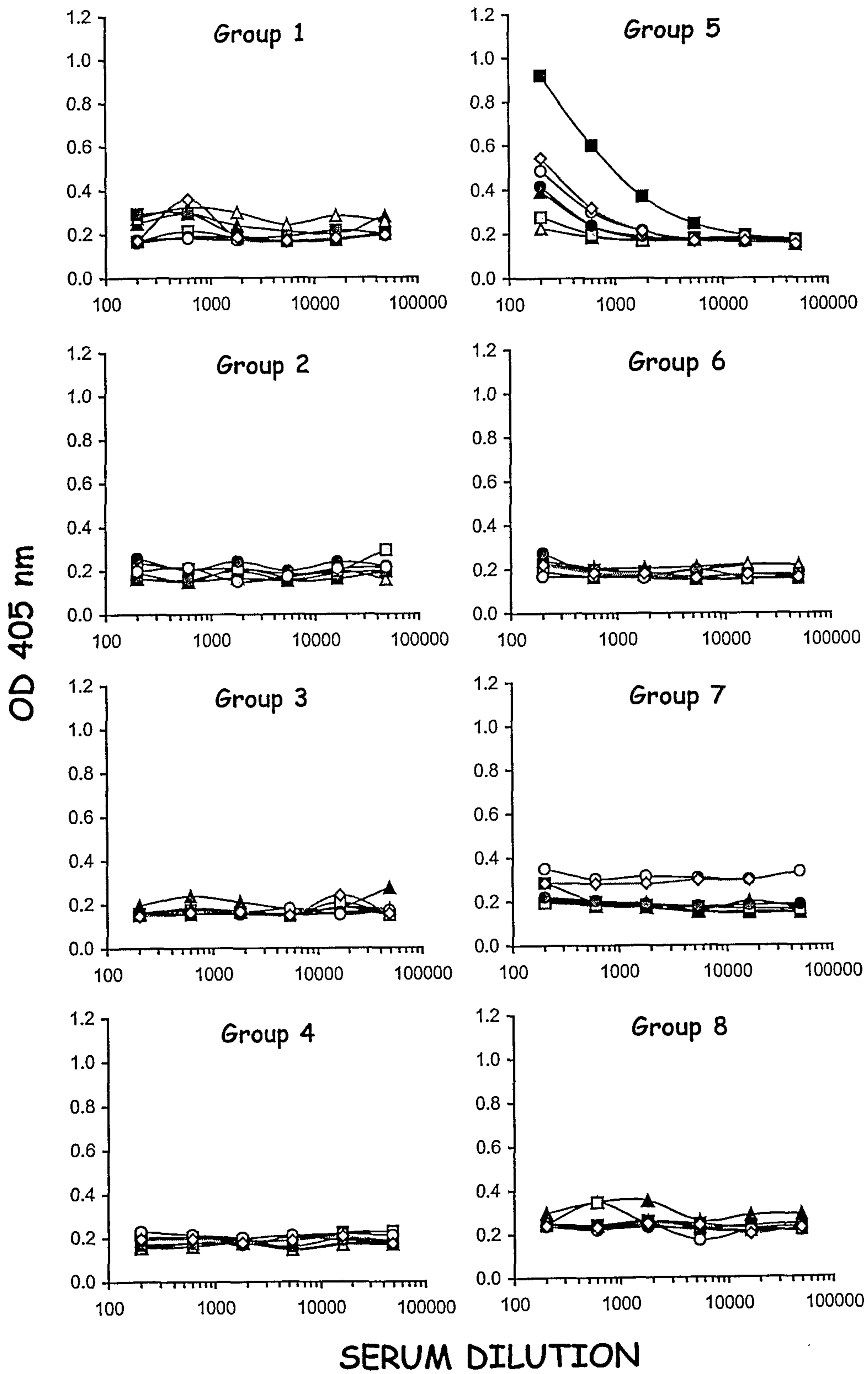


FIGURE 85



▲ A    △ B    ■ C    □ D    ● E    ○ F    ◇ G



