

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

11 N° de publication : **2 631 964**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

21 N° d'enregistrement national : **88 07252**

51 Int Cl⁴ : C 07 H 19/10; A 61 K 31/70.

12 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** A1

22 Date de dépôt : 31 mai 1988.

30 Priorité :

43 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 48 du 1^{er} décembre 1989.

60 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

71 Demandeur(s) : *INSTITUT PASTEUR, Fondation privée
reconnue d'utilité publique et CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE, établissement public. — FR.*

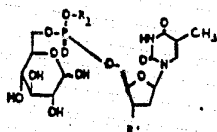
72 Inventeur(s) : Tam Huynh Dinh ; Catherine Gouyette ;
Bernadette Dupraz ; Jean Igolen ; Nathalie Savatier ;
Jean-François Nicolas ; Françoise Barré-Sinoussi.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) : S.C. Ernest Gutmann, Yves Plasseraud.

54 Glucosyl phosphotriesters de dérivés de thymidine ayant une activité contre les rétrovirus.

57 Les dérivés de l'invention répondent à la structure :



dans laquelle :

— R' représente un atome d'hydrogène ou un groupe
azido,

— et R₂, un atome d'hydrogène ou un radical hydrocarboné
de 5 à 30 atomes de carbone, saturé ou insaturé, le cas
échéant substitué. Ces dérivés sont utilisables comme compo-
sitions antirétrovirales.

FR 2 631 964 - A1

D

GLUCOSYL PHOSPHOTRIESTERS DE DERIVES DE THYMIDINE
AYANT UNE ACTIVITE CONTRE LES RETROVIRUS

5 L'invention a pour objet des glucosyl phospho-
triesters de dérivés de thymidine ayant une activité
contre les rétrovirus, en particulier contre HIV-1 et
HIV-2 .

De nombreux travaux sont consacrés à la re-
10 cherche et la mise au point de moyens de détection
d'anticorps, de prévention et de traitement de ce type
d'infections. Pour la prévention et le traitement des
infections provoquées par HIV-1 et HIV-2, on a proposé
de mettre en contact in vitro le virus avec des dérivés
15 de nucléosides.

Dans EP 0216510, on décrit l'utilisation de
dérivés de base puriques, tels que la 2',3'-didéoxyino-
sine (ddI), la 2',3'-didéoxyguanosine(ddG) ou la 2',3'-
didéoxyadénosine (ddA) , et des mono- et triphosphates
20 correspondants.

D'autres nucléosides antiviraux, constitués par des
dérivés de 3'-azido 3'-déoxythymidine (AZI) sont décrits
dans EP 0196175.

La mise au point par les inventeurs d'un procédé
25 de synthèse de dérivés de phosphotriesters de nucléo-
sides a permis de disposer de produits dont l'étude a
révélé une activité avantageuse contre les rétrovirus.

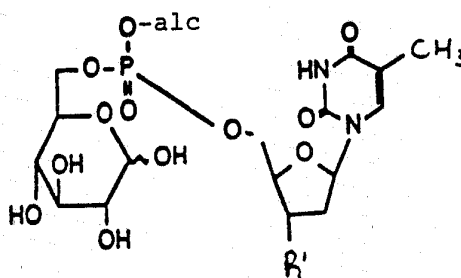
L'invention a donc pour but de fournir de
nouveaux glucosyl phosphotriesters de dérivés de thy-
30 midine et un procédé de synthèse de ces dérivés.

L'invention vise en outre à fournir des compo-
sitions à effet antirétroviral.

Les dérivés selon l'invention sont caractérisés
en ce qu'ils répondent à la structure (I) :

2

5



dans laquelle :

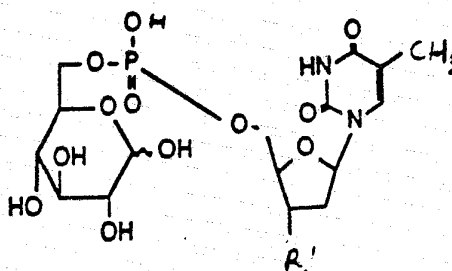
- R' représente un atome d'hydrogène ou un groupe azido,
 10 - -alc représente un radical hydrocarboné saturé ou insaturé de 5 à 30 atomes de carbone, le cas échéant substitué.

Les groupes de substitution du radical -alc représentent avantagement un groupe alcoyle de 1 à 4
 15 atomes de carbone, un groupe alcoxy de 1 à 4 atomes de carbone, un groupe amino.

Les phosphodiesters, précurseurs des glucosyl phosphotriesters ci-dessus, entrent également dans la portée de l'invention.

- 20 Les glucosyl phosphodiesters répondent à la structure (II) :

25



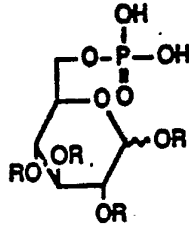
- 30 dans laquelle R' est tel que défini ci-dessus.

Selon une variante de synthèse, ces dérivés sont obtenus en mettant en oeuvre les étapes suivantes :

On fait réagir un dérivé de glucose-6-phosphate de formule (III) :

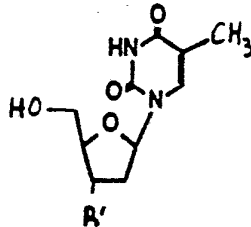
35

5



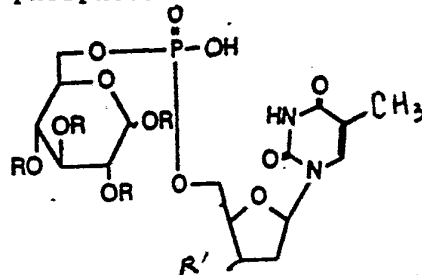
dans laquelle les radicaux R, identiques ou différents
 les uns des autres, représentent des groupes protecteurs
 de fonction hydroxyle, ce dérivé étant avantageusement
 10 sous forme de sel, avec un dérivé de thymidine de
 formule (IV) :

15



ce qui conduit au phosphodiester de formule (V) :

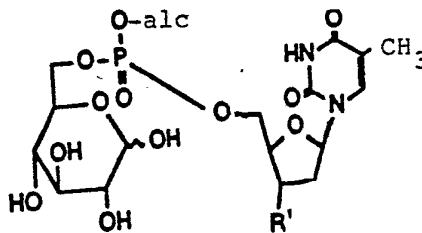
20



25 - on élimine les groupements protecteurs et, pour obtenir
 les glucosyl phosphotriesters, on fait réagir le
 phosphodiester (V) avec un dérivé réactif renfermant le
 groupe -alc, ce qui conduit au dérivé de phosphotriester
 de formule (VI) :

30

35



R' et alc présentant dans les formules ci-dessus les significations données en rapport avec la structure (I).

Les dispositions qui précèdent permettent d'obtenir des dérivés liposolubles de nucléotides
5 capables de traverser une membrane, par exemple l'enveloppe d'une cellule ou la barrière méningée, dotés d'un effet anti-viral à l'égard des rétrovirus.

La réaction de couplage entre les dérivés (III) et (IV) est réalisée à une température supérieure à
10 l'ambiante, plus spécialement de 30 à 100°C en milieu solvant organique.

Des solvants appropriés comprennent la pyridine, le trichloroéthane.

Lorsqu'on utilise la pyridine comme solvant
15 réactionnel, on obtient le couplage désiré en opérant à une température de 60 à 80°C, notamment voisine de 70°C. La réaction est effectuée sous atmosphère de gaz inerte tel que l'azote ou l'argon.

On utilise avantageusement un excès de dérivé
20 (III). Un excès en moles de 1,5 à 2 permet de réaliser le couplage dans des conditions satisfaisantes.

Pour catalyser la réaction de formation du phosphodiester, on a recours à un composé tel que le TPSCl, DCCI (Warren C.D. et Jeanloz R.W. (1973) Biochemistry 12 5038-5045 ou Warren C.D. et Jeanloz R.W. (1972) Biochemistry 11 2565-2572) ou le trichloroacétonitrile (Cramer F. et Weimann G. (1961) Chem. Ber. 94 996-1007).

Le dérivé de formule (III) utilisé dans la
30 réaction de couplage est sous forme de sel dont la réactivité favorise le couplage.

Il s'agit notamment de sel de pyridinium, de morpholine, de tétraéthylammonium.

Les groupes protecteurs sont éliminés préalablement à la fixation d'une chaîne alcoyle.
35

Parmi les groupes convenant pour la mise en oeuvre de l'invention, on citera les groupes acyle, notamment acétyle, alcoyle substitué tel que benzyle, benzoyle.

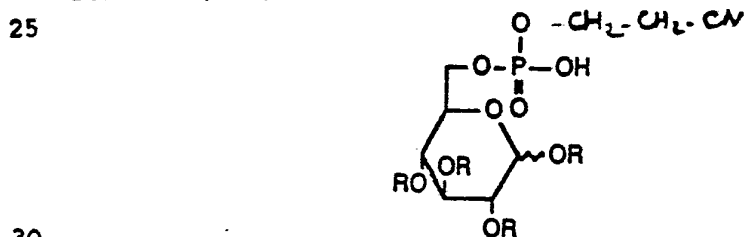
5 L'élimination de ces groupes est réalisée selon les techniques classiques de chimie organique, en opérant dans des conditions n'altérant pas la structure du phosphodiester (V) et ses substituants.

Les groupements acyle d'un mélange sont éliminés
10 par exemple à l'aide de solutions de soude ou d'un mélange NH_3/MeOH . Le dérivé réactif renfermant le groupe alc est avantageusement un halogénure, en particulier un bromure ou un iodure, ou encore un tosylate, ou un sel de sulfonium.

La réaction est réalisée avec avantage en milieu
15 solvant organique, à une température supérieure à l'ambiante, notamment de 50 à 100°C.

Parmi les solvants organiques utilisables, on citera l'acétonitrile. Le phosphodiester est de préférence sous forme d'un sel de haute réactivité et utilisé
20 en excès d'au moins environ 10 fois plus, en mole, par rapport au dérivé réactif renfermant le groupe alc.

Selon une autre variante de synthèse, on fait réagir un dérivé de 6-glucose cyanoéthylphosphate de formule (VII) :



dans laquelle R est tel que défini en rapport avec la formule (III), ce dérivé étant avantageusement sous forme de sel, avec un dérivé de thymidine de formule (IV) ci-dessus, puis on élimine les groupes de blocage
35 des fonctions hydroxyle.

La réaction de couplage est effectuée avantageusement dans un solvant organique, à température ambiante en présence de TPSNT.

Le dérivé de formule (VII) est avantageusement
5 obtenu par réaction du dérivé de glucose correspondant avec du cyanoéthylphosphate sous forme de sel réactif.

L'étude des dérivés de formules (I) et (II) ci-dessus a montré qu'à des doses non toxiques pour les lymphocytes T humains, ces dérivés sont capables d'in-
10 hiber in vitro l'effet cytopathogène des rétrovirus.

Ces dérivés sont donc avantageusement utilisables pour élaborer des compositions antivirales. De telles compositions sont caractérisées en ce qu'elles comprennent une quantité efficace d'au moins un dérivé
15 de formule (I) ou (II) en association avec un véhicule pharmacologique.

Ces compositions sont particulièrement utiles pour traiter le SIDA et les maladies apparentées.

Ces compositions se présentent sous des formes
20 appropriées pour l'administration par voie orale, nasale, topique, rectale, vaginale, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire ou intradermique.

Les compositions administrables par voie orale comprennent des tablettes, comprimés, granules, so-
25 lutions ou suspensions en milieu aqueux ou non aqueux. Pour l'administration par voie rectale, on utilise des suppositoires et par voie vaginale des crèmes ou des mousses.

Les formulations utilisées pour l'administration
30 par voie parentérale sont avantageusement formées par des solutions ou des suspensions stériles, isotomiques, aqueuses ou non-aqueuses.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront en se reportant aux exemples
35 qui suivent et aux figures 1 et 2 qui représentent

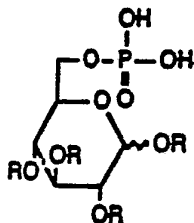
respectivement

- la figure 1, la croissance cellulaire, en fonction du temps dans le cas de cellules témoins et de cellules traitées avec des dérivés selon l'invention ;
- 5 - la figure 2, l'effet des dérivés de nucléotide sur le pouvoir infectieux de HIV-1 pour des lymphocytes humains T.

EXEMPLE 1 : Préparation de dérivés de l'azido-3'-thymidine ou AZT.

- 10 1. Préparation du sel de pyridinium du 1,2,3,4-tétra-O-acétyl 6-D-glucose phosphate, de formule :

15



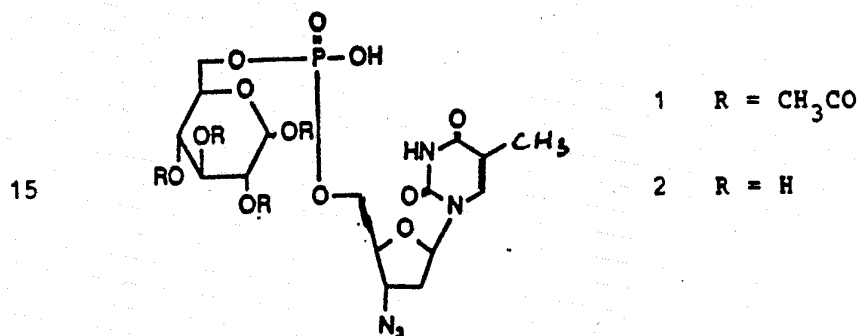
dans laquelle R = acétyle.

- 20 Le 1,2,3,4-tétra-O-acétyl 6-D-glucose phosphate est préparé selon Whistler R.L., Doner L.W. et Kosik M. (1972) *Methods in Carbohydr. Chem.* Vol. VI, 711-712 Academic Press NY ou Lardy H.A. et Fischer H.O.L. (1946) *J. Biol. Chem.* 164 513-519.

- 25 On soumet à agitation pendant 16 h à température ambiante 5 g (16,44 mmoles) de sel de sodium du 6-D-glucose phosphate et 18 ml (190,4 mmoles) d'anhydride acétique distillée dans 20 ml de pyridine. On obtient une solution orangée avec un précipité blanc : la réaction est contrôlée par CCM (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O :
 30 60/35/5) R_f départ = 0, R_f produit acétylé : 0,61. Le précipité est filtré et dans le filtrat on ajoute avec précaution environ 100 ml de glace et 10 ml d'eau pour hydrolyser l'anhydride en excès. On laisse l'hydrolyse se poursuivre 30 minutes. Le mélange est évaporé à sec
 35 sous vide et coévaporé plusieurs fois ensuite avec du

toluène. On reprend par de l'eau et on lave plusieurs fois la phase aqueuse avec du dichlorométhane. La phase aqueuse est ensuite réduite de volume avant d'être passée sur une colonne de résine Dowex 50WX8 préalablement échangée sous forme pyridinium. La sortie de colonne est contrôlée par CCM et les bonnes fractions sont lyophilisées. $m = 6,54 \text{ g}$, $Rdt = 68 \%$.

2. Préparation du 1,2,3,4-tétra-O-acétyl 6-glucosyl 5'-(azido-3')thymidinyl phosphate (Composé 1 dans la formule ci-dessous) :



On soumet à une co-évaporation à trois reprises, avec de la pyridine anhydre, 200 mg (0,75 mmoles) d'azido-3' thymidine (AZT) et 656 mg (0,75 mmoles x 1,5 excès) de 1,2,3,4-tétra O-acétyl 6-D-glucose phosphate sous forme pyridinium. On ajoute environ 15 ml de pyridine anhydre et 2,56 ml de trichloroacétonitrile (0,75 mmoles x 35 excès). On chauffe le mélange à 70°C en agitant bien et en maintenant sous atmosphère d'azote pendant 16 h. On évapore à sec sous vide puis on reprend le mélange par un minimum de dichlorométhane et on précipite par l'éther de pétrole. On décante l'éther de pétrole et le précipité est chromatographié sur colonne de silice Merck 7734 (R) éluee avec du dichlorométhane enrichi en méthanol. Le composé est élué vers un mélange à 10 % de méthanol.

$m = 540 \text{ mg}$ $Rdt : 95 \%$, $Rf = 0,54$ (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 13/5/1).

3. Préparation du 6-glucosyl 5'-(azido-3')-thymidinyl phosphate (composé 2 dans la formule ci-dessus). Ce composé sera désigné ci-après par le code 6715.

5 On utilise 540 mg de produit 1 obtenu précédemment. On élimine les groupes acétyl dans du méthylate de sodium à 1 % dans du méthanol pendant 10 minutes à température ambiante. Il apparaît un léger trouble. On vérifie par CCM que la réaction est complète. On
10 neutralise par addition de résine Dowex 50WX8 H⁺ (R). A pH = 7, on filtre la résine et le précipité et on évapore la phase méthanolique à sec. On reprend par un minimum d'eau et passe sur colonne de Biogel P2 200/400 mesh (R) éluée à l'eau. La sortie de colonne est dé-
15 tectée par UV à 254 nm. Après vérification par CCM, les fractions contenant le composé cherché sont lyophilisées avant d'être repassées sur une colonne de silice C-18 éluée à l'eau afin d'achever la purification.
m = 283 mg Rdt = 67 %, Rf = 0,65, isopropanol/NH₄/OH/H₂O
20 7/1/2.

4. Préparation du sel de pyridinium du 1,2,3,4 tétra-O-acétyl 6-D-glucose β-cyanoéthyl phosphate.

On échange le sel de baryum du cyanoéthyl phosphate en sel de pyridinium en le passant sur colonne
25 de Dowex H⁺ (R) et en recueillant le produit dans de la pyridine.

L'échange porte sur 2,5 g de cyanoéthyl phosphate. On évapore à sec après passage sur la colonne. On obtient 7,75 mM de sel de pyridinium que l'on co-évapore
30 trois fois avec de la pyridine. On ajoute 2,58 mM de 1,2,3,4 tétracétyl glucose, soit 900 mg. On coévapore 2 fois avec de la pyridine. On reprend dans 20 ml de pyridine anhydre, puis on ajoute 7 ml (58 mM) de trichloroacétonitrile fraîchement distillé. On dégaze
35 avec de l'azote et on laisse à 75°C sous azote durant 14

heures environ.

La solution est évaporée à sec, reprise dans un minimum de CH_2Cl_2 et précipitée avec de l'éther de pétrole. La purification est effectuée sur colonne de silice (9385 Merck $\text{\textcircled{R}}$). On élue avec du CH_2Cl_2 enrichi en MeOH. On obtient 760 mg de produit (61 %). Rf : 0,51 ; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (8/1).

5. Préparation du 6-glucosyl 5'-(azido-3') thymidinyphosphate **2** (6715) à partir du 6-glucosyl cyanoéthyl phosphate.

200 mg (0,75 mmoles) d'AZT et 469 mg (0,97 mmoles) de 1,2,3,4 tétra acétyl-6-glucose cyanoéthyl phosphate sont coévaporés trois fois avec la pyridine. On ajoute 4 ml de pyridine anhydre et 616 mg de TPSNT (2 éq.). On laisse 3 h à température ambiante. Après lavage avec une solution de NaHCO_3 saturée puis H_2O , la phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et évaporée à sec. La purification se fait : 1) sur une colonne de silice Merck 9385 $\text{\textcircled{R}}$, 2) sur une colonne de Séphadex LH 20 $\text{\textcircled{R}}$ éluee avec le mélange THF/MeOH 95/5. On obtient 312 mg (55 %) du phosphotriester dont on élimine les groupes acétyle avec du méthylate de sodium 1 % pendant 15 minutes, à température ambiante. Le même traitement que précédemment, après neutralisation avec une résine Dowex $\text{\textcircled{R}}$ donne le composé **2** (165 mg) identique à celui obtenu sous 3.

6. Echange du sel de pyridinium en sel de tétrabutyl-ammonium.

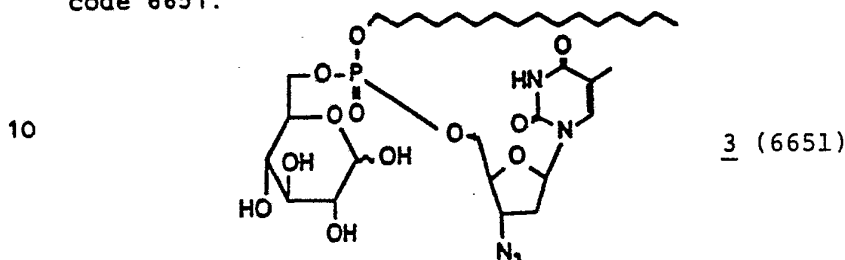
On prépare une colonne de résine Dowex 50WX8 $\text{\textcircled{R}}$ que l'on a équilibrée sous forme tétrabutyl-ammonium en mettant à échanger de la résine Dowex 50WX8 H^+ $\text{\textcircled{R}}$ sous agitation pendant deux heures dans l'hydroxyde de tétrabutylammonium concentré puis en le lavant jusqu'à pH neutre des eaux de lavage.

Les 283 mg de **2** obtenus précédemment sont passés

sur cette colonne. On recueille les fractions absorbant à 254 nm qui sont lyophilisées.

308 mg, Rdt : 85 %, Rf : inchangé, Masse FAB 508 (M+1), HPLC : 2 pics 5,00 et 5,33 mm.

- 5 7. Préparation du 6-glucosyl hexadecyl 5'-(azido-3')thymidinyl phosphate 3 désigné ci-après par le code 6651.



- 15 On évapore sous vide avec de l'acétonitrile anhydre 2,80 mg de diester sous forme tétrabutylammonium (0,372 mmoles) et 2,11 ml de 1-idohexadecane (0,372 mmoles x 18 excès). Puis on ajoute environ 15 ml d'acétonitrile anhydre et on chauffe à 80°C pendant 16 à 20
- 20 heures. On contrôle alors la réaction par CCM. On évapore à sec le mélange, on reprend par un minimum de dichlorométhane et on dépose la solution sur colonne de silice Merck 7734 (R). L'élution se fait au dichlorométhane pur pour enlever la chaîne en excès. Ensuite, on
- 25 enrichit en méthanol. Les fractions contenant le phosphotriester sortent à une concentration de 10-15 % en méthanol. Après concentration, ces fractions sont repassées sur une colonne de Séphadex LH 20 (R) éluee avec un mélange THF/MeOH 80/20. On obtient 150 mg, 55 %, 30 Rf = 0,695 isopropanol/NH⁴OH/H₂O 7/1/2, Masse FAB⁺ 734 (M+1), HPLC temps de rétention 13,77 min et 14,11.

EXEMPLE 2.

Préparation de dérivés de dérivés de 3'-désoxythymidinyle.

- 35 Les produits dont la synthèse est rapportée

ci-après présentent les formules correspondantes données dans l'exemple 1, le nucléotide étant remplacé par le 3'-désoxy thymidinyl.

1. Préparation du 1,2,3,4 tétra-O-acétyl 6-glucosyl 5', (3'-désoxy)thymidinyl phosphate.

On opère comme précédemment. 100 mg de 3'-désoxy-thymidine (ddT) (0,442 mmoles) et 388 mg de tétra-acétyl 6-D-glucose phosphate (0,442 mmoles x 1,5 excès) traités avec 1,5 ml CCl_3CN , (0,442 x 34 excès) ont donné
10 215 mg, Rdt : 68 %, Rf = 0,6 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 13/5/1).

2. Préparation du 6-glucosyl 5'-(3'-désoxy)-thymidinyl phosphate (désigné sous le code 6714).

On opérant comme précédemment en purifiant sur Biogel $\text{\textcircled{R}}$ et silice C-18 $\text{\textcircled{R}}$, on obtient les résultats
15 suivants :

m = 72 mg, Rdt = 44 %, Rf = 0,58 (isopropanol/ $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 7/1/2).

Echange en sel $\text{N}(\text{Bu})_4^+$, m = 90 mg, Rdt = 96 %, Rf inchangé, masse FAB = 468 (M - 1), HPLC temps rétention = 10,77 min.
20

3. Préparation du 6-glucosyl hexadecyl 5'-(3'-désoxy)thymidinyl (désigné sous le code 6650).

Sur 137 mg de diester $\text{N}(\text{Bu})_4^+$ (0,193 mmoles) et 1,091 ml d'iodo-1-hexadecane (0,193 mmoles x 18 excès),
25 on obtient m = 28 mg, Rdt = 21 %, Rf = 0,63 (isopropanol/ $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 7/1/2).

masse FAB^+ = 693 (M + 1), HPLC temps rétention 3 pics (12,71 min, 13,04 min, 13,38 min).

Les mesures en HPLC rapportées dans les exemples
30 sont effectuées en utilisant des colonnes en phase inverse Nucléosil C18 $\text{\textcircled{R}}$ (1/4" x 15 cm) analytique, (1/2" x 25 cm) préparative. Les conditions sont les suivantes, A représentant l'acétonitrile, et B l'acétate de triéthylammonium 10^{-2} , pH 7 :

35 triester : 50 % A 20 mn, 95 % A dans A + B (en 20 mn)

diester : 5 % A 20 mn 25 % A dans A + B (en 20 mn)

Etude in vitro du transport trans-membranaire

L'étude du comportement du phosphotriester de la
 thymidine comme modèle sur des vésicules unilamellaires
 5 de 200 nm de diamètre, en spectroscopie RMN du ^{31}P ,
 et ^{13}C a montré que le phosphotriester traverse la
 couche lipidique et se retrouve intact à l'intérieur des
 vésicules, alors que les phosphodiester correspondants
 soit ne traversent pas, soit font éclater les vésicules
 10 (effet détergent) aux concentrations utilisées.

EXEMPLE 3 : Etude des produits à action rétro-
 virus.

Le virus utilisé est un rétrovirus recombinant
 d'origine murine (MoMLV) où un gène reporter (LacZ) a
 15 été introduit. Il est produit dans des lignées
 transcromplémentantes qui ne produisent pas de virus
 sauvages.

Des quantités fixes de rétrovirus recombinants
 LacZ sont mises en présence de cellules testrices
 20 infectables de souris (3T3) avec ou sans le produit à
 tester. A chaque rétrovirus recombinant correspond un
 clone de cellules β gal $^+$. Le nombre de clones de
 cellules β gal $^+$ est lu 48 heures après l'infection. Le %
 du virus résiduel (non inhibé par le produit) est
 25 indiqué dans le tableau 2 suivant (moyenne de plusieurs
 manipulations indépendantes):

	10^{-4}M	10^{-5}M	10^{-6}M	10^{-7}M
AZT	0%	0%	0%	1%
30 6715	0%	0%	3%	
6651	11%	65%	94%	
ddt		78%	87%	101%
6714		4%	12%	66%
6650		79%	78%	96%

35 Les produits AZT, 6714 sont actifs par eux-
 mêmes.

EXEMPLE 4 : Etude de l'effet des dérivés de phosphodiester et de phosphodiester sur le pouvoir infectieux du virus HIV1, in vitro.

a) Produits testés

On rapporte ci-après les résultats obtenus avec les produits des exemples appelés 6651 et 6714. Chaque produit a été dissous dans du DMSO à une concentration de $10^{-3}M$ (solution-mère), puis, dans le milieu de culture immédiatement avant l'emploi. La solution ainsi obtenue a été stérilisée par filtration sur Millipore 0.22 μ puis des dilutions successives ont été réalisées dans du milieu de culture.

b) Milieu de culture

Les cultures de lymphocytes T humains sont maintenues dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% de sérum de veau foetal (Seromed), 1% de glutamine (Gibco), 1% d'antibiotiques (PSN, Gibco), 10% d'interleukine II (Biotest), 2 $\mu g/ml$ de polybrène (Sigma) et une dilution 1/2500 de sérum-interféron α humain. Ce milieu est appelé milieu complet.

La lignée de cellules MT4 est cultivée à raison de 3×10^5 cellules/ml dans un milieu RPMI 1640 contenant 10% de sérum de veau foetal, 1% d'antibiotiques et 1% de glutamine.

c) Cellules

La cytotoxicité des produits a été étudiée sur des lymphocytes T humains obtenus à partir du sang périphérique d'un donneur séro-négatif. Préalablement au

traitement, ces lymphocytes sont stimulés par de la phytohémagglutinine p (PHAP) (Difco) pendant 3 jours.

L'effet des produits sur la multiplication du virus HIV1 a été étudié sur des lymphocytes T humains obtenus à partir du sang périphérique d'un donneur séronégatif. Les lymphocytes ont été isolés par gradient de Ficoll (Pharmacia) puis stimulés pendant 3 jours par de la phytohémagglutinine p (PHAP) (Difco) avant d'être utilisés pour le traitement et l'infection par le virus HIV1.

L'action des produits sur l'effet cytopathogène du virus HIV1 a été étudiée à l'aide de la lignée de cellules MT4. Cette lignée est une lignée de cellules T humaines transformées par le virus HTLV1. Ces cellules sont particulièrement sensibles au virus HIV1 puisque 6 à 7 jours après surinfection par des quantités infimes de virus HIV1, elles montrent un effet cytopathogène important conduisant 10 à +80% des cellules vers la mort. L'effet cytopathogène est directement corrélé à l'infection des cellules par le virus, à sa réplication intracellulaire et à l'expression des antigènes viraux par les cellules. Une inhibition de cet effet correspond donc à une inhibition de la multiplication du virus HIV1.

d) virus

Il s'agit de surnageants de cellules T lymphoblastoïdes (lignée CEM) infectés par le virus HIV1 (souche LAV). L'activité de la préparation virale non diluée, utilisée pour les lymphocytes humains était de 200.00 cpm/ml.

2) Méthodes

a) Etude de la cytotoxicité des produits pour des cellules T.

10^6 lymphocytes stimulés par de la PHAP ont été traités pendant 10 jours par des doses croissantes de

produit ($10^{-5}M$; $5 \times 10^{-6}M$; $10^{-6}M$). Le produit a été ajouté à chaque passage cellulaire effectué tous les 3 ou 4 jours. A chaque passage, les cellules ont été comptées après coloration au bleu trypan puis remises en suspension à 10^6 cellules par ml dans du milieu complet contenant ou non des doses croissantes de produit. Cette expérience a été réalisée dans une plaque à 24 puits (Nunc).

b) Action des produits sur le pouvoir infectieux du virus HIV1 pour des lymphocytes T humains. - Action d'un traitement après adsorption virale-

Des lymphocytes humains préalablement stimulés par de la PHAp ont été infectés par du virus HIV1 (activité transcriptase inverse : 5000 cpm/ 10^6 cellules). Après 1 heure d'adsorption virale à $37^{\circ}C$, les lymphocytes ont été resuspendus à 10^6 cellules par ml dans du milieu de culture contenant ou non des doses croissantes de chaque produit ($10^{-5}M$; $5 \times 10^{-6}M$; $10^{-6}M$). Tous les 3 ou 4 jours (passages cellulaires), les cellules ont été centrifugées puis resuspendues à 10^6 cellules par ml dans du milieu de culture contenant le produit. La production virale a été suivie à chaque passage (et cela pendant 13 jours) en mesurant l'activité transcriptase inverse présente dans 1 ml de surnageant de culture. La production virale par les cellules traitées a pu être ainsi comparée à celle observée pour les cultures témoins non traitées.

c) Mesure de l'activité transcriptase inverse

La production du virus HIV1 par des cellules T humaines traitées ou non par chaque produit été régulièrement suivie en mesurant l'activité transcriptase inverse présente dans 1 ml de surnageant de culture. Cette méthode est décrite par Rey et al dans B.B.R.C. (1984), 124, 121-133. 1 ml de surnageant est concentré 100 fois par ultracentrifugation, puis

l'activité enzymatique de cet échantillon est déterminée dans 50µl d'un mélange réactionnel contenant 50mM Tris pH 7,9, 20mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM dithiotreitol, 0,05 OD/ml Poly A, 0,05 OD/ml oligodt12-18, 5µCi³HTP et 0,1% triton X100. Après 1 heure d'incubation à 37°C, les produits acido-insolubles sont précipités par de l'acide trichloracétique 20%, filtrés sur Millipore 0,45µ puis la radioactivité β contenue dans ces produits de réaction est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation Kontron.

d) Action des produits sur l'effet cytopathogène du virus HIV1 pour les cellules MT4. - Etude du traitement après adsorption virale-





Les cellules MT4 ont été infectées par 100µl de virus HIV1 pour 3.10⁵ cellules dans un volume de 1 ml. Après 30 minutes d'adsorption virale à 37°C, les cellules ont été lavées puis remises en suspension à raison de 3.10⁵ cellules/ml dans du milieu contenant chaque produit aux concentrations suivantes: 10⁻⁵M; 45 x 10⁻⁶M et 10⁻⁶M.

Au jour +3, les suspensions cellulaires ont été ramenées à 3.10⁵ cellules/ml après dilution avec du milieu frais. le produit a été rajouté aux doses correspondantes.

Au jour +7, l'effet cytopathogène a été évalué au microscope après coloration au bleu trypan.

II - Résultats

1) Etude de la cytotoxicité des produits pour des lymphocytes T humains.

Sur la figure 1, on a rapporté la variation de la croissance cellulaire (x10⁶ cellules/ml) en fonction du temps, en jours. Les représentations utilisées ont les significations suivantes:  témoin cellules; cellules traitées avec les produits obtenus dans l'invention à des concentrations de 10⁻³M ; 5x10⁻⁶M  et 10⁻⁶M .

Comme le montre cette figure 1, un traitement de 10 jours par le produit 6651 est sans effet significatif sur la croissance de cellules T in vitro aux doses utilisées. Lorsque les cellules sont traitées par le produit 6714 aux mêmes doses pendant 3 jours, aucun effet n'est observé sur la multiplication cellulaire.

2) Effet des produits sur le pouvoir infectieux du virus HIV1 pour des lymphocytes T humains.

La figure 2 montre que le produit 6651 à la dose de $10^{-5}M$ entraîne une inhibition totale de la multiplication du virus. Un traitement par le produit 6714 provoque une inhibition partielle proportionnelle à la dose de produit utilisée.

3) Action des produits sur l'effet cytopathogène du virus HIV1 pour les cellules MT4.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 1 ci-après:

Effet cytopathogène au jour +7

	Produit	Concentrations	Expérience N°1	Expérience N°2
20	6651	$10^{-5}M$	-	-
		$5 \times 10^{-6}M$	-	+
		$10^{-6}M$	-	+
		$5 \times 10^{-7}M$	+	+
25	6714	$10^{-5}M$	NT	-
		$5 \times 10^{-6}M$	NT	+
		$10^{-6}M$	NT	+
30	-	0	+	+

+ = 100% de mort des cellules au jour +7

- = inhibition totale de l'effet cytopathogène

NT = non testé

Le produit 6651 inhibe cet effet cytopathogène à $10^{-6}M$ dans une première expérience et à $10^{-5}M$ dans une

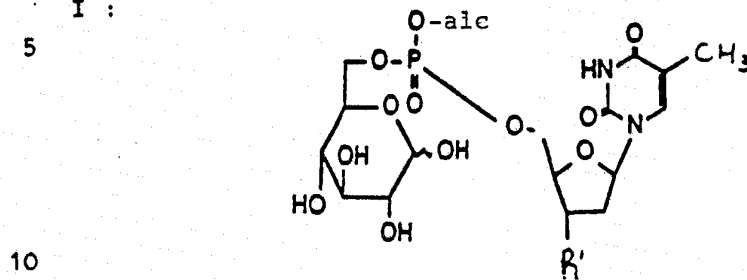
seconde expérience.

Le produit 6714 à 10^{-5} s'est révélé inhiber le pouvoir cytopathogène du virus lors d'une expérience.

5 Sur la figure 2, on a rapporté l'activité $RTx10^4$ (cpm x 10^6 cellules) la fonction du temps, en jours. La courbe "___" représente les résultats avec le virus témoin; les résultats obtenus en utilisant les produits testés à des concentrations respectivement de $10^{-5}M$, $5 \times 10^{-6}M$ et $10^{-6}M$ sont représentés par "----", "-.-" et
10 "-x-x-x-".

REVENDICATIONS

1. Dérivés de thymidine, caractérisés en ce qu'il s'agit de glucosyl phosphotriesters de structure I :



dans laquelle :

- R' représente un atome d'hydrogène ou un groupe azido,
 - alc représente un radical hydrocarboné saturé ou insaturé de 5 à 30 atomes de carbone, le cas échéant substitué.
- 15

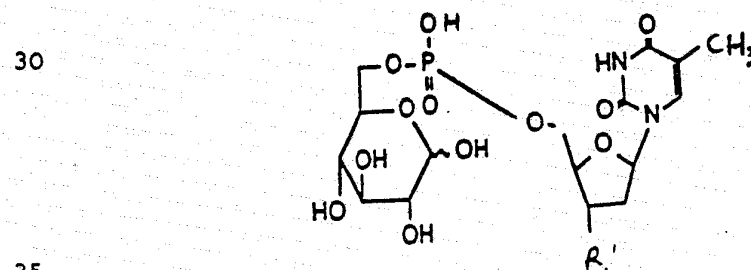
2. Dérivés selon la revendication 1, caractérisés en ce que le groupe alc représente un groupe alcoyle de 1 à 4 atomes de carbone, un groupe alcoxy de 1 à 4 atomes de carbone ou un groupe amino.

20

3. Glucosyl phosphotriester caractérisé en ce qu'il s'agit du 6-glucosyl hexadécyl 5'-(azido-3') thymidinyl phosphate ou du 6-glucosyl-hexadécyl-5'-(3'-désoxy)thymidinylephosphate.

25

4. Glucosyl phosphodiester de dérivés de thymidine, caractérisé en ce qu'ils répondent à la structure II :

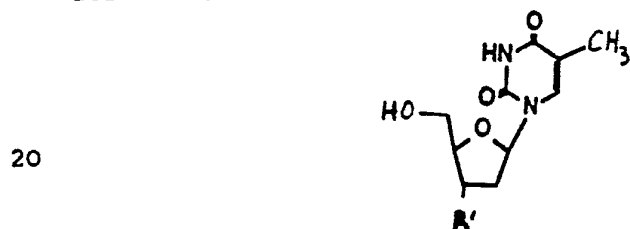


dans laquelle R' est tel que défini ci-dessus.

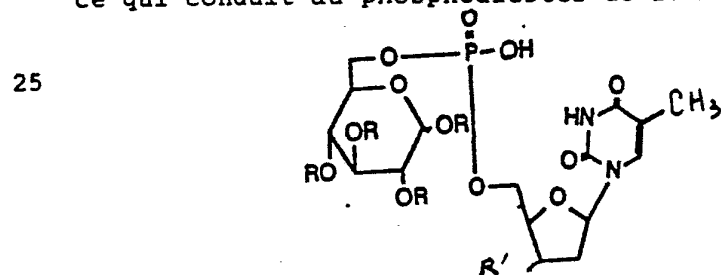
5. Procédé de synthèse des dérivés de thymidine selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on fait réagir un dérivé de glucose-6-phosphate de formule (III) :



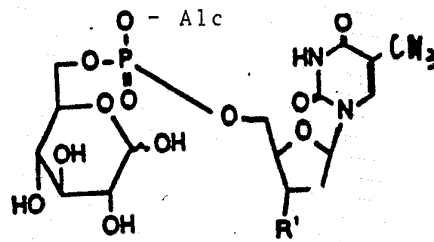
dans laquelle les radicaux R, identiques ou différents les uns des autres, représentent des groupes protecteurs de fonction hydroxyle, ce dérivé étant avantageusement sous forme de sel, avec un dérivé de thymidine de formule (IV) :



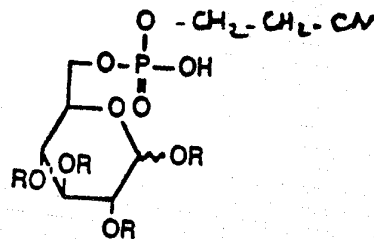
ce qui conduit au phosphodiester de formule (V) :



30 - on élimine les groupements protecteurs et, pour obtenir les glucosyl phosphotriesters, on fait réagir le phosphodiester (V) avec un dérivé réactif renfermant le groupe -alc, ce qui conduit au dérivé de phosphotriester de formule (VI) :



5 R' et alc présentant dans les formules ci-dessus les significations données en rapport avec la structure (I), ou qu'en variante, on fait réagir un dérivé de 6-glucose cyanoéthyl phosphate de formule (VII) :



10 dans laquelle R est tel que défini en rapport avec la formule (III), ce dérivé étant avantageusement sous forme de sel, avec un dérivé de thymidine de formule (IV) ci-dessus.

20 6. Compositions antivirales caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace d'au moins un dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

25

30

35

1/2

2631964

Croissance cellulaire (10^6 cellules x ml)

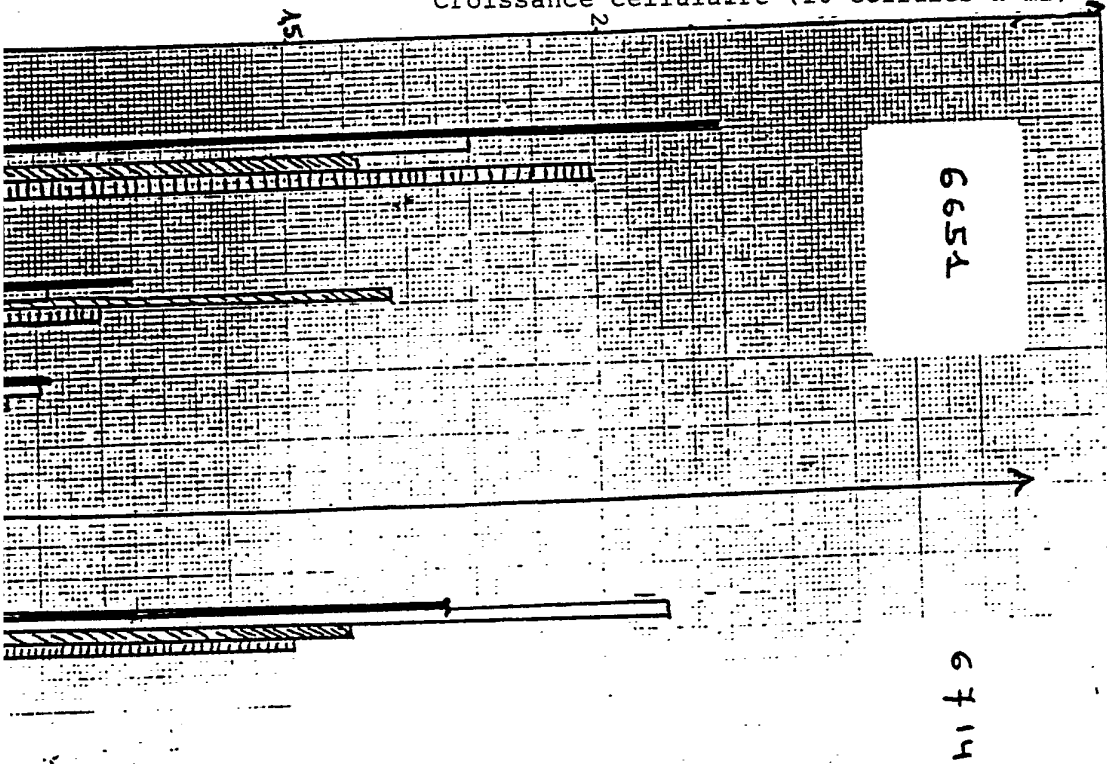


Figure 1

2/2

2631964

Activité RT x 10⁴
(cpm x 10⁶ cellules)

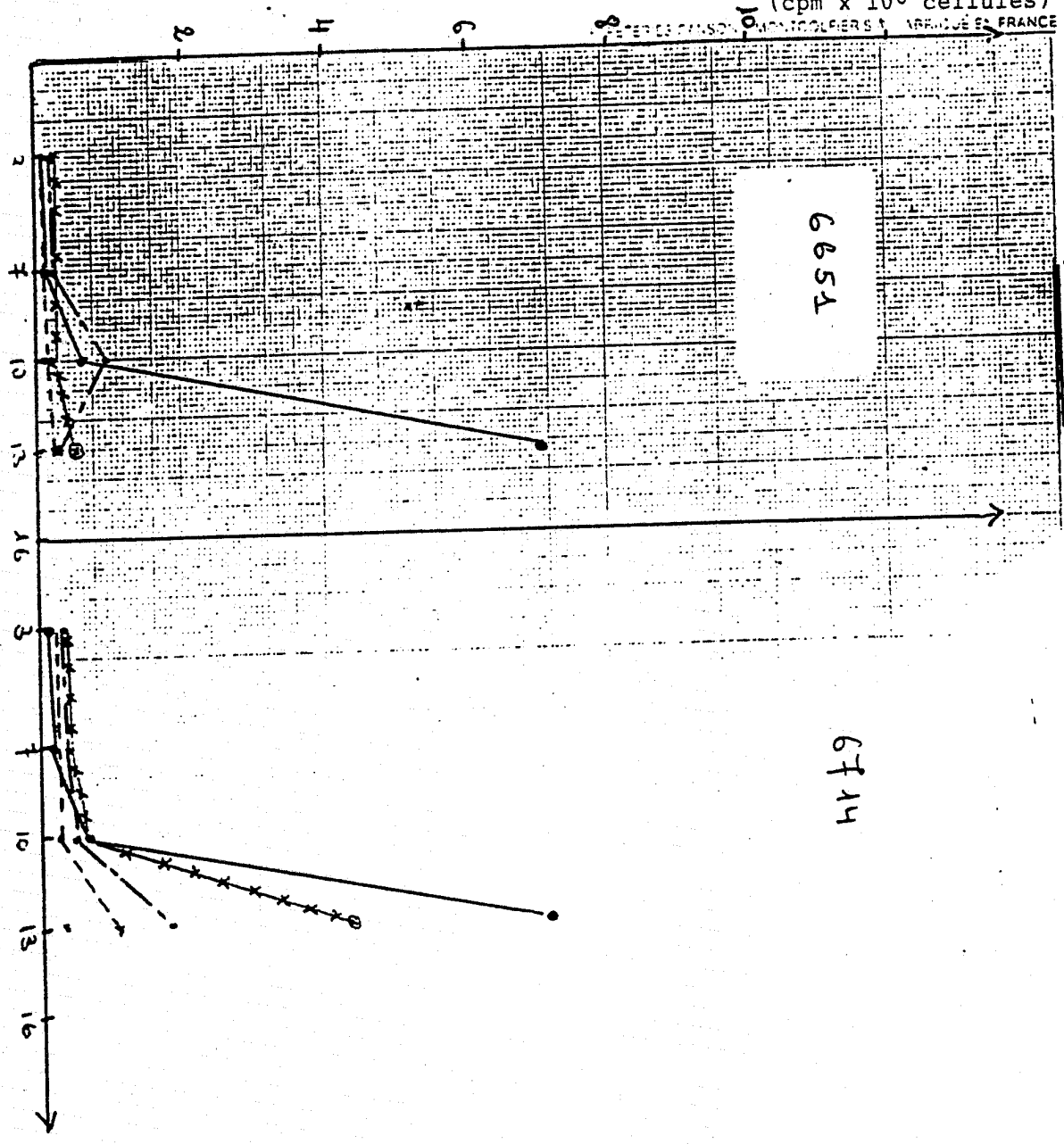


FIGURE 2