

(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
3 août 2006 (03.08.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/079698 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A01N 65/00 (2006.01) G02B 1/04 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)

(74) Mandataires : GOULARD, Sophie etc.; CABINET
ORES, 36, Rue De St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2006/000097

(22) Date de dépôt international :
25 janvier 2006 (25.01.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0500843 27 janvier 2005 (27.01.2005) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : THER-
APOL [FR/FR]; 63, Rue De Strasbourg, F-93200 Saint De-
nis (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : JOZE-
FOWICZ, Marcel [FR/FR]; 65, Deuxième Avenue,
F-60260 Lamorlaye (FR). JOZEFONVICZ, Jacqueline
[FR/FR]; 65, Deuxième Avenue, F-60260 Lamorlaye
(FR). SIALI, Rosa [FR/FR]; 1, Bis Avenue Du Colonel
Fabien, F-93200 Saint-denis (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

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

(54) Title: USE OF FUCANS FOR PREPARING A BACTERIOPHOBIC AND BACTERIOSTATIC MATERIAL,
CORRESPONDING MATERIAL AND APPLICATIONS

(54) Titre : UTILISATION DE FUCANES POUR LA PREPARATION D'UN MATERIAU BACTERIOPHOBE ET BACTERIO-
STATIQUE, MATERIAU CORRESPONDANT ET APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to the use of fucans having a molar mass ranging from 8,000 to 30,000 g/mol, preferably
between 10,000 and 20,000 g/mol, for preparing a material that is bacteriophobic, bacteriostatic and inhibits the activity of the
complement system as well as to a material impregnated with a solution that contains these fucans and, in particular, to a material
provided in the form of an ophthalmic device such as contact lenses.

(57) Abrégé : La présente Invention est relative à l'utilisation de fucanes de masse molaire comprise entre 8 000 et 30 000 g/mol, de
préférence entre 10 000 et 20 000 g/mol, pour la préparation d'un matériau bactériophobe, bactériostatique et inhibiteur de l'activité
du système du complément ainsi qu'à un matériau imprégné par une solution comprenant de tels fucanes, et en particulier à un
matériau se présentant sous la forme d'un dispositif ophtalmique tel que des lentilles de contact.



WO 2006/079698 A1

UTILISATION DE FUCANES POUR LA PREPARATION D'UN MATERIAU BACTERIOPHOBE ET BACTERIOSTATIQUE, MATERIAU CORRESPONDANT ET APPLICATIONS

**UTILISATION DE FUCANES SELECTIONNES POUR LA PREPARATION
D'UN MATERIAU BACTERIOPHOBE ET BACTERIOSTATIQUE,
MATERIAU CORRESPONDANT ET APPLICATIONS**

La présente Invention est relative à l'utilisation de fucanes de masse
5 molaire convenablement sélectionnée pour la préparation d'un matériau
bactériophobe, bactériostatique et inhibiteur de l'activité du système du complément, à
un matériau imprégné par une solution comprenant de tels fucanes, et en particulier à
un matériau se présentant sous la forme d'un dispositif ophtalmique.

L'élaboration de divers matériaux ayant des propriétés
10 bactériophobes et bactériostatiques, en particulier pour la fabrication de dispositifs
ophtalmiques tels que des lentilles de contact, présente un intérêt certain en vue de
diminuer les risques d'infection.

En effet, l'utilisation de lentilles de contact pour la correction de la
vision humaine implique une interaction entre la surface de la lentille et les larmes, et
15 en particulier avec les protéines lacrymales. Ces dernières sont à l'origine de la
contamination et de la dégradation des lentilles de contact et sont par ailleurs
impliquées dans l'adhésion de bactéries et dans les phénomènes d'inflammation de
l'œil. L'adhésion de protéines lacrymales sur la lentille crée des conditions favorables
à l'inflammation et à l'infection de la cornée.

20 Cette adhésion est fonction du type de matériau constituant la
lentille. Des tentatives d'inhibition de la croissance des bactéries et/ou d'autres
microbes ont déjà été faites dans l'art antérieur, notamment dans la demande de brevet
européen EP-A-1 050 314, par incorporation d'argent dans les lentilles de contact.

D'autres approches de l'art antérieur dans l'élaboration de supports
25 qui possèdent de telles propriétés utilisent notamment des drogues ou des métaux
lourds (Demande Internationale WO 2004/094075). Cependant, l'utilisation de
drogues peut conduire au développement de mécanismes de résistance chez les
bactéries et tous les effets secondaires indésirables liés à l'utilisation de métaux lourds
ne sont pas encore connus.

30 En vue de diminuer les risques d'infection et d'inflammation
engendrés par le port de lentilles de contact et par conséquent de procurer un meilleur
confort visuel, de nombreuses recherches se sont orientées vers le développement de

lentilles de contact inhibitrices ou non stimulatrices de l'adhésion et de la prolifération bactériennes.

C'est ainsi qu'il a déjà été proposé, notamment par le brevet américain US 6,514,517, d'utiliser des solutions à base de précurseurs d'acides biocompatibles pour revêtir des matériaux dans le but de leur conférer des propriétés bactériophobes et inhibitrices de la prolifération microbienne ou bien encore, dans le brevet américain US 6,592,814, des lentilles de contact comportant un revêtement antimicrobien à base de lactoferrine.

Or à ce jour, les diverses solutions proposées ne donnent pas entièrement satisfaction notamment à cause des effets secondaires des différents principes actifs utilisés.

Les Inventeurs se sont donc donnés pour but d'élaborer un matériau présentant des propriétés bactériophobes et bactériostatiques, qui ne présente cependant pas les effets secondaires engendrés jusqu'à présent par les matériaux de l'art antérieur. Les Inventeurs se sont également donnés pour but de pourvoir à des matériaux procurant un meilleur confort d'utilisation, notamment en raison d'une diminution ou d'une suppression de la réponse inflammatoire.

A cette occasion, les Inventeurs ont mis en évidence que certains fucanes ou fractions de fucanes de masse molaire convenablement sélectionnée, précédemment connus pour leur activité anti-coagulante ou leurs propriétés d'inactivation du système du complément, possèdent également des propriétés bactériophobes et bactériostatiques qui peuvent être mises à profit pour conférer ces mêmes propriétés à un matériau, généralement biocompatible, qui en est imprégné.

Les fucanes sont des polysaccharides sulfatés, de masse molaire moyenne élevée (100 000 à 800 000 g/mol), extraits de la paroi cellulaire des thalles d'algues brunes et constitués d'une population hétérogène de molécules comprenant principalement des polymères de L-fucose sulfaté pouvant contenir également du D-xylose, du D-galactose et des acides uroniques.

Les fucanes possèdent des activités biologiques variées : il a ainsi été montré qu'ils possèdent des activités anti-coagulantes et antithrombotiques (Nishino T. *et al.*, Carbohydr. Res., 1992, **229**, 355-362 ; Springer G.F. *et al.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1957, **94**, 404-409 ; Church F.C. *et al.*, J. Biol. Chem., 1989,

264, 3618-3623 ; Bernardi G. and Springer G.F., J. Biol. Chem., 1962, **237**, 75-80 ; Mori H. *et al.*, "Marine algae in Pharmaceutical Science", Vol 2. HA Hoppe, T Leuring (Eds), Walter De Gruyter, Berlin- New-York, 1982) antivirales (Baba M. *et al.*, J. AIDS, 1990, **3**, 492-493), antiangiogéniques (Hahnenberger R. *et al.*, Glycoconjugate J., 1991, **8**, 350-353) et anticomplémentaires (C. Blondin *et al.*, 1994, Mol. Immunol., **31**, 247-253).

Par ailleurs, des études complémentaires ont montré que des fucanes de masse molaire comprise entre 5 000 et 100 000 g/mol ont la propriété d'inhiber l'activation du complément et peuvent de ce fait être utilisés comme agents anti-inflammatoires (C. Blondin *et al.*, Biomaterials, 1996, **17**, 597-603 ; B. Tissot *et al.*, BBA, 2003, **1651**, 5-16).

Des préparations de fucane de masse molaire moyenne inférieure à 20 000 g/mol, voire 10 000 g/mol, ce qui facilite par ailleurs leur utilisation dans un cadre thérapeutique, ont été obtenues, par exemple, par hydrolyse acide ménagée ou par dégradation radicalaire de fucanes de masse molaire élevée tel que décrit notamment dans les Brevets Européens EP 0 403 377 et EP 0 676 207.

Dans l'exposé qui va suivre, le terme « fucane » englobera aussi bien les fucanes de masse molaire élevée que les préparations de masse molaire plus faible (fractions) obtenues à partir de ceux-ci.

A ce jour, il n'avait jamais été envisagé ni démontré que des fucanes ayant une masse molaire comprise entre 8 000 et 30 000 g/mol inclusivement pourraient avoir des propriétés bactériophobes et bactériostatiques. Cette découverte est la base de la présente Invention. En outre, les Inventeurs ont maintenant mis en évidence que la présence de ces fucanes dans un matériau permet de diminuer l'adhésion des bactéries sur ce matériau ainsi que leur prolifération.

Ces nouvelles propriétés des fucanes de masse molaire telle que définie ci-dessus sont à la base de la présente Invention.

Dans un premier aspect, l'Invention a donc pour objet l'utilisation d'au moins un fucane extrait de phéophycées, ledit fucane ayant une masse molaire comprise entre environ 8 000 et 30 000 g/mol inclusivement, pour la préparation d'un matériau bactériophobe et bactériostatique.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente Invention, les fucanes ont une masse molaire comprise entre environ 10 000 et 20 000 g/mol inclusivement.

La masse molaire des fucanes utilisables conformément à l'Invention peut être déterminée par chromatographie d'exclusion stérique selon les techniques classiquement connues à cet effet par l'homme du métier.

De préférence, les fucanes utilisés selon l'Invention sont obtenus par la mise en œuvre d'un procédé de lyse ménagée de fucanes bruts tel que décrit dans le Brevet EP 0 403 377 ou bien encore par dégradation radicalaire selon le procédé décrit dans le brevet EP 0 676 207.

Avantageusement, on utilise un fucane contenant en outre de l'acide glucuronique. Dans ce cas, la quantité d'acide glucuronique, qui est déterminée par la méthode décrite par Filisetti-Cozzi et Carpita, (Anal. Biochem., 1991, **197(1)**, 157-162), est comprise entre 0,5 et 20 g pour 100 g de fucane.

La teneur en groupements sulfate présents dans les fucanes utilisés conformément à l'Invention est de préférence comprise entre 10 et 50 g environ pour 100 g de fucane ; la teneur en sulfate étant déterminée par analyse élémentaire du soufre et en appliquant la relation suivante : % de groupements sulfate = $3,22 \times S$ (%).

Les fucanes ayant une masse molaire comprise entre 10 000 et 20 000 g/mol, une teneur en groupements sulfate comprise entre 10 et 50 g pour 100 g de fucane et contenant de 0,5 à 20 g d'acide glucuronique pour 100 g de fucane sont particulièrement préférés car ils présentent une activité bactériophobe et bactériostatique particulièrement remarquable.

Dans un deuxième aspect, l'Invention a également pour objet un matériau bactériophobe et bactériostatique, caractérisé par le fait qu'il est imprégné par une solution, dans un milieu physiologiquement acceptable, d'au moins un fucane de masse molaire comprise entre environ 8 000 et 30 000 g/mol inclusivement, de préférence de masse molaire comprise entre 10 000 et 20 000 g/mol inclusivement.

Outre ses propriétés bactériophobes et bactériostatiques, le matériau imprégné de fucane conforme à l'Invention présente également, de façon avantageuse, une activité d'inhibition du système du complément du fait des propriétés déjà connues desdits fucanes.

Au sein de ladite solution, le ou les fucanes sont de préférence présents à une concentration comprise entre 15 et 150 mg/ml de solution.

Le milieu physiologiquement acceptable de la solution de fucanes est de préférence choisi parmi l'eau, le sérum physiologique et les milieux aqueux tamponnés et compatibles avec les cellules et les milieux biologiques.

La solution renfermant le ou les fucanes et imprégnant le matériau peut en outre comprendre un ou plusieurs composés additionnels, tels que par exemple du collagène (et en particulier un gel de collagène) ou des protéines adhésives comme la fibronectine, le vitronectine, la laminine, etc.... Dans ce cas, le rapport pondéral fucane/collagène au sein de ladite solution est de préférence compris entre 10 et 50 environ.

Selon une forme de réalisation préférée de l'Invention, ledit matériau est constitué d'un matériau solide à base de polymères pouvant par exemple être choisis parmi les polymères acryliques et méthacryliques tels que par exemple le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), les copolymères de méthacrylate d'alkylsiloxane et de méthacrylate de méthyle, le poly(hydroxyéthylméthacrylate) (HEMA) faiblement réticulé, les copolymères d'hydroéthylméthacrylate (HEMA) et de vinylpyrrolidone, les copolymères HEMA/acrylamide ou encore les copolymères HEMA/méthacrylate d'alkyle, lesdits copolymères se présentant de préférence sous la forme d'hydrogels.

Selon une forme de réalisation particulièrement préférée de l'Invention, le matériau est un dispositif ophtalmique, et notamment une lentille de contact. Du fait des propriétés mises en évidences par les Inventeurs pour les fucanes tels que définis précédemment et de leurs propriétés déjà connues, le port de telles lentilles de contact imprégnées de fucane procure un meilleur confort visuel.

A titre d'exemple, lorsque le matériau imprégné est une lentille de contact, celle-ci renferme alors environ entre 0,2 et 2 mg de fucane par lentille.

Par ailleurs, le matériau conforme à l'Invention, et en particulier lorsqu'il se présente sous la forme de lentilles de contact présente en outre l'avantage supplémentaire de constituer un système de libération progressive des fucanes dont il est imprégné. Ainsi, dans le cas particulier des lentilles de contact, les fucanes libérés

dans le liquide lacrymal confèrent à ce dernier des propriétés anti-inflammatoires et de modulation de la prolifération cellulaire.

Toutes les lentilles de contact commercialement disponibles peuvent ainsi être imprégnées par la solution de fucanes telle que définie précédemment.

5 Parmi les différents types de lentilles de contact, on peut citer en particulier, les lentilles constituées de PMMA, de copolymères de méthacrylate d'alkylsiloxane et de méthacrylate de méthyle, les lentilles de type hydrogel préparées à partir de PHEMA faiblement réticulé, les lentilles constituées de copolymère HEMA/vinylpyrrolidone, de copolymère HEMA/acrylamide ou encore de copolymère
10 HEMA/méthacrylate.

Le matériau imprégné de fucanes selon la présente Invention peut être préparé par la mise en œuvre d'une méthode d'imprégnation quelconque connue de l'art antérieur. L'homme du métier saura évidemment choisir la méthode qui sera la plus adaptée à la nature du matériau et/ou à son utilisation ultérieure. Parmi ces
15 méthodes, on peut en particulier citer la simple immersion d'un matériau nu dans une solution de fucanes telle que définie précédemment. Dans ce cas, le temps d'imprégnation peut par exemple varier entre 10 et 60 minutes environ. Bien évidemment, la durée d'imprégnation pourra varier en fonction de la nature du matériau utilisé, de la concentration de la solution de fucanes et de leur masse molaire
20 et enfin en fonction de la température à laquelle est réalisée l'imprégnation.

Le matériau ainsi imprégné peut ensuite subir un séchage à l'aide d'une méthode de séchage conventionnelle quelconque bien connue de l'homme du métier et appropriée au type de matériau employé telle que par exemple un séchage sous flux d'air en conditions stériles ou un séchage en étuve ou bien être stocké et/ou
25 utilisé directement.

Les matériaux ainsi préparés peuvent ensuite être stockés, dans des conditions appropriées qui n'altèrent pas significativement les propriétés du matériau, de préférence en conditions stériles. Par exemple, dans le cas des lentilles de contact, le séchage éventuel est effectué dans des conditions stériles et notamment sous une
30 hotte à flux laminaire puis les lentilles peuvent être stockées en condition hydratée dans une solution de fucanes, par exemple identique à celle ayant servi à leur préparation.

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples relatifs à la préparation de lentilles de contact imprégnées de fucanes et à l'étude de la désorption du fucane de cette lentille de contact, ainsi que la mise en évidence des propriétés bactériophobes et bactériostatiques desdites lentilles de contact.

EXEMPLE 1 : PREPARATION DE LENTILLES DE CONTACT IMPREGNEES DE FUCANE

Un fucane de masse molaire égale à 20 000 g/mol, présentant une teneur en sulfate de 27,3 g pour 100 g de fucane et contenant en outre 3,8 g d'acide glucuronique pour 100 g de fucane, a été solubilisé dans un tampon PBS à une concentration de 15 mg/ml puis filtré sur une membrane de filtration MF-Millipore de 33 mm de diamètre, de type GS 0,22 µm, vendue par la société Millipore. Le pH de la solution ainsi obtenue était de 7,2.

Des lentilles de contact souples de type acrylique d'un diamètre de 14,1 mm, disponibles dans le commerce sous la référence ACUVUE Brand auprès de la société Vistakon, Johnson & Johnson (Jacksonville, Floride, USA) ont été immergées pendant 20 minutes à température ambiante dans la solution de fucane préparée comme décrit ci-dessus. Les lentilles ont ensuite subi deux lavages avec une solution aqueuse de PBS vendue par la société Invitrogen – Life Technologies (Cergy Pontoise, France) et ayant la composition suivante (par litre d'eau distillée) :

- KCl : 0,2 g
- KH₂PO₄ : 0,2 g
- NaCl : 8 g
- Na₂HPO₄ : 1,15 g
- MgCl₂.6 H₂O : en quantité suffisante (q.s.)
- CaCl₂.2 H₂O : q.s.

Sauf indication contraire, cette solution aqueuse de PBS est celle qui a été utilisée dans tous les exemples illustrant cette demande.

Les lentilles ont ensuite été égouttées et séchées sous une hotte à flux laminaire à température ambiante pendant 16 heures. La quantité de fucane était de 0,2 mg/lentille environ.

Des lentilles identiques immergées dans les mêmes conditions dans une solution de fucane à une concentration de 150 mg/ml, contenaient, après imprégnation, de l'ordre de 2 mg de fucane/lentille.

EXEMPLE 2 : ETUDE DE LA LIBERATION DES FUCANES A PARTIR DE LENTILLES DE CONTACT PREALABLEMENT IMPREGNEES

Les lentilles de contact imprégnées de fucanes et telles que préparées comme indiqué ci-dessus à l'exemple 1 ont été transférées dans 1 ml d'une solution de larmes artificielles (« tear-like fluid ») constituée de plasma humain dilué à 5 % dans une solution aqueuse de tampon phosphate supplémentée de lysozyme (4,7 g) et de lactoferrine (1,7 g).

L'étude de la cinétique de libération des fucanes à partir des lentilles de contact a été réalisée sur une période de 15 jours, dans des plaques 24 puits, à l'aide du dosage au bleu de toluidine (BDT), méthode colorimétrique permettant le dosage et la quantification des fonctions sulfates d'un polysaccharide sulfaté et telle que décrite par Smith P.K. *et al.*, Anal. Biochem., 1980, **109**, 466-473.

Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau I ci-dessous :

TABLEAU I

Temps (en jours)	Quantité de fucane libérée (mg/ml)
J1	0,05
J3	0,11
J5	0,14
J7	0,18
J9	0,18
J10	0,2
J15	0,2

L'ensemble de ces résultats montre que la libération du fucane augmente avec le temps pour atteindre un plateau au bout du dixième jour (J10) ; la totalité du fucane étant alors libérée.

EXEMPLE 3 : MISE EN EVIDENCE DES PROPRIETES BACTERIOPHOBES DES LENTILLES DE CONTACT IMPREGNEES DE FUCANES

1) Préparation des cultures de bactéries radiomarquées

5 Des mini-cultures ont été préparées en incubant respectivement à 30°C et à 37°C pendant toute une nuit une colonie bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa* ou de *Staphylococcus aureus* dans 1 ml de milieu de Mueller-Hinton (MH) vendu par la société BIO-RAD et comprenant, par litre d'eau distillée : 2 g d'infusion de viande, 17,5 g d'hydrolysate de caséine et 1,5 g d'amidon, 17 g d'agar, 10 4 % de NaCl, 20-25 mg de Ca^{++} et 10-12,5 mg de Mg^{++} . La suspension bactérienne ainsi obtenue est ensuite centrifugée à 3500 rotations par minute (rpm) pendant 10 minutes. Une fois le surnageant éliminé, le culot est resuspendu dans 1 ml de milieu MH et la suspension bactérienne est homogénéisée au vortex.

100 µl de thymidine tritiée (1 mCi/ml) sont ajoutés à 1 ml de 15 bouillon MH contenant 10^7 UFC (unité formant colonie)/ml de bactéries. La suspension bactérienne est incubée 3 heures à 30°C ou 37°C de façon à permettre la croissance des deux souches bactériennes *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus* et à obtenir des cultures en phase exponentielle de prolifération. A la fin de la période d'incubation, la suspension bactérienne est 20 centrifugée à 3500 rpm pendant 10 minutes pour éliminer la radioactivité non fixée. Le culot est resuspendu dans la solution aqueuse de PBS telle que décrite à l'exemple 1 et contenant en outre 2 % d'albumine sérique de bovin (BSA) afin d'obtenir des concentrations bactériennes comprises entre 10^6 et 10^7 UFC/ml.

La mesure des concentrations bactériennes a été réalisée par 25 comptage des unités formant une colonie et comptage de la radioactivité incorporée.

2) Etude des propriétés bactériophobes des lentilles imprégnées de fucane

Les lentilles de contact imprégnées de fucane obtenues comme décrit à l'exemple 1 ont été transférées stérilement dans des plaques 24 puits, puis 30 incubées avec la solution de larmes artificielles telle que décrite ci-dessus à l'exemple 2 pendant 1 heure à température ambiante, sous agitation douce.

Après incubation, les lentilles ont été mises en contact avec 1 ml de chaque suspension bactérienne pendant 1 heure à 30°C ou 37°C (en fonction de la souche bactérienne) sous agitation douce. Après 5 lavages des lentilles avec la solution aqueuse de PBS, les lentilles sont transférées dans des fioles de comptage contenant 10 ml de liquide de scintillation. Après homogénéisation au vortex, la radioactivité incorporée par les bactéries adhérentes sur les lentilles est mesurée au compteur à scintillation β type Tri carb 2100 TR vendu par la société Packard Bioscience Company, Orsay, France).

Les valeurs des pourcentages d'adhésion obtenues au bout d'une heure de contact des bactéries avec la lentille imprégnée de fucane ont été comparées à celles obtenues avec une lentille de contact non imprégnée de fucane (contrôle).

Les résultats sont reportés dans le Tableau II ci-dessous :

TABLEAU II

	% adhésion/cm ²	% inhibition/contrôle
Contrôle	0,65 $\pm$ 0,05 ^a	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,65 $\pm$ 0,05 ^a	23 $\pm$ 4 ^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,65 $\pm$ 0,05 ^a	31 $\pm$ 4 ^a

^a : Chaque valeur indiquée représente la moyenne calculée sur 60 valeurs.

Ces résultats montrent que l'adhésion des bactéries *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* est significativement diminuée sur les lentilles imprégnées de fucane par rapport aux mêmes lentilles non imprégnées, avec une augmentation du pourcentage d'inhibition de l'adhésion bactérienne de 23 $\pm$ 4 % et de 31 $\pm$ 4 % respectivement par rapport au contrôle.

EXEMPLE 4 : MISE EN EVIDENCE DES PROPRIETES BACTERIOSTATIQUES DES LENTILLES DE CONTACT IMPREGNEES DE FUCANE

L'étude de la prolifération des bactéries *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* adhérentes sur des lentilles de contact imprégnées de fucane consiste à réaliser une première étape d'adhésion des bactéries radiomarquées à la thymidine tritiée sur des lentilles de contact préalablement incubées avec la solution de larmes artificielles comme décrit dans l'exemple 3. Les lentilles sont lavées 5 fois

avec une solution aqueuse de PBS puis transférées dans des tubes contenant le milieu de prolifération MH.

La deuxième étape consiste en une étude cinétique de la prolifération des bactéries adhérees à la surface des lentilles. Pour chaque mesure :

5 (a) la phase fluide contenant les bactéries détachées spontanément des lentilles (bactéries relarguées) au cours de la prolifération est récupérée après 3 lavages successifs avec la solution aqueuse de PBS puis centrifugée 3 minutes à 3500 rpm et resuspendue dans 1 ml de solution aqueuse de PBS. Le nombre de bactéries exprimé en UFC/ml est déterminé après dilution des échantillons prélevés et étalement
10 sur gélose. Pour ce faire, 50 µl de chaque échantillon dilué (facteurs de dilutions : 10^2 ; 10^3 ; 10^4 ; 10^6) ont été étalés sur de la gélose MH.

(b) les bactéries adhérees sur les lentilles ont été détachées à la trypsine (trypsine pure à 37°C sous agitation douce pendant 5 minutes) puis la phase fluide a été récupérée, centrifugée pendant 3 minutes à 3500 rpm et resuspendue dans
15 1 ml de solution aqueuse de PBS. Le nombre de bactéries exprimé en UFC/ml a été déterminé après dilution des échantillons prélevés et étalement sur gélose comme ci-dessus.

La prolifération des bactéries adhérees sur les lentilles correspond à la somme du nombre de bactéries relarguées et du nombre de bactéries adhérees.

20 Le contrôle (contrôle sans lentille) correspond à la prolifération en suspension, en absence de lentille, d'un nombre de bactéries égal au nombre de bactéries adhérees sur les lentilles après 1 heure d'incubation des lentilles avec les suspensions bactériennes.

Par ailleurs, l'efficacité du détachement des bactéries adhérees à la
25 surface des lentilles a été contrôlée en comparant le nombre de bactéries radiomarquées adhérees sur les lentilles, mesuré avant et après détachement. Il apparaît que 92 % des bactéries adhérees sont détachées et vivantes.

La prolifération des bactéries a été également étudiée sur des lentilles non imprégnées de fucane (lentilles contrôle).

30 Afin de comparer les taux de prolifération des bactéries sur les lentilles et la prolifération en suspension en absence de lentille, différents paramètres de prolifération ont été pris en considération :

- ♦ L'augmentation de la population bactérienne (ΔLog) après 5 heures de prolifération des bactéries, est exprimée sous la forme Log UFC/ml et calculée à partir de la formule (1) suivante :

$$\Delta\text{Log} = \text{Log}N_5 - \text{Log}N_0 \quad (1)$$

5 dans laquelle :

N_0 : concentration bactérienne introduite initialement ;

N_5 : concentration bactérienne obtenue après 5 heures de prolifération ;

- ♦ K est la constante de vitesse de prolifération, exprimée en nombre de générations par heure et calculée à partir de la relation (2) suivante :

$$K = (\text{Log}N_{n_1} - \text{Log}N_{n_2}) / 0,301 \times t \text{ (générations/heure)} \quad (2)$$

dans laquelle :

N_{n_1} est le nombre de bactéries au temps t_1 ;

N_{n_2} est le nombre de bactéries au temps t_2 ;

15 t : le temps nécessaire pour augmenter le nombre de bactéries de N_{n_1} à N_{n_2} ;

- ♦ g est le temps de doublement, exprimé en heures,

$$g = 1/K \text{ (heure/génération)} ;$$

- ♦ S représente la stimulation des taux de prolifération des bactéries par comparaison au contrôle (en absence de lentilles).

$$S = [K \text{ (lentilles)} / K \text{ (contrôle)}] \times 100$$

Les résultats sont reportés dans les Tableaux III et IV ci-après :

TABLEAU III

Prolifération de <i>Staphylococcus aureus</i>				
Paramètres de prolifération				
	ΔLog (Log UFC/lentille)	K (générations/h)	g (min)	S
Lentille contrôle	$1,23 \pm 0,06$	$1,05 \pm 0,06$	$57,1 \pm 3$	167 ± 9
Lentille fucane	$0,58 \pm 0,03$	$0,62 \pm 0,03$	$96,8 \pm 5$	$93,7 \pm 5$
Contrôle (sans lentille)	$0,55 \pm 0,02$	$0,64 \pm 0,03$	$93,7 \pm 6$	100 ± 0

TABLEAU IV

Prolifération de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Paramètres de prolifération				
	ΔLog (Log UFC/lentille)	K (générations/h)	g (min)	S
Lentille contrôle	$1,85 \pm 0,08$	$1,32 \pm 0,05$	$45,4 \pm 1,7$	245 ± 16
Lentille fucane	$0,45 \pm 0,02$	$0,55 \pm 0,03$	$109,1 \pm 6$	103 ± 4
Contrôle (sans lentille)	$0,42 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,02$	$107,1 \pm 7$	100 ± 0

Ces résultats montrent que la prolifération des bactéries adhérentes sur les lentilles imprégnées de fucane est plus faible que celle obtenue avec les lentilles contrôles et est du même ordre de grandeur que celle obtenue à partir des bactéries en suspension (contrôle sans lentille).

L'ensemble de ces résultats montre donc que l'imprégnation de matériau avec une solution renfermant des fucanes de masse molaire convenablement sélectionnée conformément à l'Invention permet de conférer à des matériaux tels que des dispositifs ophtalmiques, des propriétés bactériophobes et bactériostatiques et ainsi d'améliorer le confort d'utilisation des sujets porteurs de ces dispositifs.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un fucane extrait de phéophycées, ledit fucane ayant une masse molaire comprise entre 8 000 et 30 000 g/mol inclusivement,
5 pour la préparation d'un matériau bactériophobe et bactériostatique.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le ou les fucane(s) ont une masse molaire comprise entre 10 000 et 20 000 g/mol inclusivement.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que
10 le ou les fucane(s) contiennent en outre de l'acide glucuronique en une quantité comprise entre 0,5 et 20 g pour 100 g de fucane.
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le ou les fucane(s) ont une teneur en groupements sulfate comprise entre 10 et 50 g pour 100 g de fucane.
- 15 5. Matériau bactériophobe et bactériostatique, caractérisé par le fait qu'il est imprégné par une solution, dans un milieu physiologiquement acceptable, d'au moins un fucane de masse molaire comprise entre environ 8 000 et 30 000 g/mol inclusivement, de préférence comprise entre 10 000 et 20 000 g/mol.
6. Matériau selon la revendication 5, caractérisé par le fait que la
20 solution renfermant le ou les fucane(s) renferme en outre du collagène, dans un rapport pondéral fucane/collagène compris entre 10 et 50.
7. Matériau selon la revendication 5 ou 6, caractérisé par le fait qu'il est constitué d'un matériau solide à base de polymères choisis parmi les polymères acryliques et méthacryliques, les copolymères de méthacrylate
25 d'alkylsiloxane et de méthacrylate de méthyle, le poly(hydroxyéthylméthacrylate) faiblement réticulé, les copolymères d'hydroéthylméthacrylate (HEMA) et de vinylpyrrolidone, les copolymères HEMA/acrylamide ou encore les copolymères HEMA/méthacrylate d'alkyle.
8. Matériau selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisé en ce qu'il consiste en un dispositif ophtalmique.
- 30 9. Matériau selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il consiste en des lentilles de contact.

10. Lentilles de contact selon la revendication 9, caractérisées par le fait qu'elles renferment entre 0,2 et 2 mg de fucane par lentille.

11. Matériau selon l'une quelconque des revendications 5 à 10, caractérisé en ce qu'il constitue un système de libération progressive des fucanes dont
5 il est imprégné.

12. Matériau selon l'une quelconque des revendications 5 à 11, caractérisé en ce qu'il présente en outre une activité d'inhibition du système du complément.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2006/000097

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A01N65/00 A61L27/54 G02B1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/181416 A1 (COMPER WAYNE D) 25 September 2003 (2003-09-25) column 2, paragraph 15 column 6, paragraph 60 table 1	1-12
X	WO 01/82936 A (SAHLTECH I GOETEBORG AB; TARKOWSKI, ANDREJ; VERDRENGH, MARGARETA) 8 November 2001 (2001-11-08)	1,2
Y	claims 1,3	5,7-12
X	WO 03/057270 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS PHARMA GMBH; WINTERTON, LYNN, COOK; QIU, YONGXIN) 17 July 2003 (2003-07-17) le document entier	1-3,5-12
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 March 2006

Date of mailing of the international search report

03/04/2006

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Fort, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2006/000097

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 199649 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1996-493406 XP002347387 & JP 08 253419 A (HOYA CORP) 1 October 1996 (1996-10-01) abstract	5,7-12
A	----- GB 890 207 A (CIBA LIMITED) 28 February 1962 (1962-02-28) le document entier	1-12
A	----- EP 0 676 207 A (INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER ; INSTITU) 11 October 1995 (1995-10-11) cited in the application le document entier	1-12
A	----- EP 0 403 377 A (INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER) 19 December 1990 (1990-12-19) cited in the application le document entier -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2006/000097

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003181416 A1	25-09-2003	US 2004009953 A1	15-01-2004
WO 0182936 A	08-11-2001	NONE	
WO 03057270 A	17-07-2003	AU 2003235801 A1	24-07-2003
		EP 1465679 A1	13-10-2004
JP 8253419 A	01-10-1996	NONE	
GB 890207 A	28-02-1962	NONE	
EP 0676207 A	11-10-1995	NONE	
EP 0403377 A	19-12-1990	AT 131176 T	15-12-1995
		AT 196089 T	15-09-2000
		AU 5841090 A	08-01-1991
		CN 1051564 A	22-05-1991
		DD 296937 A5	19-12-1991
		DE 69023957 D1	18-01-1996
		DE 69023957 T2	04-07-1996
		DE 69033626 D1	12-10-2000
		DE 69033626 T2	23-05-2001
		ES 2152998 T3	16-02-2001
		FR 2648463 A1	21-12-1990
		WO 9015823 A1	27-12-1990
		IE 902153 A1	02-01-1991
		JP 3042543 B2	15-05-2000
		JP 4506089 T	22-10-1992
		PT 94359 A	08-02-1991
		US 5321133 A	14-06-1994

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2006/000097

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
A01N65/00 A61L27/54 G02B1/04

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 2003/181416 A1 (COMPER WAYNE D) 25 septembre 2003 (2003-09-25) colonne 2, alinéa 15 colonne 6, alinéa 60 tableau 1	1-12
X	WO 01/82936 A (SAHLTECH I GOETEBORG AB; TARKOWSKI, ANDREJ; VERDRENGH, MARGARETA) 8 novembre 2001 (2001-11-08)	1,2
Y	revendications 1,3	5,7-12
X	WO 03/057270 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS PHARMA GMBH; WINTERTON, LYNN, COOK; QIU, YONGXIN) 17 juillet 2003 (2003-07-17) le document entier	1-3,5-12
	----- --/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 mars 2006

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/04/2006

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fort, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2006/000097

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 199649 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1996-493406 XP002347387 & JP 08 253419 A (HOYA CORP) 1 octobre 1996 (1996-10-01) abrégé	5,7-12
A	----- GB 890 207 A (CIBA LIMITED) 28 février 1962 (1962-02-28) le document entier	1-12
A	----- EP 0 676 207 A (INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER ; INSTITU) 11 octobre 1995 (1995-10-11) cité dans la demande le document entier	1-12
A	----- EP 0 403 377 A (INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER) 19 décembre 1990 (1990-12-19) cité dans la demande le document entier -----	1-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2006/000097

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2003181416	A1	25-09-2003	US 2004009953 A1	15-01-2004
WO 0182936	A	08-11-2001	AUCUN	
WO 03057270	A	17-07-2003	AU 2003235801 A1	24-07-2003
			EP 1465679 A1	13-10-2004
JP 8253419	A	01-10-1996	AUCUN	
GB 890207	A	28-02-1962	AUCUN	
EP 0676207	A	11-10-1995	AUCUN	
EP 0403377	A	19-12-1990	AT 131176 T	15-12-1995
			AT 196089 T	15-09-2000
			AU 5841090 A	08-01-1991
			CN 1051564 A	22-05-1991
			DD 296937 A5	19-12-1991
			DE 69023957 D1	18-01-1996
			DE 69023957 T2	04-07-1996
			DE 69033626 D1	12-10-2000
			DE 69033626 T2	23-05-2001
			ES 2152998 T3	16-02-2001
			FR 2648463 A1	21-12-1990
			WO 9015823 A1	27-12-1990
			IE 902153 A1	02-01-1991
			JP 3042543 B2	15-05-2000
			JP 4506089 T	22-10-1992
			PT 94359 A	08-02-1991
			US 5321133 A	14-06-1994