

A2

**DEMANDE
DE CERTIFICAT D'ADDITION**

②

N° 80 04040

Se référant : au brevet d'invention n° 75 29368 du 25 septembre 1975.

⑤④ Nouveau complexe hydrophile, résistant aux nucléases, d'acide polyribonosinique-polyribocytidylique, son procédé de préparation et son application comme inducteur d'interféron.

⑤① Classification internationale (Int. Cl. 3). A 61 K 45/00.

②② Date de dépôt..... 25 février 1980.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée :

④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 35 du 28-8-1981.

⑦① Déposant : GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, résidant aux EUA.

⑦② Invention de : Hilton B. Levy.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Cabinet Lavoix,
2, place d'Estienne-d'Orves, 75441 Paris Cedex 09.

Certificat(s) d'addition antérieur(s) :

1.

On a décrit au brevet principal un complexe inducteur d'interféron comprenant un complexe hydrophile d'acide polyribonoinosinique-polyribocytidylique (dénommé ci-après In.Cn), de carboxyméthylcellulose et de poly-l-lysine ayant une masse moléculaire relativement faible d'environ 2000 à 5000.

On a maintenant découvert que l'utilisation de poly-l-lysine ayant une masse moléculaire de 13 000 à 28 000 environ permet d'obtenir le complexe décrit précédemment ayant une activité inductrice d'interféron.

Le but principal de l'invention est donc de fournir un complexe hydrophile d'In.Cn à poids moléculaire élevé, qui soit relativement résistant vis à vis des nucléases.

Un autre but de l'invention est de fournir une préparation injectable non-toxique et non-antigénique d'un complexe hydrophile d'In .Cn à poids moléculaire élevé, résistant aux nucléases, qui administrée en quantités efficaces à un hôte primate humain ou non-humain soit capable d'induire la synthèse de l'interféron chez cet hôte.

L'invention a encore pour but de fournir une préparation injectable telle que décrite dans le but précédent, qui administrée en quantités efficaces à un hôte primate humain ou non-humain soit capable d'induire la synthèse d'interféron à des niveaux antiviraux chez cet hôte.

Les buts décrits ci-dessus et d'autres sont atteints conformément à l'invention en fournissant un complexe hydrophile, résistant aux nucléases, d'In.Cn à poids moléculaire élevé avec une poly-l-lysine ayant une masse moléculaire de 13 000 à 28 000 daltons et de la carboxyméthylcellulose. L'In.Cn entrant dans le complexe selon l'invention a une masse moléculaire de l'ordre d'environ 7×10^5 à environ 1×10^7 daltons. A des poids moléculaires de la poly-l-lysine supérieurs à 28 000 on ne peut obtenir l'interféron.

On prépare des préparations injectables non-toxiques et non-antigéniques du complexe selon l'inven-

2.

tion en introduisant des solutions séparées de chacun des trois constituants du complexe dans un véhicule aqueux pharmaceutiquement acceptable, tel qu'une solution saline apyrogène, en mélangeant d'abord la solution de poly-l-lysine avec la solution de carboxyméthylcellulose, de préférence en versant lentement la première dans la seconde en agitant jusqu'à dissolution complète de tout précipité qui pourrait se former. Pour obtenir les meilleurs résultats possibles, on poursuit de préférence l'agitation pendant une durée suffisante pour réduire au minimum le trouble de la solution, ce qui demande généralement de 2 à 3 jours d'agitation. A la solution ainsi obtenue de complexe poly-l-lysine/carboxyméthylcellulose, on ajoute la solution d'In.Cn, en continuant à agiter de préférence pendant 2 à 3 jours pour obtenir la solution finale du complexe In.Cn/poly-l-lysine/carboxyméthylcellulose. La carboxyméthylcellulose qui est un matériau hydrophile chargé négativement aux pH neutres, constitue une partie essentielle du complexe, car sans elle l'In.Cn et la poly-l-lysine formeraient un précipité insoluble. En outre, l'ordre d'addition des constituants du complexe, indiqué ci-dessus, c'est-à-dire en premier lieu formation du complexe poly-l-lysine/carboxyméthylcellulose, puis addition à celui-ci de l'In.Cn afin d'obtenir le complexe final d'In.Cn/poly-l-lysine/carboxyméthylcellulose, est déterminant pour la préparation du complexe, car tout autre ordre d'addition conduirait à la formation d'un précipité insoluble.

Bien qu'il soit possible de faire varier considérablement les proportions d'In.Cn, de poly-l-lysine et de carboxyméthylcellulose pour préparer les complexes d'In.Cn hydrophiles, résistant aux nucléases, on réalise les préparations de complexe injectables selon l'invention de façon qu'elles contiennent de préférence de 1 à 4 mg/ml d'In.Cn, de 0,75 à 3 mg/ml de poly-l-lysine et de 0,25 à 1 % en poids de carboxyméthylcellulose. Une préparation injectable convenant particulièrement bien est une solution saline contenant 2 mg/ml d'In.Cn, 1,5 mg/ml de poly-l-lysine et 0,5 % en poids de carboxyméthylcellulose.

Les complexes d'In.Cn selon l'invention s'avè-

3.

rent être 4 à 10 fois plus résistants à l'hydrolyse par la ribonucléase pancréatique et le sérum humain que l'In.Cn original non complexé. Lorsqu'ils sont administrés par injection à des primates non-humains tels que des singes
5 ou des chimpanzés à des doses suffisantes pour fournir environ de 1 à 5 mg d'In.Cn par kg de poids corporel, et à des humains à des doses suffisantes pour fournir environ de 0,3 à 2 mg et de préférence moins de 1 mg d'In.Cn par kg de poids corporel, les complexes selon l'invention
10 sont non-toxiques et non-antigéniques et induisent la synthèse de l'interféron à des niveaux intéressants associés à des effets antiviraux. Par exemple, lorsqu'ils sont administrés par injection aux doses indiquées ci-dessus, les complexes d'In.Cn selon l'invention protègent effica-
15 cement les primates, y compris on le pense les humains, contre les maladies virales telles que le virus de la fièvre jaune, la rage, l'hépatite et les encéphalites virales ; et protègent les primates non-humains contre le virus de la fièvre hémorragique du singe. L'injection se
20 fait de préférence par voie intraveineuse ou intrarachidienne, le traitement étant administré de préférence tous les deux jours ou chaque jour, à une doses suffisante pour fournir environ 3 mg d'In.Cn par kg de poids corporel dans le cas de primates non-humains et environ 0,5 mg
25 d'In.Cn par kg de poids corporel dans le cas d'humains.

On s'attend à ce que les complexes d'In.Cn selon l'invention soient également efficaces, lorsqu'ils sont administrés par applications locales, pour traiter les primates humains et non-humains contre divers herpès
30 viraux tels que la kérato-conjonctivite herpétique (par exemple, 1 à 2 gouttes de la préparation décrite ci-dessus dans chaque oeil toutes les 6 heures), l'herpès des organes génitaux et les plaies froides ; et lorsqu'ils sont administrés par inhalation, contre différentes maladies
35 respiratoires à virus, telles que le rhume ordinaire et la grippe.

Les exemples suivants sont donnés à titre d'illustration de l'invention. Dans ces exemples, on prépare l'In.Cn à partir d'un mélange pratiquement équimo-

4.

laire d'acide polyriboinosinique et d'acide polyribocytidylique, vendus tous les deux par la firme P-L Biochemicals. Ces deux matériaux ont des dimensions hétérogènes, avec des poids moléculaires supérieurs à 10^5 . On les dissout à une concentration de 4 mg/ml dans NaCl à 0,85 %. On chauffe les solutions à 30°C et on verse l'acide polyribocytidylique dans l'acide polyriboinosinique en agitant constamment. On observe un déplacement hypochromique d'environ 35 %, indiquant la formation d'une structure appariée à double hélice.

EXEMPLE I

On prépare les solutions suivantes dans NaCl à 0,85 % apyrogène : (1) 500 ml d'In.Cn à 4 mg/ml ; (2) 250 ml de carboxyméthylcellulose à 2 % (7 HSP, haute viscosité) ; et (3) 250 ml de poly-l-lysine (poids moléculaire 22000) à 6 mg/ml. On verse lentement la solution de poly-l-lysine dans la solution de carboxyméthylcellulose, en agitant. On poursuit l'agitation pendant 2 jours pour redissoudre totalement le précipité formé. On verse la solution d'In.Cn dans la solution du complexe poly-l-lysine/carboxyméthylcellulose et on agite pendant 2 autres jours pour obtenir une préparation de complexe In.Cn/poly-l-lysine/carboxyméthylcellulose. Cette préparation contient 2 mg/ml d'In.Cn, 1,5 mg/ml de poly-l-lysine et 0,5 % en poids de carboxyméthylcellulose. La mesure du taux d'accroissement de la densité optique à 260 m μ . permet de conclure que le complexe d'In.Cn ainsi préparé est de 4 à 10 fois plus résistant à l'hydrolyse par la ribonucléase pancréatique et par le sérum humain que l'In.Cn original non-complexé.

EXEMPLE II

A 4 chimpanzés et 25 singes Rhésus, on injecte par voie intraveineuse la préparation obtenue dans l'exemple I, en doses suffisantes pour fournir 3 mg/kg d'In.Cn. On mesure les niveaux d'interféron dans le sérum avant le traitement et 8, 24 et 48 heures après le traitement. Les résultats sont analogues à ceux obtenus au brevet principal.

On trouve des taux comparables d'interféron dans le liquide cébrospinal lorsqu'on injecte la prépa-

5.

ration par voie intrarachidienne chez des chimpanzés et des singes Rhésus. A ces taux, on ne constate aucune toxicité supplémentaire lorsqu'on administre la préparation par voie intraveineuse ou par voie intrarachidienne.

5 EXEMPLE III

A 4 singes Rhésus, on injecte par voie intraveineuse la préparation obtenue dans l'exemple I, en dose suffisante pour fournir 3 mg/kg d'In.Cn, huit heures avant d'inoculer une dose létale DL_{100} du virus de la fièvre hémorragique du singe, et on répète l'injection de la dose de préparation d'In.Cn plusieurs fois pendant les deux semaines suivantes. Des centaines de singes Rhésus non-traités, ayant reçu la même dose de virus, sont morts dans les sept à huit jours. Parmi les quatre singes traités, trois n'ont pas été atteints par le virus, le quatrième est devenu malade deux semaines plus tard et la maladie a disparu par un autre traitement supplémentaire. Cette expérience démontre que la préparation selon l'invention est capable d'induire la synthèse de l'interféron chez les primates à des niveaux suffisants pour lutter contre les virus attaquant les organes.

De mêmes essais, répétés en utilisant le virus de la fièvre jaune, la rage, l'hépatite, et les encéphalites virales au lieu du virus de la fièvre hémorragique du singe, donnent des résultats comparables.

Un processus analogue est suivi pour traiter des humains contre le virus de la fièvre jaune, la rage, l'hépatite et les encéphalites virales, mais la dose de préparation de l'exemple I est réduite à une quantité suffisante d'environ 0,5 mg/kg d'In.Cn.

6.

REVENDEICATIONS

1.- Complexe hydrophile, résistant aux nucléases, d'acide polyriboinosinique-polyribocytidylique ayant une masse moléculaire relativement élevée, de poly-l-lysine ayant une masse moléculaire de 13000 à 28000 environ et de carboxyméthylcellulose.

2.- Complexe selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit acide polyriboinosinique-polyribocytidylique a un poids moléculaire compris environ entre $10^7 \times 10^5$ et 10^7 daltons.

3.- Préparation injectable dans un véhicule aqueux pharmaceutiquement acceptable ayant notamment une activité d'induction de la synthèse d'interféron, caractérisée en ce qu'elle contient à titre de principe actif un complexe hydrophile, résistant aux nucléases, d'acide polyriboinosinique-polyribocytidylique ayant une masse moléculaire relativement élevée, de poly-l-lysine ayant une masse moléculaire de 13000 à 28000 environ et de carboxyméthylcellulose selon la revendication 1 ou 2.

4.- Préparation selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle contient de 1 à 4 mg/ml dudit acide polyriboinosinique-polyribocytidylique, 0,75 à 3 mg/ml de ladite poly-l-lysine et 0,25 à 1% en poids de ladite carboxyméthylcellulose et notamment 2 mg/ml dudit acide polyriboinosinique-polyribocytidylique, 1,5 mg/ml de ladite poly-l-lysine et 0,5 % en poids de ladite carboxyméthylcellulose.

5.- Préparation selon la revendication 3, caractérisée en ce que ledit véhicule est une solution saline.

6.- Procédé de préparation d'un complexe hydrophile, résistant aux nucléases, d'acide polyriboinosinique-polyribocytidylique ayant une masse moléculaire relativement élevée, de poly-l-lysine ayant une masse moléculaire de 13000 à 28000 environ et de carboxyméthylcellulose, caractérisé en ce qu'on mélange d'abord une solution aqueuse de poly-l-lysine ayant une masse moléculaire de 13000 à 28000 environ avec une solution aqueuse de carboxyméthylcellulose en agitant de façon à former un

7.

complexe intermédiaire poly-l-lysine/carboxyméthylcellulose, puis on ajoute à la solution aqueuse dudit complexe intermédiaire ainsi formée une solution aqueuse d'acide polyriboinosinique-polyribocytidylique ayant une masse moléculaire de 13 000 à 28 000 environ en agitant de façon à former le complexe final d'acide polyriboinosinique-polyribocytidylique/poly-l-lysine/carboxyméthylcellulose.

7.- Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit complexe intermédiaire est formé en versant lentement ladite solution aqueuse de poly-l-lysine dans la-dite solution aqueuse de carboxyméthylcellulose en agitant, et en poursuivant l'agitation suffisamment longtemps pour réduire au minimum le trouble de la solution aqueuse en résultant.

8.- Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'agitation de la-dite solution aqueuse de poly-l-lysine avec la-dite solution aqueuse de carboxyméthylcellulose est effectuée pendant une période d'environ 2 à 3 jours.

9.- Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'agitation de la-dite solution aqueuse du complexe intermédiaire avec la-dite solution aqueuse d'acide polyriboinosinique-polyribocytidylique est effectuée pendant une période d'environ 2 à 3 jours.

10.- Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les concentrations du-dit acide polyriboinosinique-polyribocytidylique, de la-dite poly-l-lysine et de la-dite carboxyméthylcellulose dans les solutions aqueuses respectives de départ, et les proportions relatives des-dites solutions aqueuses de départ sont choisies de façon à fournir dans la solution aqueuse résultante du-dit complexe final de 1 à 4 mg/ml du-dit acide polyriboinosinique-polyribocytidylique, 0,75 à 3 mg/ml de la-dite poly-l-lysine et 0,25 à 1 % en poids de la-dite carboxyméthylcellulose.

11.- Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que les-dites solutions aqueuses de départ sont toutes des solutions salines.

12 - Procédé selon la revendication 11, caracté-
risé en ce que les concentrations du-dit acide polyriboino-
sinique-polyribocytidylique, de la-dite poly-l-lysine et de
la-dite carboxyméthylcellulose dans les solutions salines
5 respectives de départ, et les proportions relatives des-di-
tes solutions salines de départ sont choisies de façon à
fournir dans la solution saline résultante du-dit complexe
final 2 mg/ml du-dit acide polyriboinosinique-polyribocytidy-
lique, 1,5 mg/ml de la-dite poly-l-lysine et 0,5% en poids
10 de la-dite carboxyméthylcellulose.

13 - Composition thérapeutique pour l'induction
de la synthèse d'interféron chez un hôte primate, caracté-
risée en ce qu'elle contient à titre de principe actif un
complexe hydrophile, résistant aux nucléases, d'acide poly-
15 riboinosinique-polyribocytidylique ayant une masse molécu-
laire relativement élevée, de poly-l-lysine ayant une mas-
se moléculaire de 13 000 à 28 000 environ et de carboxymé-
thylcellulose.

14 - Composition thérapeutique selon la revendication
20 13, caractérisée en ce que le-dit hôte est un primate non-
humain et la composition est formulée pour permettre l'admi-
nistration tous les deux jours ou quotidiennement d'une
dose suffisante du complexe pour fournir environ de 1 à
5 mg du-dit acide polyriboinosinique-polyribocytidylique
25 par kg de poids corporel et notamment pour fournir environ
3 mg dudit acide polyriboinosinique-polyribocytidylique
par kg de poids corporel.

15 - Composition thérapeutique selon la revendi-
cation 13, caractérisée en ce que ledit hôte est un humain
30 et la composition est formulée pour permettre l'administra-
tion tous les deux jours ou quotidiennement d'une dose suffi-
sante du complexe pour fournir environ 0,3 à 2 mg dudit acide
polyriboinosinique-polyribocytidylique par kg de poids corpo-
rel et notamment pour fournir environ moins de 1 mg dudit
35 acide polyriboinosinique-polyribocytidylique par kg de poids
corporel.