

(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  
25 octobre 2007 (25.10.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2007/119006 A1**

(51) Classification internationale des brevets :  
A61K 31/716 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)  
A61K 31/737 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)  
A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,  
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,  
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU,  
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2007/000630

(22) Date de dépôt international : 13 avril 2007 (13.04.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0603370 14 avril 2006 (14.04.2006) FR

(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), eurasiatique (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, MT, 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).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : LABO-  
RATOIRE DE LA MER [FR/FR]; Rue du Général Patton,  
F-35400 Saint-Malo (FR).

**Déclaration en vertu de la règle 4.17 :**

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : YVIN,  
Jean-Claude [FR/FR]; 3 rue Gabriel Desgré, F-35400  
Saint Malo (FR). CHERMANN, Jean-Claude [FR/FR];  
Le Messuguet, 22 rue Cardalino, F-13260 Cassis (FR).

**Publiée :**

— avec rapport de recherche internationale  
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues

(74) Mandataires : TOUATI, Catherine etc.; Cabinet Plasser-  
aud, 52, rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).

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.

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,

(54) Title: NEW MEDICINES FOR TREATMENTS AGAINST RETROVIRUSES

(54) Titre : NOUVEAUX MÉDICAMENTS POUR LES TRAITEMENTS CONTRE LES RETROVIRUS

(57) Abstract: This invention relates to the use of a sulphated or phosphated polysaccharide for the preparation of a medicine for treatments against retroviruses, more particularly against lentiviruses and oncoviruses, and particularly against HIV, including strains of these retroviruses that are resistant to known anti-retroviral agents; this medicine acts on the replication cycle of said retroviruses by inhibition of their RT.

(57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation d'un polysaccharide sulfaté ou phosphaté pour la préparation d'un médicament pour les traitements contre les rétrovirus, plus particulièrement contre les lentivirus ainsi que les oncovirus, et notamment contre les VIH, y compris des souches de ces rétrovirus qui sont résistantes aux agents anti-rétroviraux déjà connus; ce médicament agissant sur le cycle de réplication desdits rétrovirus par inhibition de la RT de ces derniers.

WO 2007/119006 A1

## POLYSACCHARIDES SULFATES OU PHOSPHATES POUR LES TRAITEMENTS CONTRE LES RETROVIRUS

5 L'invention a pour objet de nouveaux médicaments pour les traitements contre les rétrovirus, en agissant sur leur cycle de réplication par inhibition de la RT.

Les rétrovirus appartiennent à une famille de virus dont le génome est constitué d'ARN. La particularité des rétrovirus est de se répliquer  
10 dans une cellule hôte en passant par des étapes ADN, ce qui est rendu possible par la Reverse Transcriptase, ou Transcriptase Inverse, désignée par RT dans ce qui suit, et qui est une enzyme permettant la transcription de l'ARN viral en molécule d'ADN complémentaire appelée provirus.

Le provirus est capable de se circulariser et de s'intégrer dans le  
15 génome de la cellule hôte.

Les rétrovirus ainsi intégrés dans le génome de la cellule hôte peuvent soit utiliser la machinerie cellulaire pour se multiplier, soit demeurer à l'état latent dans la cellule hôte. A l'état de latence, leurs gènes sont transmis aux cellules descendantes à chaque mitose et sont  
20 temporairement silencieux ; l'organisme porteur du rétrovirus ne présente alors aucun signe pathologique.

La famille des rétrovirus comporte trois sous-familles : les oncovirus, les lentivirus et les spumavirus.

Les oncovirus sont responsables de cancers et, notamment, de  
25 certaines leucémies. Parmi les oncovirus provoquant des cancers, on peut citer le virus du sarcome de Roux ou VSR. Parmi ceux qui sont à l'origine de leucémies chez l'homme, on trouve notamment le virus HTLV de type I et de type II (HTLV signifiant « Human T cell Leukaemia Virus ») ; chez les félins, la leucémie est provoquée par le virus FTLV.

30 Les lentivirus sont quant à eux responsables d'infections virales à évolution lente telles que le syndrome d'immunodéficience acquise ou

SIDA. Chez l'homme, les lentivirus responsables du SIDA font partie des HIV ou « Human Immunodeficiency Virus » (de type I, HIV-I ou de type II, HIV-II), ou en français VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) ; chez le singe, il s'agit des SIV ("Simian Immunodeficiency Virus") et chez le chat des FIV (Feline Immunodeficiency Virus).

Les spumavirus sont mal connus, tant au niveau de leur structure que du mode exact de leur intégration dans le génome cellulaire. Dans l'état actuel des connaissances, aucune maladie ne semble être associée aux spumavirus. Toutefois, leur responsabilité dans le déclenchement de certaines maladies auto-immunes semble probable.

Sur le plan physiopathologique, les oncovirus transforment les cellules T qu'ils infectent et entraînent une prolifération non contrôlée de ces cellules ; les lentivirus détruisent les cellules qu'ils infectent.

Concernant plus particulièrement les VIH, ils s'attaquent aux lymphocytes T4 auxiliaires qui expriment à leur surface la molécule CD4 (s'agissant d'une molécule glycoprotéique membranaire), qui est un récepteur permettant aux VIH de pénétrer à l'intérieur de ces cellules.

Les VIH pénètrent dans un lymphocyte T4 par un système d'endocytose impliquant la reconnaissance mutuelle et la fixation de la molécule CD4 exprimée à la surface du lymphocyte T à une glycoprotéine de surface du rétrovirus dénommée gp120. L'expression d'un corécepteur membranaire présent sur les lymphocytes T4 est également nécessaire à la pénétration du virus.

Comme indiqué précédemment, le rétrovirus, ici un VIH, se réplique à l'intérieur de la cellule hôte, ici le lymphocyte T4, sous l'action de la RT qui intervient de la manière indiquée ci-après.

Dans un premier temps, le noyau ou core du virus, une fois qu'il a pénétré à l'intérieur de la cellule hôte, libère deux copies d'ARN simple brin.

Ces deux copies d'ARN simple brin sont associées à la RT ainsi qu'à d'autres protéines telles que la protéase et l'intégrase.

Celle-ci synthétise un brin d'ADN complémentaire de l'ARN viral. Ensuite, une activité RNase associée à la RT dégrade le brin d'ARN, tandis qu'un deuxième brin d'ADN est synthétisé. L'ADN bicaténaire ainsi obtenu est ensuite circularisé puis intégré, grâce à une enzyme intégrase,  
5 dans le génome cellulaire pour donner un provirus.

Ce provirus contient 3 gènes de structure, à savoir les gènes gag (groupe antigène), pol (polymérase) et env (enveloppe) ; les gènes gag codent pour les protéines virales p24, les gènes pol pour la RT et ses activités associées qui sont les activités polymérase, RNase, intégrase et  
10 protéase, et les gènes env pour les glycoprotéines de l'enveloppe telles que la gp120.

Lors de la phase de réplication virale, le provirus est transcrit en ARN messenger en utilisant la machinerie du noyau de la cellule hôte, ce qui permet la production des protéines constitutives du rétrovirus d'une  
15 part et la réplication du matériel génomique viral d'autre part. L'ensemble constitue un nouveau virus produit par bourgeonnement de la membrane de la cellule hôte.

Par ailleurs, des phénomènes de fusion se produisent entre les cellules infectées, qui présentent à leur surface notamment la protéine  
20 gp120, et les lymphocytes T4 non infectés, qui comportent à leur surface la molécule CD4.

En effet, en raison de la grande affinité de la protéine gp 120 pour les récepteurs CD4, une cellule infectée peut fixer des Lymphocytes T4 non infectés sains et former ce qu'on appelle un syncytium, c'est-à-dire un  
25 agglomérat de lymphocytes infectés et non infectés, qui est incapable de survivre.

Une seule cellule infectée peut ainsi provoquer la mort de nombreux lymphocytes T4 sains. Il s'ensuit une diminution progressive de l'immunité cellulaire qui se traduit par le développement d'infections  
30 opportunistes, pouvant être accompagnées de certains types de tumeurs.

Outre les lymphocytes T4, d'autres cellules comportent également la molécule CD4 à leur surface, et sont donc sensibles aux virus VIH ; il s'agit notamment des monocytes macrophages, de certaines cellules qui se trouvent dans les ganglions, la peau et d'autres organes, et de  
5 quelques lymphocytes B.

Par ailleurs, les virus VIH peuvent également s'attaquer à certaines cellules du système nerveux central SNC : ils provoquent dans ce cas des syndromes neurologiques.

D'autres molécules, localisées à la surface de la cellule et qui  
10 fonctionnent normalement comme récepteurs pour des chimiokines ont également été identifiées comme étant des co-récepteurs qui permettent l'entrée des virus VIH dans la cellule hôte.

Les rétrovirus responsables du SIDA, c'est-à-dire les lentivirus et notamment les VIH sont caractérisés par une extrême variabilité  
15 génétique et antigénique.

On admet généralement que chez l'homme il existe deux types de virus responsables du SIDA, et désignés respectivement par HIV-I (ou VIH-I) et HIV-II (ou VIH-II).

Des analyses génétiques ont montré qu'il existe trois groupes  
20 distincts de virus du type VIH-I ; ces trois groupes sont respectivement désignés par M (Majeur), O (Outlier) et N (New).

La grande majorité des souches VIH-I appartient au groupe M (Majeur), qui comporte au moins dix sous-types ou clades (A, B, C, D,...) ; on rencontre ces clades dans des zones géographiques diverses.

25 Au contraire, les souches VIH-I des groupes O et N n'ont jusqu'à présent été isolées que dans des populations africaines.

La grande variabilité génétique de ces souches de virus VIH est principalement due au taux d'erreurs élevé de la RT. En effet, au cours des cycles de réplication successifs, des variants génétiques  
30 apparaissent.

Les mutations se produisent en particulier sur le gène env et plus précisément sur la partie codante pour la gp120.

Cette variabilité génétique se traduit par l'apparition de souches qui deviennent résistantes aux agents anti-rétroviraux connus.

5 Les traitements actuellement utilisés pour combattre les rétrovirus, notamment les lentivirus et tout particulièrement les VIH, visent à inhiber la RT et par conséquent bloquer leur cycle de réplication.

Il est à remarquer que dans le cas des oncovirus associés à certains types de cancers, la RT est toujours essentielle à leur réplication.  
10 Et lorsque cette enzyme virale est inhibée, l'oncovirus ne peut plus se répliquer dans la cellule hôte.

Les traitements anti-rétroviraux actuels mettent en œuvre trois groupes thérapeutiques majeurs : les inhibiteurs de la transcriptase inverse (RT), les inhibiteurs des protéases, et les inhibiteurs de fusion et  
15 d'entrée.

Parmi les inhibiteurs de la transcriptase inverse (RT), trois sous groupes de molécules sont actuellement utilisés en clinique. Il s'agit d'une part des inhibiteurs nucléosidiques de la RT, d'autre part, des inhibiteurs non-nucléosidiques de la RT et enfin des analogues nucléotidiques.

20 Parmi les inhibiteurs nucléosidiques de la RT, on peut citer l'AZT (ou 3'-azidothymidine), la didanosine et la stavudine (d4T, Zérit qui sont des analogues de la thymidine) ainsi que la ddC et le 3TC (qui sont des analogues de la cytidine). Ces inhibiteurs nucléosidiques entrent en compétition avec les nucléosides naturels et empêchent l'élongation de la  
25 chaîne d'ADN ; ils ont été les premiers à être utilisés comme inhibiteurs de la RT, seuls d'abord puis en association avec d'autres inhibiteurs de la RT ou d'enzymes virales telles que la protéase et l'intégrase. Cependant leurs effets indésirables sont connus et nombreux. En particulier, les mutations de la transcriptase inverse confèrent une résistance aux INRT qui peut  
30 être croisée entre plusieurs INRT. Ces composés sont tous neutres ou réducteurs, à l'exception de l'AZT qui est un oxydant ;

Les inhibiteurs non-nucléosidiques de la RT agissent comme antagonistes non compétitifs en se liant à une région hydrophobe adjacente au site catalytique de la RT, inhibant ainsi cette dernière ; parmi eux, on peut citer le ritonavir, le saquinavir, l'éfavirenz, le rescriptor, le  
5 sustiva et la viramune.

Le deuxième groupe thérapeutique est constitué par les inhibiteurs des protéases (IP). Ce sont des agents anti-rétroviraux puissants qui inhibent l'activité protéolytique de la protéase virale ; à titre d'exemple, on peut citer l'amprenavir, le tipranavir, l'indinavir, le saquinavir, le lopinavir, le  
10 posanprenavir, le ritonavir, l'atazanavir et le nelfinavir.

Enfin le troisième groupe thérapeutique correspond aux inhibiteurs de fusion et d'entrée, dont plusieurs molécules sont à l'étude. Seul l'enfuvirtide est actuellement sur le marché. Il agit au premier stade de la réplication du virus en empêchant la fusion entre le virus/cellule par  
15 inhibition compétitive.

L'apparition et la transmission, en particulier dans les pays industrialisés, de souches du VIH résistantes aux agents anti-rétroviraux connus a placé le monde médical devant un grave problème de santé  
publique.

20 Les échecs rencontrés dans le traitement des patients atteints du SIDA sont en effet principalement dus à des phénomènes de résistance virale, bien que d'autres facteurs tels que la toxicité des agents utilisés ainsi que certains effets secondaires influent également sur l'efficacité des traitements, même si c'est dans une moindre mesure.

25 C'est pour faire face à cette situation que de nombreuses recherches ont été et sont menées pour découvrir de nouveaux agents anti-rétroviraux capables d'inhiber la RT, en particulier parmi les polysaccharides.

La demande de brevet européen 0 240 098 préconise l'utilisation  
30 comme agents anti-rétroviraux de polysaccharides synthétiques ou naturels sulfatés par l'intermédiaire de groupes connecteurs. EP 0240 098

décrit en particulier des sulfates de chondroïtine, dermatane, keratane, acide hyaluronique, carrageenane, fucoidane, heparin et dextran.

La demande de brevet EP 0 464 759 décrit également des polysaccharides sulfatés par l'intermédiaire d'un groupement spécifique,  
5 destinés à la prophylaxie à long terme de maladies causées par des virus.

Ces deux demandes de brevets, EP 0 240 098 et EP 0 464 759, présentent l'inconvénient majeur de proposer des oligosaccharides complexes à synthétiser du fait de la présence d'un groupe intermédiaire nécessaire à la sulfatation.

10 La demande de brevet japonais publiée 01-103 601 décrit l'activité antivirale, notamment à l'égard du VIH, du sulfate de lentinan, de certains  $\beta$ -1,3 glucans comme le curdlan, le pachymane, et ceux des parois cellulaires de la levure ainsi que ceux de la cellulose.

Dans un article paru en novembre 1987 dans Jpn. J. Cancer  
15 Res/Gann n° 78, pp. 1164-1168, Hideki Nakajima et al décrivent l'effet d'inhibition sur l'infectivité et la réplication du VIH de certains polysaccharides sulfatés tels que les sulfates de dextran, de xylofuranan et de ribofuranan ainsi que l'inhibition par ces produits de la RT du VIH.

La demande de brevet japonais publiée 03-145 425 décrit l'activité  
20 antivirale, à l'égard du VIH, de certains laminarioligosaccharides sulfatés et notamment du laminaripentaose sulfaté.

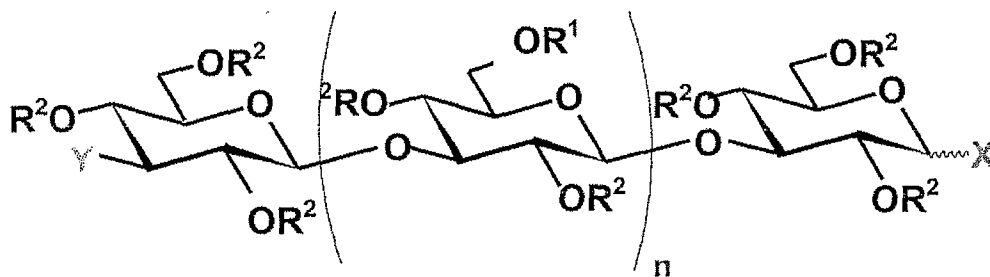
Les travaux décrits dans ces documents n'ont toutefois conduit à aucune application pratique, en particulier du fait que les oligosaccharides décrits, même s'ils possèdent une activité antirétrovirale potentielle,  
25 présentent une forte activité anticoagulante, comme par exemple les sulfates de dextran et d'héparine, ce qui les rend inutilisables *in vivo* dans le cadre d'une thérapie.

Le problème auquel se propose de répondre la présente invention est donc la mise à disposition du corps médical de nouveaux  
30 médicaments antirétroviraux à indice thérapeutique élevé, particulièrement actifs contre les lentivirus et les oncovirus, notamment contre les VIH,

ainsi que contre des souches résistantes à certains agents anti-rétroviraux déjà connus, et présentant une faible activité anticoagulante *in vivo*.

De manière surprenante et inattendue, ce problème a été résolu par la société Demanderesse, qui a pu déterminer que des polysaccharides sulfatés ou phosphatés de formule (I), telle que décrite ci après, possédaient une forte activité antirétrovirale, en particulier contre les lentivirus et les oncovirus, notamment contre le VIH, et contre les souches de ces rétrovirus résistantes aux agents antirétroviraux inhibiteurs de la RT déjà connus, et ne possédaient pas d'activité anticoagulante incompatible avec une administration *in vivo*.

La présente invention a donc pour objet, l'utilisation, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des maladies rétrovirales, d'un polysaccharide de formule (I)



15

(I)

dans laquelle

- R<sup>1</sup> représente soit un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate, soit un glucose sulfaté ou phosphaté lié, de préférence, par une liaison de type β(1→6) à la structure saccharidique,
- R<sup>2</sup> représente un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate, R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> ne pouvant pas représenter simultanément un atome d'hydrogène,

20

- X et Y représentent, chacun indépendamment, un groupement OH, un glucose, un glucose sulfaté ou phosphaté, un mannitol, ou un mannitol sulfaté ou phosphaté,
- n représente un nombre entier de 11 à 30, préférentiellement de 20 à 30, plus préférentiellement de 25 à 30,

ledit polysaccharide ayant un degré de sulfatation supérieur à 2, préférentiellement de 2,2 à 2,4, ou un degré de phosphatation supérieur à 1, préférentiellement de 1,5 à 2,5.

Selon un autre mode de réalisation, le polysaccharide utilisé est un polysaccharide de formule (I) dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  peuvent être soit identiques et représentent alors un groupement sulfate ou phosphate, soit différents l'un de l'autre,  $R_1$  représentant alors une unité glucose sulfatée ou phosphatée liée, de préférence, par une liaison  $\beta$  de type  $\beta$ -1,6 à la structure saccharidique, X et/ou Y représentant un groupement mannitol et n un nombre entier de 11 à 30, plus particulièrement de 25 à 30.

Conformément à l'invention, le médicament fabriqué par utilisation d'un polysaccharide de formule (I) agit sur le cycle de réplication des rétrovirus par inhibition de la RT de ces derniers.

Au sens de la présente invention, on entend par « degré de sulfatation », le nombre moyen, par unité saccharidique, de groupements OH sulfatés. Un degré de sulfatation supérieur à 2 signifie que, en moyenne, sur l'ensemble du polysaccharide, plus de 2 groupements OH par unité saccharidique sont sulfatés.

Au sens de la présente invention, on entend par « degré de phosphatation », le nombre moyen, par unité saccharidique, de groupements OH phosphatés. Un degré de phosphatation supérieur à 1 signifie que, en moyenne, sur l'ensemble du polysaccharide, plus de 1 groupement OH par unité saccharidique est phosphaté.

Au sens de l'invention, on entend par « groupement sulfate », un groupement du type  $(-\text{SO}_3\text{H})$ .

Au sens de l'invention, on entend par « groupement phosphate », un groupement du type (-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>).

Un autre objet de l'invention est l'utilisation de l'un des polysaccharides défini précédemment pour la mise en œuvre d'une  
5 méthode de traitement des maladies rétrovirales.

Au sens de l'invention, les maladies rétrovirales sont choisies de préférence parmi celles causées par les lentivirus et les oncovirus, plus particulièrement par les VIH, et par les souches de ces retrovirus résistantes aux agents anti-rétroviraux inhibiteurs de la RT déjà connus.  
10 Dans le cas des lentivirus et en particulier des VIH de type I et II, le médicament obtenu par utilisation conformément à l'invention d'un polysaccharide de formule (I) permet de traiter le syndrome de l'immunodéficience acquise chez l'homme. Ainsi, dans un mode de réalisation particulier, une maladie rétrovirale au sens de l'invention est le  
15 syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA chez l'homme.

Les polysaccharides de formule (I) tels qu'utilisés selon l'invention sont également particulièrement actifs contre les oncovirus, en particulier contre les virus HTLV de type I et II. Ainsi, dans un mode de réalisation particulier, l'utilisation conformément à l'invention d'un polysaccharide de  
20 formule (I) permet de traiter les cancers associés à ces rétrovirus.

Dans un mode réalisation particulier de l'invention, le polysaccharide de formule (I) est une laminarine sulfatée ayant un degré de polymérisation de 11 à 28.

Préférentiellement, le polysaccharide de formule (I) est une  
25 laminarine de degré de sulfatation égal à environ 2,3, appelée « laminarine PS3 ».

Par « degré de polymérisation » on entend, au sens de l'invention, le nombre d'unités monosaccharidiques liées entre elles par des liaisons de type  $\beta(1\rightarrow3)$  composant la chaîne linéaire principale. Un degré de  
30 polymérisation de 11 à 28 signifie un polysaccharide composé de 11 à 28 unités saccharidiques, notamment glucose, liées entre elles par des

liaisons de type  $\beta(1\rightarrow3)$ . Ce degré de polymérisation ne tient pas compte des unités glucoses liées en  $\beta(1\rightarrow6)$  à la chaîne principale du polysaccharide. Ainsi, le degré de polymérisation est égal à  $n+2$  lorsque X et Y représentent simultanément OH, à  $n+3$  si seulement l'un de X ou Y  
5 représente OH, et à  $n+4$  si X ni Y ne représente OH.

De manière étonnante et surprenante, la Demanderesse a pu démontrer que la laminarine sulfatée, ayant un degré de sulfatation supérieur à 2, de préférence de 2,2 à 2,4, et un degré de polymérisation de 11 à 28, était particulièrement efficace pour le traitement des maladies  
10 rétrovirales, de préférence choisies parmi celles causées par les lentivirus et les oncovirus, plus particulièrement par les VIH, et par les souches de ces rétrovirus résistantes aux agents anti-rétroviraux inhibiteurs de la RT déjà connus, en particulier l'AZT. Cette laminarine sulfatée présentait en outre une faible activité anticoagulante, confirmant ainsi son grand intérêt  
15 pour la fabrication d'un médicament destiné à une administration humaine ou animale.

Selon un autre mode de réalisation, l'invention vise l'utilisation d'un polysaccharide, obtenu à partir de la laminarine sulfatée de degré de sulfatation supérieur à 2 et de préférence de 2,2 à 2,4, de degré de  
20 polymérisation de 11 à 28, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies rétrovirales, de préférence choisies parmi celles causées par les lentivirus et les oncovirus, plus particulièrement par les VIH, et par les souches de ces rétrovirus résistantes aux agents anti-rétroviraux inhibiteurs de la RT déjà connus.

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, le polysaccharide de formule (I) est une laminarine phosphatée ayant un degré de polymérisation de 11 à 28. Le phosphate de laminarine selon  
25 l'invention, possède un degré de phosphatation supérieur à 1 et de préférence de 1,5 à 2,5 et est particulièrement adapté au traitement des  
30 maladies rétrovirales, de préférence choisies parmi celles causées par les lentivirus et les oncovirus, plus particulièrement par les VIH, et par les

souches de ces retrovirus résistantes aux agents anti-rétroviraux inhibiteurs de la RT déjà connus.

Selon un autre mode de réalisation, l'invention vise l'utilisation d'un polysaccharide obtenu à partir du phosphate de laminarine de degré de phosphatation supérieur à 1 et de préférence de 1,5 à 2,5, de degré de polymérisation de 11 à 28, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies rétrovirales, de préférence choisies parmi celles causées par les lentivirus et les oncovirus, plus particulièrement par les VIH, et par les souches de ces retrovirus résistantes aux agents anti-rétroviraux inhibiteurs de la RT déjà connus.

Un mode de réalisation particulier de l'invention concerne l'utilisation d'une laminarine sulfatée, caractérisée en ce qu'elle possède une degré de sulfatation supérieur à 2, de préférence de 2,2 à 2,4, et un degré de polymérisation de 11 à 28, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des maladies rétrovirales.

Un autre mode de réalisation particulier de l'invention concerne l'utilisation d'une laminarine sulfatée, caractérisée en ce qu'elle possède une degré de sulfatation supérieur à 2, de préférence de 2,2 à 2,4, et un degré de polymérisation de 11 à 28, pour la mise en œuvre d'une méthode de traitement des maladies rétrovirales.

Un autre mode de réalisation particulier de l'invention concerne l'utilisation d'une laminarine phosphatée, caractérisée en ce qu'elle possède une degré de phosphatation supérieur à 1, de préférence de 1,5 à 2,5, et un degré de polymérisation de 11 à 28, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des maladies rétrovirales.

Encore un mode de réalisation particulier de l'invention concerne l'utilisation d'une laminarine phosphatée, caractérisée en ce qu'elle possède une degré de phosphatation supérieur à 1, de préférence de 1,5 à 2,5, et un degré de polymérisation de 11 à 28, pour la mise en œuvre d'une méthode de traitement des maladies rétrovirales.

Il est connu d'administrer aux patients atteints notamment du SIDA, dans le cadre des traitements désignés par le terme de "multithérapies" non seulement deux, voire trois agents antirétroviraux, mais également d'autres agents pharmacologiques destinés à lutter contre les pathogénies associées. La prise de ces nombreux médicaments représente une servitude considérable pour les patients. Pour remédier à cet inconvénient et selon un autre mode de réalisation avantageux, l'invention a également pour objet un produit de combinaison comprenant une quantité efficace

- d'un polysaccharide de formule (I) dans laquelle  $R^1$  représente soit un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate, soit un glucose sulfaté ou phosphaté lié, de préférence, par une liaison de type  $\beta(1\rightarrow6)$  à la structure saccharidique,  $R^2$  représente un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate, X et Y représentent, chacun indépendamment, un groupement OH, un glucose, un glucose sulfaté ou phosphaté, un mannitol, ou un mannitol sulfaté ou phosphaté, n représente un nombre entier de 11 à 30, préférentiellement de 20 à 30, plus préférentiellement de 25 à 30, ledit polysaccharide ayant un degré de sulfatation supérieur à 2, préférentiellement de 2,2 à 2,4, ou un degré de phosphatation supérieur à 1, préférentiellement de 1,5 à 2,5,

- d'au moins un agent antirétroviral choisi dans le groupe comprenant :

- les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INRT), dont notamment l'AZT, le ddI, le ddC, le d4T, le 3TC et le ABC,
- les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNRT), dont notamment le Viramune et le Sustiva,
- les inhibiteurs de la protéase, dont notamment l'Agénérase et le Kaletra,

- les inhibiteurs de la fusion, dont notamment l'enfuvirtide (Fuzeon),
- les inhibiteurs d'entrée, dont notamment l'AMD-3100 et, éventuellement

5           - d'au moins un agent pharmacologique choisi dans le groupe comprenant les agents anti-nauséeux, les agents anti-diarrhéiques, les agents anti-hyperbilirubinémie, les agents anti-douleurs, les agents pour traitements dermatologiques, les agents anti-néphrotoxiques, pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps.

10           En effet, l'homme du métier est à même de définir l'administration la mieux adaptée permettant d'obtenir le meilleur indice thérapeutique pour le patient. Chaque substance active de la multithérapie peut être administrée de manière séquentielle, voie par des routes différentes, ou alors en même temps.

15           Par « quantité efficace », au sens de l'invention, on entend une quantité de substance active suffisante pour obtenir un effet thérapeutique sur un patient.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une quantité efficace

20           - d'un polysaccharide de formule (I) tel que décrit précédemment,  
- d'au moins un agent antirétroviral choisi dans le groupe comprenant :

- les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INRT), dont notamment l'AZT, le ddl, le ddC, le d4T, le 3TC et le ABC,
  - les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNRT), dont notamment le Viramune et le Sustiva,
  - les inhibiteurs de la protéase, dont notamment l'Agénérase et le Kaletra,
- 25  
30

- les inhibiteurs de la fusion, dont notamment l'enfuvirtide (Fuzeon),
- les inhibiteurs d'entrée, dont notamment l'AMD-3100 et, éventuellement

5           - d'au moins un agent pharmacologique choisi dans le groupe comprenant les agents anti-nauséeux, les agents anti-diarrhéiques, les agents anti-hyperbilirubinémie, les agents anti-douleurs, les agents pour traitements dermatologiques, les agents anti-néphrotoxiques, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des maladies

10          rétrovirales, de préférence causées par les lentivirus et les oncovirus, plus préférentiellement par le VIH, notamment par les souches de ces rétrovirus résistantes aux agents anti-rétroviraux déjà connus.

15          Un autre objet de la présente invention est l'utilisation d'une quantité efficace

- d'un polysaccharide de formule (I) tel que décrit précédemment,
- d'au moins un agent antirétroviral choisi dans le groupe comprenant :

- 20          • les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INRT), dont notamment l'AZT, le ddl, le ddC, le d4T, le 3TC et le ABC,
- les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNRT), dont notamment le Viramune et le Sustiva,
- 25          • les inhibiteurs de la protéase, dont notamment l'Agénérase et le Kaletra,
- les inhibiteurs de la fusion, dont notamment l'enfuvirtide (Fuzeon),
- 30          • les inhibiteurs d'entrée, dont notamment l'AMD-3100 et, éventuellement

- d'au moins un agent pharmacologique choisi dans le groupe comprenant les agents anti-nauséeux, les agents anti-diarrhéiques, les agents anti-hyperbilirubinémie, les agents anti-douleurs, les agents pour traitements dermatologiques, les agents anti-néphrotoxiques,

5 pour la mise en œuvre d'une méthode de traitement des maladies rétrovirales, de préférence causées par les lentivirus et les oncovirus, plus préférentiellement par le VIH, notamment par les souches de ces rétrovirus résistantes aux agents anti-rétroviraux déjà connus.

10 La présente invention a aussi pour objet une méthode de traitement d'une maladie rétrovirale, de préférence causée par les lentivirus et les oncovirus, plus préférentiellement par le VIH, notamment par les souches de ces rétrovirus résistantes aux agents anti-rétroviraux déjà connus, comprenant l'administration, chez un patient atteint par ladite maladie

15 rétrovirale, d'une quantité efficace d'un médicament comprenant à titre d'agent actif au moins un polysaccharide de formule (I) tel que décrit précédemment ; ou d'un produit de combinaison tel que décrit précédemment .

Au sens de la présente invention, par « patient » on entend tout

20 animal à sang chaud, particulièrement les mammifères et notamment les êtres humains.

La présente invention a également pour objet une méthode de traitement telle que définie précédemment, dans laquelle le polysaccharide de formule (I) est une laminarine sulfatée, caractérisée en

25 ce qu'elle possède un degré de sulfatation supérieur à 2, de préférence de 2,2 à 2,4, et un degré de polymérisation de 11 à 28.

La présente invention a également pour objet une méthode de traitement telle que définie précédemment, dans laquelle le polysaccharide de formule (I) est une laminarine phosphatée, caractérisée

30 en ce qu'elle possède un degré de phosphatation supérieur à 1, de préférence de 1,5 à 2,5, et un degré de polymérisation de 11 à 28.

Pour préparer un polysaccharide de formule (I) sulfaté au sens de l'invention, on effectue une étape de sulfatation en suivant de préférence le protocole décrit par Alban S, Kraus J, et Franz G dans « Synthesis of laminarin sulfates with anticoagulant activity », *Arzneim.Forsch./drug Res* 5 (1992) 42 ; 1005-1008. Ce procédé a été perfectionné dans la thèse de Susanne Alban, soutenue en 1993 à l'Université de Regensburg et portant le titre « Synthese und physiologische Testung neuartiger Heparinoide ». Ces procédés sont adaptables à la sulfatation des polysaccharides de formule (I) de l'invention et permettent d'obtenir un polysaccharide sulfaté 10 hautement substitué, sans dégradation, et avec une bonne reproductibilité, d'une manière simple et peu onéreuse.

Pour aboutir à une sulfatation efficace du polysaccharide sans dégradation des chaînes polysaccharidiques, la réaction de sulfatation est avantageusement effectuée sous des conditions correspondant à une 15 absence absolue d'eau. Avant la sulfatation, le polysaccharide est donc de préférence séché, par exemple sur pentoxide de phosphore ( $P_2O_5$ ) et ensuite dissout dans du diméthylformamide ou DMF. De par ses effets alternatifs sur le polysaccharide, le DMF a une influence activante par la substitution. En effet, l'association du DMF polaire avec les groupes OH 20 conduit à la coupure des liaisons hydrogène intra et inter moléculaires et à la désintégration des structures supérieures.

Pour mettre en œuvre la réaction de sulfatation, on peut avoir recours avantageusement au complexe  $SO_3$ -pyridine.

Par suite de la coordination de l'accepteur d'électrons  $SO_3$  avec le 25 donneur d'électrons pyridine, la réactivité difficilement contrôlable du  $SO_3$  qui se traduit par des réactions fortement exothermiques entraînant des dégradations, se trouve réduite. Le complexe  $SO_3$ -pyridine présente par rapport à d'autres complexes l'avantage d'être ni trop réactif ni trop stable c'est-à-dire trop lent du point de vue réaction.

30 En raison du fait que le degré de sulfatation obtenu est proportionnel à l'excès molaire en réactif de sulfatation et étant donné que

l'on cherche à obtenir un degré de substitution supérieur à 2, on met avantageusement en œuvre une concentration de 6 moles de SO<sub>3</sub>-pyridine par mole de glucose.

Avantageusement, pour garantir l'absence d'eau, on peut travailler  
5 sous atmosphère d'argon.

De préférence, on ajoute dès le début de la réaction de la pyridine au réactif de sulfatation et ce, en quantité équimolaire, en vue de capter directement l'acide sulfurique qui pourrait se former par réaction du complexe SO<sub>3</sub>-pyridine avec l'eau. La concentration du polysaccharide  
10 que celle du réactif de sulfatation doivent être de préférence aussi élevées que possible, la solubilité du polysaccharide et du réactif de sulfatation limitant le degré de sulfatation final. Pour éviter au début de la réaction un refroidissement du mélange qui pourrait entraîner des problèmes de solubilité et pour obtenir une substitution la plus régulière possible, la  
15 solution du complexe SO<sub>3</sub>-pyridine dans le DMF pourrait ne pas être ajoutée en une seule fois mais de manière continue pendant une durée de 4 heures.

La réaction de sulfatation peut être effectuée à une température de 20 à 60°C, de préférence d'environ 40°C. Des températures plus élevées  
20 entraînent une substitution plus efficace mais, également, une dégradation des chaînes.

Après l'addition du réactif de sulfatation, le mélange est de préférence agité pendant plusieurs heures autour de 60°C. A cette température, il se produit une substitution supplémentaire sans  
25 dégradation des chaînes.

Le surnageant du mélange est alors avantageusement séparé par décantation. Le résidu est dissous, de préférence dans du NaOH, puis mélangé avec 10 fois son volume d'éthanol. Le précipité qui se produit à une température de 4-8°C pendant la nuit est isolé puis préférentiellement  
30 dissous dans de la soude diluée (solution de pH d'environ 9). La solution est dialysée pour enlever les sels et les molécules de bas poids

moléculaire puis avantageusement amenée à un pH de 7,0 par addition de NaOH et ensuite lyophilisée. Le polysaccharide sulfaté résultant se présente sous forme de sel de sodium.

Le degré de sulfatation est préférentiellement déterminé par voie de titration conductimétrique de l'acide libre du polysaccharide sulfaté, ou par  
5 alternativement par chromatographie ionique après hydrolyse en utilisant un système du type HPLC. La première méthode présente l'avantage d'être également propre à des recherches relatives à la stabilité (la consommation de soude s'accroît lorsque des groupes sulfates sont  
10 éliminés) alors que la méthode HPLC nécessite moins de substance et peut être automatisée. A titre de contrôle, il est possible de déterminer la teneur en soufre par analyse élémentaire.

Il est de plus possible de contrôler l'homogénéité de la sulfatation et la répartition des groupes sulfate sur les différentes positions  
15 dans la molécule de glucose par une forme modifiée de l'analyse de méthylation suivie d'un examen GC-MS (à savoir Chromatographie Gaz, Spectrométrie de Masse).

Le degré de sulfatation obtenu en procédant comme indiqué ci-dessus est supérieur à 2, plus précisément de 2 à 2,5 et tout  
20 particulièrement de 2,2 à 2,4.

Suivant un mode de réalisation avantageux, le polysaccharide de formule (I), et, de préférence, la laminarine sulfatée, sont utilisés pour la  
25 préparation d'un médicament pour les traitements contre les rétrovirus destiné à une administration par voie générale et de préférence par les voies orale, rectale, pulmonaire topique (incluant les voies transdermique, buccale et sublinguale) et parentérale (incluant les voies sous-cutanées intramusculaire, intraveineuse, intra-dermique et intra-vitréale).

La dose quotidienne est généralement de 0,01 à 250 mg par kilo de  
30 poids du patient et préférentiellement de 0,10 à 100 mg, plus

préférentiellement encore de 0,5 à 30 mg, et tout particulièrement de 1,0 à 20 mg.

Ces doses quotidiennes s'appliquent notamment dans le cas du sulfate de laminarine ; pour les autres sels et esters selon la formule (I),  
5 les doses quotidiennes sont adaptées à chaque cas.

La dose quotidienne peut être administrée par dose unitaire en une, deux, trois, quatre, cinq ou six fois ou plus à différents moments de la journée.

Les doses unitaires peuvent comporter de 10 à 1000 mg, de 50 à  
10 400 mg, et, préférentiellement, de 50 à 100 mg de substance active.

Les médicaments obtenus, conformément à l'invention, en utilisant au moins un des polysaccharides de formule (I), comportent les ingrédients de formulation classiques et éventuellement un ou plusieurs autres agents thérapeutiques.

15 De plus, comme mentionné précédemment, le polysaccharide de l'invention peut être avantageusement combiné avec d'autres substances actives. Leur mode d'administration peut être simultané ou séquentiel. Elles peuvent également être administrées par différentes voies telles que décrites précédemment.

20

La présente invention sera mieux comprise à la lecture des exemples non limitatifs suivants.

### **Exemple 1 : Préparation d'un sulfate de laminarine PS3**

25 On a extrait la laminarine d'une matière première constituée par des algues brunes puis on a procédé à la sulfatation de la laminarine ainsi extraite, en suivant le protocole décrit dans le brevet FR 92 08387.

Une fois la laminarine extraite, on a effectuée une sulfatation en suivant le protocole décrit par Alban S, Kraus J, et Franz G dans  
30 Synthesis of laminarin sulfates with anticoagulant activity, *Arzneim.Forsch./drug Res* (1992) 42 ; 1005-1008, perfectionné par la

these de Susanne Alban, soutenue en 1993 à l'Université de Regensburg et portant le titre « Synthese und physiologische Testung neuartiger Heparinoide ».

On a d'abord séché la laminarine sur du pentoxide de phosphore (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) puis on l'a dissoute dans du diméthylformamide ou DMF.

Ensuite, pour mettre en œuvre la réaction de sulfatation, on a eu recours au complexe SO<sub>3</sub>-pyridine sous atmosphère d'argon : on a ajouté en une seule fois mais de manière continue pendant une durée de 4 heures de la SO<sub>3</sub>-pyridine dans le DMF en quantité équimolaire. On a réalisé la réaction de sulfatation à une température de 40°C. Après l'addition du réactif de sulfatation, on a continué à agiter le mélange pendant 6 heures à 60°C.

On a ensuite séparé le surnageant du mélange par décantation, dissous le résidu dans 2,5 M de NaOH, puis on l'a mélangé avec 10 fois son volume d'éthanol à 99%. On a alors placé la solution obtenue à une température de 4-8°C pendant la nuit et on a obtenu un précipité que l'on a isolé puis dissous dans de la soude diluée (solution de pH d'environ 9). Ensuite on a dialysé la solution à l'aide d'une membrane Spectrapor à seuil de coupure 1000 D puis amené le pH à 7,0 par addition de NaOH. Enfin, on a lyophilisé la solution ainsi dialysée. On a obtenu un sulfate de laminarine se présentant sous forme de sel de sodium.

On a ensuite déterminé le degré de sulfatation par voie de titration conductimétrique de l'acide libre du polysaccharide sulfaté en utilisant de la soude 0,1N. Le degré de sulfatation de la laminarine obtenu était de 2,3. Le degré de polymérisation du sulfate de laminarine ainsi obtenu était de 23 à 28.

On a nommé ce polysaccharide sulfaté « laminarine PS3 », ou encore « PS3 ».

**Exemple 2 : Activité anti-rétrovirale de la laminarine sulfatée PS3**

On a déterminé l'action de la laminarine sulfatée PS3 sur le cycle de réplication des rétrovirus par inhibition de la RT, cette inhibition de la RT ayant été appréciée

5 - soit par l'observation, en fonction de la quantité de polysaccharides sulfatés mis en œuvre et du moment de cette mise en œuvre qui peut avoir lieu avant, pendant ou après l'infection ou encore en permanence, de la diminution du nombre de syncytia, apparaissant dans une culture de cellules MT<sub>4</sub> suite à l'infection par un rétrovirus VIH, (exemple 2A)

10 - soit par appréciation en fonction de la quantité de polysaccharides sulfatés mis en œuvre et du moment de cette mise en œuvre qui peut avoir lieu avant, pendant ou après l'infection ou encore en permanence tout au long de l'infection, de l'inhibition de la RT qui se traduit par une diminution mesurable de l'activité de cette dernière, et qui  
15 reflète le ralentissement de la réplication du virus infectant dans une culture de cellules CEM infectées par un rétrovirus VIH, (exemple 2B) étant entendu qu'à titre de comparaison on a effectué les mêmes expériences en utilisant comme produits de comparaison d'une part le sulfate de dextran et d'autre part la 3'-azidothymidine ou AZT.

20 Les susdites cellules MT<sub>4</sub> et CEM sont des lignées lymphoblastiques humaines transformées par HTLV-1.

Les rétrovirus que l'on a mis en œuvre sont constitués par  
- les souches de laboratoire BRU (clade B) et NDK (clade D),  
- le virus RTMC (clade B) connu comme étant résistant à l'agent  
25 antiviral AZT,  
- les isolats primaires RW92009 (clade A) et UG92029 (clade A), et  
- un isolat (PIC CH, clade B) issu d'un patient résistant à plusieurs agents antiviraux connus comme le d4T et le Zérit.

Les souches RTMC, RW92009 et UG92029 ont été obtenues  
30 auprès du « AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID-NIH (USA) ».

On a cultivé les cellules MT<sub>4</sub> et CEM en milieu RPMI (provenance Cambrex) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal (provenance Cambrex), 1% de Penicilline-Streptomycine (provenance Life Technologies), 2 mM de glutamine (provenance Invitrogen), 2 µg/ml de polybrène (provenance Sigma).

On a utilisé de la laminarine sulfatée PS3 sous forme lyophilisée obtenue par le procédé tel que décrit dans l'exemple 1, que l'on a dissous dans du PBS à la concentration de 12 mg/ml pour fournir une solution mère.

D'autre part, on a dissous le sulfate de dextran (provenance Sigma, D4911) dans du PBS à la concentration de 41,6 mg/ml (solution mère).

On a également dilué dans du PBS, aux concentrations indiquées plus loin, de l'AZT (provenance Sigma A2169), largement connu comme étant un inhibiteur de la RT.

**Exemple 2A : Mesure du nombre de syncytia**

On a évalué l'action de la laminarine PS3 et des produits de comparaison sur le nombre de syncytia dans une culture de cellules MT<sub>4</sub> infectée par l'un des rétrovirus indiqués ci-dessus, en procédant comme suit.

On a tout d'abord préincubé les cellules MT<sub>4</sub> ( $3 \cdot 10^5$  cellules dans 50 µl) pendant 1 heure à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>, avec les dilutions successives de laminarine sulfatée PS3 (50 µl) et des produits de comparaison, en microplaque de 96 puits à fond en « V ». Chaque concentration de laminarine sulfatée PS3 et de produit de comparaison est testée en double.

On a réalisé ensuite l'infection des cellules en ajoutant dans chaque puits, sauf ceux correspondant aux témoins cellules, 50 µl de dilution virale préalablement titrée.

Après une nouvelle heure d'incubation, on a centrifugé la plaque et on a éliminé les surnageants contenant le virus résiduel.

On a réalisé deux rinçages, puis on a transféré les culots cellulaires en plaque de 24 puits ou l'on a cultivé les cellules à la  
5 concentration de  $3.10^5$  cellules/ml en présence de laminarine PS3 ou du produit de comparaison.

Après 3 jours de culture, on a dilué les cellules au demi et on a observé les syncytia au microscope inversé du jour 3 au jour 7 après remise en suspension.

10 Comme déjà précisé précédemment, on a réalisé quatre séries d'expériences visant à préciser l'effet de la laminarine sulfatée PS3 en fonction du moment auquel il est mis en œuvre dans la culture de cellules, c'est-à-dire

- avant l'infection
- 15 - pendant l'infection
- après l'infection et
- tout au long de l'infection.

Dans le premier cas, on a amené la laminarine sulfatée PS3 et les produits de comparaison en contact avec les cellules pendant une  
20 heure, puis on a lavé les cellules deux fois pour éliminer les produits mis en œuvre et enfin on a procédé à l'infection de la culture des cellules MT<sub>4</sub>.

Dans le deuxième cas, on a mis en contact la laminarine sulfatée PS3 et les produits de comparaison au moment auquel on procède à l'infection des cellules. On a maintenu la culture ainsi traitée en  
25 l'état pendant une heure, puis on a procédé à deux lavages, ce qui a conduit à l'élimination de la laminarine sulfatée PS3 et des produits de comparaison ainsi que des virus qui n'ont pas pénétré dans les cellules.

Dans le troisième cas, on a préincubé la culture de cellules MT<sub>4</sub> pendant une heure à 37°C, puis on a procédé à l'infection des cellules, et  
30 on a soumis l'ensemble à une incubation d'une heure à 37°C puis à une centrifugation avec élimination du surnageant contenant les virus n'ayant

pas pénétré dans les cellules. On a ensuite rincé le culot cellulaire deux fois puis on l'a transféré sur plaque de 24 puits, puis cultivé à la concentration de  $3.10^5$  cellules/ml simultanément à l'introduction dans les mêmes puits de la laminarine sulfatée PS3 et des produits de  
5 comparaison aux concentrations choisies.

Dans le quatrième cas, on a commencé par mettre en contact la laminarine sulfatée PS3 et les produits de comparaison avec les cellules pendant une heure à  $37^{\circ}\text{C}$ , puis on a procédé à l'infection de la culture pendant une heure à  $37^{\circ}\text{C}$ . Ensuite on a procédé à deux lavages, ce qui  
10 conduit à l'élimination des virus qui n'ont pas pénétré dans les cellules. On a alors transféré les culots cellulaires dans des plaques de 24 puits, à raison de  $3.10^5$  cellules/ml par puits en présence de la laminarine sulfatée PS3 et des produits de comparaison aux concentrations choisies.

On a effectué les lavages et rinçages avec du milieu de culture  
15 RPMI sans sérum de veau foetal.

Dans le cas de chacun des quatre types d'expériences qui viennent d'être décrites et comme déjà indiqué précédemment, on a dilué les cellules au demi après trois jours de culture puis on a observé les syncytia au microscope inversé du jour J3 au jour J7.

20 Le résultat de ces observations est illustré par les figures 1 à 3, étant entendu que

- la figure 1 montre une culture de cellules  $C_1$  non infectée : les cellules  $C_1$  restent distinctes les unes des autres ; il n'y a pas de syncytia ;
- la figure 2 montre une culture de cellules infectées dans  
25 laquelle certaines cellules  $C_1$  s'agglutinent en syncytia repérés par S, et
- la figure 3 montre sous un agrandissement plus important une culture de cellules  $C_1$  infectées, certaines des cellules  $C_1$  étant agglutinées en syncytia repérés par S.

Dans les expériences décrites plus en détail ci-après, l'absence  
30 de syncytia est notée par un signe – et les signes (+), +, ++, ++T indiquent une quantité croissante de syncytia dans chaque puits.

L'indication T traduit la mort des cellules.

Dans une première série d'expériences, on a utilisé l'AZT comme produit de comparaison à la concentration de 0,01  $\mu\text{m}$ , et on a mis en œuvre la laminarine sulfatée PS3 à deux concentrations, respectivement de 5 et de 10  $\mu\text{g/ml}$ .

On a utilisé le virus BRU (clade B) pour l'infection des cellules  $\text{MT}_4$  à la dilution virale de  $10^5$  qui correspond à la quantité de particules virales permettant d'infecter 80% des cultures  $\text{MT}_4$  (Tissue Culture Infections Dose 80%  $\text{TCID}_{80\%}$ ).

Les résultats observés du jour J3 au jour J4 dans les quatre types d'expériences définis précédemment sont réunis dans le tableau A.

**TABLEAU A**

Agent Antirétroviral			Quantité de syncytia dans la culture (puits) aux jours J3 à J7				
Mise en œuvre	Nature	Concentration	J3	J4	J5	J6	J7
En continu, avant, pendant et après infection	PS3	10 µg/ml	-	-	-	-	+
			-	-	-	-	-
		5 µg/ml	-	-	-	(+)	+
			-	-	(+)	(+)	++
	AZT	0,01 µM	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-
Avant infection	PS3	10 µg/ml	-	(+)/+	++	++T	++T
			-	-	+ / ++	++	++T
		5 µg/ml	-	+	+ / ++	++T	++T
			-	(+)/+	++	++T	++T
	AZT	0,01 µM	-	(+)	++	++T	++T
			-	(+)	+	++	++T
Pendant infection	PS3	10 µg/ml	-	(+)	+	++	++T
			-	(+)	+	++	++T
		5 µg/ml	(+)	+	++	++	++T
			(+)	+	++	++	++T
	AZT	0,01 µM	-	(+)	+	++	++T
			-	(+)/-	+	++	++T
Après infection	PS3	10 µg/ml	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-
		5 µg/ml	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-
	AZT	0,01 µM	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	(+)/+
Absence d'agent antirétroviral			-	(+)	+	++	++T
			-	(+)	+ / ++	++	++T
Absence de virus Absence d'agent antirétroviral			-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-

Les résultats réunis dans le Tableau A permettent de faire les constatations exposées ci-après.

Après 6 jours à compter de l'infection par la souche virale BRU, les cultures de cellules MT<sub>4</sub> ne forment pas de syncytia lorsqu'elles sont  
5 traitées en continu, dès leur mise en culture (avant, pendant et après l'infection), avec des concentrations de 10 µg/ml de PS3.

Les cultures de cellules MT<sub>4</sub> ne forment pas de syncytia lorsqu'elles sont traitées avec des concentrations de 10 et 5 µg/ml de PS3 après l'infection par la souche virale BRU. L'effet est observé dès le 3<sup>ème</sup>  
10 jour à compter de l'infection virale.

Il est important de noter qu'aucun effet d'inhibition n'est observé lorsque les cellules MT<sub>4</sub> sont traitées avant ou pendant l'infection par la souche virale.

Il résulte également du tableau A que le PS3 est aussi efficace  
15 que l'AZT.

Au vu de ces résultats, il apparaît que dans le cas du PS3 il s'agit d'un effet spécifique sur la réplication du virus et non d'un effet aspécifique, dû à la nature anionique du PS3, sur l'entrée du virus dans la cellule (il n'y a aucune action lorsque le PS3 est mis en contact  
20 uniquement avant infection).

Dans une deuxième série d'expériences, on a utilisé comme produits de comparaison l'AZT et le sulfate de dextran mis en œuvre respectivement aux concentrations de 0,4 µM et de 10 µg/ml, cette  
25 dernière concentration étant également celle du PS3.

On a utilisé le virus NDK (clade D) mis en œuvre à la dilution virale de  $2,5 \cdot 10^{-5}$  qui correspond à la quantité de particules virales permettant d'infecter 80% des cultures MT<sub>4</sub> (Tissue Culture Infections Dose 80% TCID<sub>80%</sub>).

30 Les résultats observés du jour J3 au jour J6 sont réunis dans le tableau B.

**TABLEAU B**

Agent Antirétroviral			Quantité de syncytia dans la culture (puits) aux jours J3 à J6			
Mise en œuvre	Nature	Concentration finale	J3	J4	J5	J6
Avant infection	PS3	10µg/ml	-	+	++	T
			-	(+)	+	T
	Dextran (sulfate)	10 µg/ml	-	-	-	-
			-	-	-	-
	AZT	0,4 µg/ml	-	+	++	T
			-	-	-	(+)
Pendant infection	PS3	10 µg/ml	-	-	-	-
			-	-	-	-
	Dextran (sulfate)	10 µg/ml	-	-	-	++
			-	(+)	++	T
	AZT	0,4 µm	-	-	-	-
			-	-	-	-
Après infection	PS3	10 µg/ml	-	-	-	-
			-	-	-	-
	Dextran (sulfate)	10 µg/ml	-	-	-	-
			-	+	++	T
	AZT	0,4 µm	-	-	-	-
			-	-	-	-
En continu, avant, pendant et après infection	PS3	10 µg/ml	-	-	-	-
			-	-	-	-
	Dextran (sulfate)	10 µg/ml	-	+	++	T
			-	+	++	T
	AZT	0,4 µm	-	-	-	-
			-	-	-	-
Absence d'agent antirétroviral			-	(+)	++	T
			-	-	-	-
			-	(+)/+	++	T
			-	-(+)/+	++	T
Absence de virus et d'agent antirétroviral			-	-	-	-
			-	-	-	-

Les constatations qu'il est possible de faire au vu des résultats réunis dans le Tableau B sont comme suit.

Au jour J5, après 5 jours à compter de l'infection par la souche virale NDK, les cultures de cellules MT<sub>4</sub> ne forment pas de syncytia lorsqu'elles sont traitées en continu, pendant et après l'infection, avec une concentration de 10 µg/ml de PS3.

Cependant, aucun effet d'inhibition n'est observé lorsque les cellules MT<sub>4</sub> sont traitées uniquement avant l'infection.

Le sulfate de dextran a, au contraire, un effet optimal lorsque les cellules sont traitées avant l'infection virale (2 puits sur 2 inhibés).

Il apparaît par ailleurs, et comme dans la série d'expériences illustrées par le Tableau A, que l'activité du PS3 est comparable à celle de l'AZT.

Les conclusions générales exposées au vu des résultats réunis dans le Tableau A s'appliquent ici.

**Exemple 2B : Mesure de l'inhibition de l'activité de la RT**

Pour évaluer l'action de la laminarine PS3 et des produits de comparaison sur la réplication du virus infectant par mesure de l'activité RT dans une culture de cellules constituées cette fois-ci par des cellules CEM, on a procédé comme suit.

On a mis en évidence le nombre de virus présents dans la culture par la mesure de l'activité RT dans le surnageant de culture, la quantité détectée de l'activité de RT étant proportionnelle au nombre de virus produits.

On a utilisé le même protocole expérimental que celui utilisé dans l'exemple 2A sur cellules MT<sub>4</sub>, à la différence près que l'on a incubé les cellules CEM avec la laminarine sulfatée PS3 ou le produit de comparaison puis on les a cultivées à la concentration de  $0,5 \cdot 10^6$  cellules/ml.

Tous les trois jours, on a compté les cellules et on a dilué les cultures en vue d'une remise en culture à  $0,5 \cdot 10^6$  cellules/ml ; on a réalisé le dosage de l'activité RT suivant un protocole comprenant:

- 5 - la libération dans les échantillons de culture des enzymes virales et notamment de la RT,
- la mise en réaction des échantillons avec un mélange réactionnel comportant de la  $^3\text{H}$  dTTP (thymidine) radioactive,
- l'isolement de l'ADN synthétisé par suite de la réplication du rétrovirus,
- 10 - la mesure de la radioactivité de l'ADN synthétisé, cette radioactivité étant proportionnelle à la quantité de thymidine tritiée incorporée dans ledit ADN synthétisé, qui elle-même est proportionnelle à l'activité RT et donc au nombre de virus produits par réplication.

On a effectué la préparation des échantillons de culture en laboratoire protégé de type P3.

On a centrifugé le contenu de chaque puits (1 ml) pendant 5 mn à 1500 rpm (centrifugeuse Jouan GR 422), puis ultracentrifugé le surnageant de culture ainsi obtenu à 4°C, 95000 rpm (ultracentrifugeuse Beckman TL100) pour obtenir le culot viral.

On a ensuite repris le culot viral dans un tube à essais contenant 10 µl de tampon NTE additionné de 0,1% de triton qui libère les enzymes virales et en particulier la RT ; on a alors vortexé le tube, bouché au parafilm et maintenu 10 minutes à 4°C puis on l'a congelé à -20°C.

On a préparé le mélange réactionnel dont il est question précédemment en laboratoire de biochimie et ce mélange comprend pour un tube à essais de 5 mL

- Tampon de base 5X 10,0 µl
- Poly rA 1 OD/ml (ARN) 12,5 µl
- Oligo dT 1 OD/ml (Amorce) 12,5 µl
- 30 • Eau distillée 2,5 µl
- $^3\text{H}$  dTTP (thymidine) 1 mCi/ml 2,5 µl

total 40,0 µl

5 La composition du susdit tampon de base 5X est la suivante :

		Concentration finale
	- TRIS 1M pH 7,8	1,25 ml 0,25 M
	- MgCl <sub>2</sub> 0,5 M	1,00 ml 0,10 M
	- KCl 1 M	0,50 ml 0,10 M
10	- DTT 100 mM	0,50 ml 10 Mm
	- H <sub>2</sub> O	1,75 ml

On a préparé autant de tubes à essais contenant ce mélange réactionnel que d'échantillons à tester. En laboratoire de biochimie, on a introduit ces échantillons de 10 µl préparés comme indiqué ci-dessus et qui contiennent le virus lysé par le triton 0,1% dans autant de tubes contenant chacun 40 µl de mélange réactionnel.

On a maintenu les tubes en question pendant une heure au bain-marie à 37°C avec une agitation toutes les 15 minutes.

On a ensuite stoppé la réaction par introduction dans chaque tube de 1 ml de PPNa (pyrophosphate de sodium) 0,1 M préparé dans de l'acide trichloroacétique ou TCA à 5%.

Ensuite, on a précipité l'ADN synthétisé contenu dans le mélange à 4°C par ajout de 3,5 ml/tube d'acide trichloroacétique à 20%, puis on l'a filtré sur filtres de nitrocellulose Millipore 0,45 µ. Pour ce faire, on a versé le contenu des tubes dans les puits correspondants d'un collecteur d'échantillons (Millipore), puis on a rincé les tubes et les puits trois fois avec du TCA à 5%.

On a alors déshydraté les filtres à l'alcool à 70% avant d'être séchés au four à 80°C pendant 20 minutes.

Après refroidissement, on a déposé individuellement les filtres dans des fioles contenant un agent de scintillation ou scintillant vendu sous la marque Emulsifier Safe cat. N° 6013389 par la Société Perkin Elmer.

5 On a ensuite effectué le comptage à l'aide d'un analyseur à scintillation liquide commercialisé sous la marque "PACKARD 2100T", dont les résultats sont exprimés en dpm/ml (désintégration par minute et par ml de surnageant).

10 La quantité de radioactivité que l'on a mesurée est proportionnelle à l'activité RT présente et, par conséquent, au nombre de virus produits par réplication.

Dans une première série d'expériences, on a testé la laminarine sulfatée PS3 aux concentrations de 5 et de 10 µg/ml et le produit de  
15 comparaison, d'AZT à la concentration 0,1 µM.

On a utilisé le virus RTMC (clade B) pour l'infection des cellules CEM qui a la particularité d'être résistant à l'AZT et qui a été mis en œuvre à la dilution de  $5 \cdot 10^{-4}$ .

20 Les résultats enregistrés aux jours J3, J7 et J10 sont réunis dans le tableau C, ces résultats comprennent pour chaque expérience l'activité RT exprimée en dpm/ml et le nombre de cellules exprimé en  $10^6$  cell/ml.

**TABLEAU C**

Dilution virale RMTC	Agent Antirétroviral		Nombre de cellules Quantité RT	Quantité de RT mesurée et nombre correspondant de cellules par ml aux jours J3, J7 et J10					
	Nature	Concentration		J3		J7		J10	
5.10 <sup>-4</sup>	PS3	10 µg/ml	10 <sup>6</sup> Cell./ml	0,2	3,6	0,2	0,8	1,7	3,2
			RT (dpm/ml)	577	356	1056	951	3698	1737
		5 µg/ml	10 <sup>6</sup> Cell./ml	3,6	4,1	1,8	1,1	1,6	0,5
			RT (dpm/ml)	562	2439	57210	2001566	150149	557329
	AZT	0,1 µM	10 <sup>6</sup> Cell./ml	2,7	3,3	2,1	0,9	0,4	0,8
			RT (dpm/ml)	639	1832	37592	87550	282701	1322486
	Absence d'agent Antirétroviral		10 <sup>6</sup> Cell./ml	4	5,7	1	0,6	0,6	0,6
			RT (dpm/ml)	4905	6393	1347767	1274569	1152701	52907
Absence de virus	Absence d'agent Antirétroviral	10 <sup>6</sup> Cell./ml	3,9	5	1,6	2,6	7	4,6	
		RT (dpm/ml)	245	782	1156	2090	1685	1195	

5 Pour mieux faire apparaître l'action de la laminarine sulfatée PS3, on a transposé sur le graphique de la Fig. 4 et à partir des résultats réunis au Tableau C, l'évolution de l'activité RT exprimée en dpm/ml en fonction du temps (jours J3 à J10) pour les cellules traitées respectivement aux deux concentrations de PS3 et avec l'AZT ainsi que  
10 pour les cellules témoins (sans agent) la dilution virale étant 5.10<sup>-4</sup>.

L'examen du Tableau C et la Figure 4 permet de conclure qu'à la concentration de 10µg/ml, le PS3 permet d'obtenir une inhibition proche de 100 % du virus RMTC à la concentration virale de 5.10<sup>-4</sup>.

15 Il est ainsi démontré que le PS3 est efficace sur le virus RMTC qui est résistant à l'AZT, inhibiteur connu de la RT.

**Exemple 3 : Etude de l'action de la PS3 sulfatée en fonction du moment de sa mise en œuvre.**

On a étudié l'action de la laminarine sulfatée PS3 en fonction du moment de sa mise en œuvre (en continu, avant l'infection, pendant  
5 l'infection et après l'infection).

On a procédé comme indiqué précédemment en rapport avec les expériences réalisées sur cellules MT<sub>4</sub>, c'est-à-dire comme dans l'exemple 2A.

De nouveau, on a testé la PS3 aux concentrations de 5 et 10  
10 µg/ml et l'AZT à la concentration de 0,1 µM, le virus mis en œuvre étant, cette fois, le virus NKD (clade D) à la dilution de  $2,5 \cdot 10^{-5}$ .

Les résultats des mesures réalisées aux jours J3 et J7 sont réunis dans le Tableau D, s'agissant de l'activité RT exprimée en dpm/ml et du nombre de cellules exprimé en  $10^6$  cell/ml.

15

**TABLEAU D**

Agent Antirétroviral			Nombre de cellules Quantité RT	Quantité de RT mesurée et nombre correspondant de cellules aux jours J3 et J7			
Mise en oeuvre	Nature	Concentration		J3		J7	
<b>En continu, avant, pendant et après</b>	PS3	10 µg/ml	10 <sup>6</sup> Cell./ml	1,6	1,5	3,1	3,6
			RT (dpm/ml)	471	603	1307	88808
		5 µg/ml	10 <sup>6</sup> Cell./ml	1,1	1,6	3,3	3,4
			RT (dpm/ml)	377	469	926	715
	AZT	0,1 µM	10 <sup>6</sup> Cell./ml	1,7	1,3	3,6	3,2
			RT (dpm/ml)	399	750	14988	48013
<b>Avant infection</b>	PS3	10 µg/ml	10 <sup>6</sup> Cell./ml	0,9	2	1,4	1,7
			RT (dpm/ml)	1321	2199	1543435	1480097
		5 µg/ml	10 <sup>6</sup> Cell./ml	1,2	1,3	2,5	2,4
			RT (dpm/ml)	713	245	285150	505929
	AZT	0,1 µM	10 <sup>6</sup> Cell./ml	1,4	0,8	2	3,8
			RT (dpm/ml)	1251	529	1381090	673
<b>Pendant infection</b>	PS3	10 µg/ml	10 <sup>6</sup> Cell./ml	1,3	1,4	2,5	2,4
			RT (dpm/ml)	571	930	50601	1106
		5 µg/ml	10 <sup>6</sup> Cell./ml	1,2	1,5	2	2,1
			RT (dpm/ml)	756	761	1298585	1753853
	AZT	0,1 µM	10 <sup>6</sup> Cell./ml	1,9	1,6	3,2	1,6
			RT (dpm/ml)	1529	956	94848	1259346
<b>Après infection</b>	PS3	10 µg/ml	10 <sup>6</sup> Cell./ml	1,7	1,3	2,6	2,4
			RT (dpm/ml)	441	741	1665	830254
		5 µg/ml	10 <sup>6</sup> Cell./ml	1,1	1	2,6	2,6
			RT (dpm/ml)	1121	658	460595	1502670
	AZT	0,1 µM	10 <sup>6</sup> Cell./ml	1,2	0,8	1,8	3,2
			RT (dpm/ml)	1249	956	3096138	1098
<b>Absence d'agent antirétroviral</b>			10 <sup>6</sup> Cell./ml	0,8	0,8	2,7	2,6
			RT (dpm/ml)	341	241	1653978	905197
<b>Absence de virus et d'agent antirétroviral</b>			10 <sup>6</sup> Cell./ml	0,6	0,9	3,2	3,6
			RT (dpm/ml)	231	418	1362	351

Sur la Figure 5, qui illustre le Tableau D, on a reporté sur un graphique l'activité RT exprimée en dpm/ml mesurée au jour 7 dans le cas de l'AZT et des deux concentrations de PS3 ainsi que dans le cas des cellules témoin n'ayant pas été traitées avec un agent antirétroviral, et cela pour les quatre expériences correspondant à l'administration de l'agent antirétroviral en continu, avant, pendant et après l'infection par le virus NDK à la dilution de  $2,5 \cdot 10^{-5}$ .

A l'examen du Tableau D et de la Figure 5, il apparaît que le PS3 à la concentration de  $10 \mu\text{g/ml}$  n'a aucune action lorsqu'il est incubé avant l'infection, qu'il est le plus efficace quand il est présent tout au long de l'expérience et qu'il a une action lorsqu'il est mis en œuvre pendant et après l'infection.

Toujours à la concentration de  $10 \mu\text{g/ml}$ , son activité supérieure par rapport à l'AZT apparaît clairement.

15

#### **Exemple 4 : Action inhibitrice directe de la PS3**

On a également procédé à un certain nombre d'expériences supplémentaires en vue d'étudier l'action inhibitrice directe du PS3 sur la RT des virus RW92009, UG92029P, PIC CH et NDK.

A cet effet, on a mesuré l'activité RT des quatre souches de virus qui viennent d'être identifiées et mises en présence du PS3, ainsi que dans certains cas, du sulfate de dextran à titre de produit de comparaison.

Pour effectuer ces mesures, on a procédé de la manière décrite de façon détaillée dans ce qui précède (exemple 2).

On a reporté les résultats enregistrés à l'issue de ces mesures sur des graphiques qui sont montrés aux figures 6 à 9 ; sur ces graphiques, l'axe des ordonnées correspond au pourcentage d'inhibition de l'activité RT (cette activité est exprimée en dpm/ml) mesurée pour différentes concentrations en PS3 ou en sulfate de dextran qui sont

30

indiquées sur l'axe des abscisses, ces concentrations étant exprimées en µg/ml.

Pour le virus RW92009, on a utilisé une concentration virale correspondant à une activité RT de 75 000 dpm ; les résultats obtenus  
5 apparaissent sur le graphique de la figure 6 à l'examen duquel on a constaté que le PS3 à la concentration de 1,5 µg/ml provoque une inhibition de la RT de 45%.

Pour le virus UG92029, on a utilisé une concentration virale correspondant à une activité RT de 220 000 dpm ; les résultats obtenus  
10 apparaissent sur le graphique de la figure 7 dont l'examen montre que le PS3 à la concentration de 2,5 µg/ml provoque une inhibition de la RT de 35%, alors que le sulfate de dextran n'inhibe la RT que de 6% à la même concentration.

On note par ailleurs qu'à la concentration de 3 µg/ml on obtient  
15 une inhibition de 74% pour le PS3 contre 8% pour le sulfate de dextran.

Pour le virus PIC CH, on a utilisé une concentration virale correspondant à une activité RT de 105 000 dpm ; les résultats obtenus  
20 apparaissent sur le graphique de la figure 8 ; à l'examen de ce graphique, on constate que le PS3 à la concentration de 0,6 µg/ml provoque une inhibition de la RT de 46% , alors que le sulfate de dextran ne provoque aucune inhibition à la même concentration ; à la concentration de 0,8 µg/ml, on obtient une inhibition de 65% dans le cas du PS3, alors que le sulfate de dextran ne provoque toujours aucune inhibition.

25

Pour le virus NDK, on a utilisé une concentration virale correspondant à une activité RT de 81 000 dpm ; les résultats obtenus  
apparaissent sur le graphique de la figure 9 dont l'examen montre qu'à la  
concentration de 0,6 µg/ml, le PS3 provoque une inhibition de la RT de  
30 43% contre seulement 11% dans le cas du sulfate de dextran ; à la

concentration de 0,8 µg/ml on obtient respectivement une inhibition de 57% dans le cas du PS3 contre 18% dans le cas du sulfate de dextran.

Les résultats des expériences illustrées par les figures 6 à 9 permettent de confirmer que le PS3 est un inhibiteur de la RT sur diverses  
5 souches de VIH, ce qui traduit l'inhibition précoce du cycle de réplication de ces souches.

Le PS3 est particulièrement efficace sur la RT du virus PIC CH (clade B) qui est résistant à plusieurs agents antiviraux, ainsi que sur le virus NDK (clade D).

10

**Exemple 5 : Mesure de l'activité anti-coagulante de la laminarine sulfatée PS3**

On a montré que l'activité anticoagulante de la laminarine sulfatée PS3 est suffisamment faible comparée à celle de l'héparine pour ne pas  
15 constituer un inconvénient dans le cadre de l'utilisation conforme à l'invention et qu'elle n'est pas cytotoxique aux concentrations les plus élevées susceptibles d'être mises en œuvre.

Pour cela, on a déterminé l'activité anticoagulante du sulfate de laminarine PS3 obtenu à l'exemple 1 en fonction de sa concentration en  
20 comparaison avec celle de l'héparine dans les tests de coagulations classiques APTT ou « Aktivierte partielle Thromboplastin-Zeit », de la durée de prothrombine, du test dit « HEPTTEST » et de la durée de thrombine. L'APTT reflète une interaction avec le système intrinsèque de la coagulation alors que la durée de prothrombine reflète une interaction  
25 avec la coagulation extrinsèque ; le test dit « HEPTTEST » est le test classique pour la mesure de l'activité inhibitrice de l'héparine à l'égard du facteur Xa et la durée de thrombine correspond à la dernière étape de la coagulation à savoir la formation de fibrines induites par la thrombine. On a pu constater qu'au contraire de celle de l'héparine, l'activité du sulfate  
30 de laminarine PS3 dans le test dit « HEPTTEST » est plus de 20 fois plus faible. De même, en rapport avec la durée de prothrombine le sulfate de

laminarine PS3 n'a fait preuve d'aucun effet prononcé anticoagulant, comme dans le cas de l'héparine. L'activité spécifique (IU/mg) dans l'APTT représente 30% de l'activité de l'héparine et dans le cas de la durée de thrombine 60%. Pour empêcher totalement la coagulation, on a dû appliquer dans le cas de l'APTT une concentration 4 fois plus grande et dans le cas de la durée de thrombine une concentration 20 fois plus élevée.

Dans les tests spécifiques anti-facteur Xa et anti-thrombine en utilisant des substrats chromogènes on a constaté que le sulfate de laminarine PS3 au contraire de l'héparine ne présente ni une activité significative anti-facteur Xa dépendant de l'anti-thrombine ni une activité anti-thrombine. L'effet dans le cas de la durée de thrombine peut être considéré comme étant dû à une inhibition de thrombine dépendant du cofacteur II héparine. En raison d'une part de l'activité spécifique plus faible, d'autre part du profil dépendant de la concentration et d'autre part encore d'autres recherches relatives au mécanisme d'action, il est possible de considérer que dans le cas du sulfate de laminarine PS3, le risque de saignement est sensiblement plus faible que dans le cas de l'héparine.

Il s'ensuit que les propriétés inhibitrices de la RT du sulfate de laminarine PS3 pourront être avantageusement mises à profit sans crainte d'effets secondaires indésirables sur la coagulation.

**Exemple 6 : Mesure de la cytotoxicité in vitro de la laminarine sulfatée PS3**

On a déterminé la cytotoxicité in vitro de la laminarine sulfatée PS3 obtenue à l'exemple 1 simultanément à celle d'un produit de comparaison.

Pour ce faire, on a cultivé des cellules CEM en plaque de 24 puits dans 1 ml de RPMI supplémenté par 10 % de sérum et veau foetal, 1 % de Penicilline-Streptomycine, 2mM de glutamine, 2 µg/ml de polybrène et

différentes concentrations de laminarine sulfatée PS3 et du produit de comparaison constitué par le sulfate de dextran.

On a testé quatre concentrations différentes de laminarine sulfatée PS3: 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml et 1000 µg/ml.

5 La plus faible de ces concentrations est déjà très supérieure à la concentration de 10 µg/ml dont l'efficacité a été montrée par les expériences qui précèdent.

Tous les tests ont été réalisés en double.

10 On a compté les cellules tous les jours et on a comparé l'augmentation de leur nombre à celle d'une culture témoin constituée par des cellules CEM cultivées en l'absence de laminarine sulfatée PS3 ou de sulfate de dextran (0µg/ml).

15 Dans le Tableau E, on a réuni les résultats enregistrés aux premier, deuxième et troisième jours de l'expérience, c'est-à-dire le nombre de cellules dénombrées dans chaque culture.

A la lumière de ces résultats réunis au Tableau E, il apparaît que le PS3 ne présente aucune cytotoxicité jusqu'à de très fortes concentrations, en l'occurrence 1 mg/ml.

**TABLEAU E**

<b>Jour 1</b>				
	Nombre de cellules CEM ( $\times 10^6$ /ml) en présence de PS3 ou sulfate de dextran			
Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	PS3		Sulfate de dextran	
1000	0,8	0,5	0,8	0,5
500	1	0,7	1	0,3
250	0,7	0,7	0,5	0,9
125	0,6	0,5	0,5	0,9
Témoin – Absence d'agent antirétroviral	0,9	0,4	0,9	0,4
<b>Jour 2</b>				
	Nombre de cellules CEM ( $\times 10^6$ /ml) en présence de PS3 ou sulfate de dextran			
Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	PS3		Sulfate de dextran	
1000	1,3	1	1,3	1,7
500	1,4	1,5	1,3	1,7
250	1,2	1,4	1,3	1,4
125	0,9	1,1	1,5	1
Témoin – Absence d'agent antirétroviral	1,3	1,2	1,3	1,2
<b>Jour 3</b>				
	Nombre de cellules CEM ( $\times 10^6$ /ml) en présence de PS3 ou sulfate de dextran			
Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	PS3		Sulfate de dextran	
1000	2,4	2,8	2	2,7
500	3,2	2,3	2,1	1,5
250	2,4	2,2	1,9	1,9
125	2,4	2,3	2,3	2,1
Témoin – Absence d'agent antirétroviral	2,4	2	2,4	2

**Exemple 7 : Mesure de la cytotoxicité in vivo de la laminarine sulfatée PS3**

On a recherché une éventuelle toxicité in vivo de la laminarine sulfatée PS3 utilisée conformément à l'invention.

5 On a réalisé cette étude sur des lapins blancs de race New Zealand et sur des rats de race Sprague Dawley.

On a soumis les lapins blancs d'une part au test d'irritation oculaire et d'autre part au test d'irritation cutanée primaire.

10 L'issue du premier de ces tests a permis de conclure à une action légèrement irritante et dans le deuxième à une action non irritante.

On a ensuite soumis les rats d'une part à une étude de détermination de la toxicité dermique aiguë et d'autre part à une étude de  
15 détermination de la toxicité orale aiguë.

Dans le premier cas, la dose létale dermique 50 est supérieure à 2 g/kg de poids du corps ce qui permet d'affirmer que le produit n'est pas toxique.

20 Dans le deuxième cas, la toxicité aiguë par voie orale peut être considérée comme supérieure à 2 g/kg de poids du corps ce qui permet, à nouveau, de classer le produit comme non toxique.

Les expériences qui ont permis d'aboutir à ces conclusions ont été réalisées sous la direction du Docteur R. SHRIVASTAVA au Service de  
25 Toxicologie de l'établissement dénommé

Elevage Scientifique des Dombes (ESD)

ROMANS

01400 CHATILLON SUR CHALARONNE

30 en respectant les lignes directrices de l'OCDE n° 404 et 405 du 24 février 1987 pour autant qu'il s'agit des études effectuées sur les lapins blancs et

les lignes directrices de l'OCDE n° 401 est 402 (1987) ainsi que la directive CEE B-1 92/69 (1992) pour autant qu'il s'agit des études effectuées sur les rats Sprague Dawley.

5 **Exemple 8 : Composition d'une crème à base de laminarine sulfatée PS3**

On a réalisé une crème à base de laminarine sulfatée PS3 présentant la composition suivante :

	Eau déminéralisée	69,7%
	Glycérine	5,0%
10	Sulfate de laminarine PS3	1,0%
	PEG 100 stéarate	4,0%
	Alcool cétéarylique	2,0%
	Conservateur	1,0%
	PEG 40 stéarate	3,0%
15	Acétate de vitamine E	0,5%
	C – 12-15 alkyl benzoate	6,5%
	Caprylic/capric triglycerides	5,5%
	NaOH 0,1 N	1,8%
20		<hr/> 100%

Il est possible de prévoir 2 à 5 applications par jour.

25 **Exemple 9 : Composition d'une solution pour aérosol à base de laminarine sulfatée PS3**

On a réalisé une solution pour aérosol à base de laminarine sulfatée PS3 présentant la composition suivante :

	Sulfate de laminarine PS3	2,5%
	Chlorure de sodium	9,0%
30	Eau déminéralisée Pharmacopée Européenne	88,5%

Il est possible d'administrer par jour une quantité d'aérosol correspondant à une quantité de 1000 à 10 000 µg de substance active.

**Exemple 10 : Composition d'un suppositoire à base d'un sulfate de  $\beta$  1-3 glucan**

5 glucan

On a réalisé un suppositoire à base de sulfate d'un  $\beta$  1-3 glucan présentant la composition suivante :

Sel de potassium de sulfate de  $\beta$  1-3 glucan

(DP=22-24, Degré de sulfatation de 2,4) 5,0%

10 Glycérines hémisynthétiques solides 95,0%

Il est conseillé d'en administrer 1 ou 2 par jour.

**Exemple 11 : Composition d'une solution injectable à base de sulfate de laminaritol**

15 On a réalisé une solution injectable à base de sulfate de laminaritol présentant la composition suivante :

Sel de sodium de sulfate de laminaritol

(DP20 et degré de sulfatation de 2,4) 5,0%

Bicarbonate de sodium 3,0%

20 Eau ppi 92,0%

Sur une durée de 24 heures il est possible d'administrer de 1000 à 3000 ml de la solution injectable.

**Exemple 12 : Composition d'une solution vaginale à base d'un sulfate de  $\beta$  1-3 glucan**

25  $\beta$  1-3 glucan

On a réalisé une solution vaginale à base de sulfate de  $\beta$  1-3 glucan présentant la composition suivante :

Sel de sodium de sulfate de  $\beta$  1-3 glucan

(DP22 et degré de sulfatation de 2,4) 0,1%

30 Chlorure de sodium 9,0%

Alcool éthylique à 95° 5,0%

	Arôme rose	0,2%
	Eau purifiée	84,7%
	Conservateurs (chlorure de benzalkonium)	0,2%
	Edétate de sodium	0,3%
5	Polysorbate 20	0,5%
		<hr/>
		100%

Il est possible de faire une ou deux applications par jour.

10

Au vu de l'ensemble des résultats expérimentaux décrits dans ce qui précède, il est possible de conclure que les polysaccharides de formule (I) et tout particulièrement la laminarine sulfatée présentent une activité anti-rétrovirale importante, en particulier sur le cycle de réplication du VIH.

15

Le moment de mise en œuvre auquel la laminarine sulfatée PS3 est efficace démontre une action spécifique sur les événements précoces du cycle de réplication du virus.

20

Aucune toxicité sur les cellules n'a été constatée aux doses inhibitrices testées et même à 1 mg/ml.

De plus, l'absence de toxicité du sulfate de laminarine, même à 1 mg/ml sur les cellules CEM témoigne d'un indice thérapeutique supérieur à 200.

25

L'activité anti-rétrovirale des polysaccharides de formule (I), notamment celle de la laminarine sulfatée, est non seulement meilleure que celle des produits précédemment utilisés, mais, de plus, elle s'exerce même sur des virus résistant à des inhibiteurs connus de la RT, s'agissant du virus PIC CH qui est résistant au d4T et au Zérit et du virus RTMC qui est résistant à l'AZT.

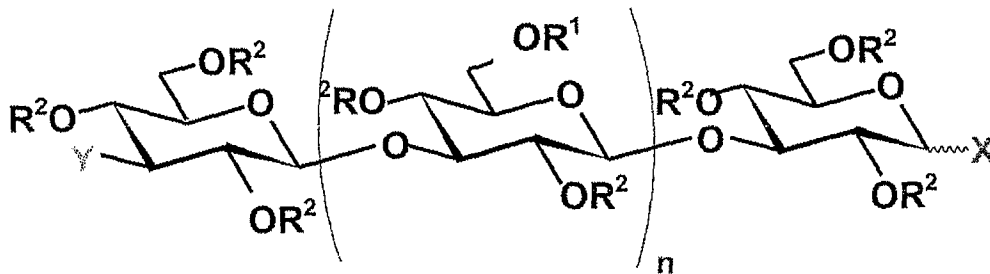
30

Les polysaccharides de formule (I), et tout particulièrement la laminarine sulfatée, inhibent la RT des virus isolés, ce qui semble écarter

l'hypothèse d'un mécanisme d'action lié au simple caractère anionique des polysaccharides sulfatés de l'invention.

## REVENDICATIONS

## 1. Utilisation d'un polysaccharide de formule (I)



5

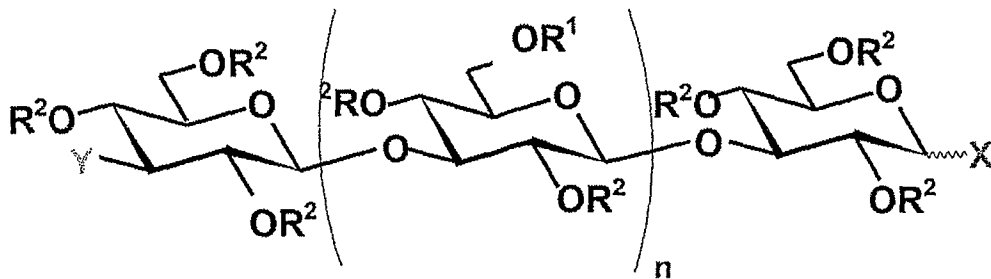
(I)

dans laquelle

- R<sup>1</sup> représente soit un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate, soit un glucose sulfaté ou phosphaté lié, de préférence, par une liaison de type  $\beta(1\rightarrow6)$  à la structure saccharidique,
- R<sup>2</sup> représente un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate, R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> ne pouvant pas représenter simultanément un atome d'hydrogène,
- X et Y représentent, chacun indépendamment, un groupement OH, un glucose, un glucose sulfaté ou phosphaté, un mannitol, ou un mannitol sulfaté ou phosphaté,
- n représente un nombre entier de 11 à 30, préférentiellement de 20 à 30, plus préférentiellement de 25 à 30,

ledit polysaccharide ayant un degré de sulfatation supérieur à 2, préférentiellement de 2,2 à 2,4, ou un degré de phosphatation supérieur à 1, préférentiellement de 1,5 à 2,5, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des maladies rétrovirales.

## 2. Utilisation d'un polysaccharide de formule (I)



(I)

dans laquelle

- R<sup>1</sup> représente soit un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate, soit un glucose sulfaté ou phosphaté lié, de préférence, par une liaison de type  $\beta(1\rightarrow6)$  à la structure saccharidique,
- R<sup>2</sup> représente un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate, R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> ne pouvant pas représenter simultanément un atome d'hydrogène,
- X et Y représentent, chacun indépendamment, un groupement OH, un glucose, un glucose sulfaté ou phosphaté, un mannitol, ou un mannitol sulfaté ou phosphaté,
- n représente un nombre entier de 11 à 30, préférentiellement de 20 à 30, plus préférentiellement de 25 à 30,

ledit polysaccharide ayant un degré de sulfatation supérieur à 2, préférentiellement de 2,2 à 2,4, ou un degré de phosphatation supérieur à 1, préférentiellement de 1,5 à 2,5, pour la mise en œuvre d'une méthode de traitement des maladies rétrovirales.

20

3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que le polysaccharide de formule (I) est une laminarine sulfatée ayant un degré de polymérisation de 11 à 28.

4. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que le polysaccharide de formule (I) est une laminarine phosphatée ayant un degré de polymérisation de 11 à 28.
- 5 5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les maladies rétrovirales sont préférentiellement choisies parmi celles causées par les lentivirus et les oncovirus, plus particulièrement par les VIH, et par les souches de ces rétrovirus résistantes aux agents anti-rétroviraux déjà connus.
- 10 6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la maladie rétrovirale est le syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA chez l'homme.
- 15 7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les maladies rétrovirales sont les cancers associés aux oncovirus.
8. Produit de combinaison comprenant une quantité efficace
- 20 - d'un polysaccharide de formule (I) dans laquelle  $R^1$  représente soit un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate, soit un glucose sulfaté ou phosphaté lié, de préférence, par une liaison de type  $\beta(1\rightarrow6)$  à la structure saccharidique,  $R^2$  représente un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate,
- 25 X et Y représentent, chacun indépendamment, un groupement OH, un glucose, un glucose sulfaté ou phosphaté, un mannitol, ou un mannitol sulfaté ou phosphaté, n représente un nombre entier de 11 à 30, préférentiellement de 20 à 30, plus préférentiellement de 25 à 30, ledit polysaccharide ayant un degré de sulfatation supérieur à 2,
- 30 préférentiellement de 2,2 à 2,4, ou un degré de phosphatation supérieur à 1, préférentiellement de 1,5 à 2,5,

- d'au moins un agent antirétroviral choisi dans le groupe comprenant :

- 5 • les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INRT), dont notamment l'AZT, le ddI, le ddC, le d4T, le 3TC et le ABC,
- les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNRT), dont notamment le Viramune et le Sustiva,
- 10 • les inhibiteurs de la protéase, dont notamment l'Agénérase et le Kaletra,
- les inhibiteurs de la fusion, dont notamment l'enfuvirtide (Fuzeon),
- les inhibiteurs d'entrée, dont notamment l'AMD-3100 et, éventuellement

15 - d'au moins un agent pharmacologique choisi dans le groupe comprenant les agents anti-nauséeux, les agents anti-diarrhéiques, les agents anti-hyperbilirubinémie, les agents anti-douleurs, les agents pour traitements dermatologiques, les agents anti-néphrotoxiques, pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps.

20

#### 9. Utilisation d'une quantité efficace

- d'un polysaccharide de formule (I) dans laquelle  $R^1$  représente soit un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate, soit un glucose sulfaté ou phosphaté lié, de préférence, par  
25 une liaison de type  $\beta(1 \rightarrow 6)$  à la structure saccharidique,  $R^2$  représente un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate, X et Y représentent, chacun indépendamment, un groupement OH, un glucose, un glucose sulfaté ou phosphaté, un mannitol, ou un mannitol sulfaté ou phosphaté, n représente un nombre entier de 11 à 30,  
30 préférentiellement de 20 à 30, plus préférentiellement de 25 à 30, ledit polysaccharide ayant un degré de sulfatation supérieur à 2,

préférentiellement de 2,2 à 2,4, ou un degré de phosphatation supérieur à 1, préférentiellement de 1,5 à 2,5,

- d'au moins un agent antirétroviral choisi dans le groupe comprenant :

- 5                   • les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INRT), dont notamment l'AZT, le ddl, le ddC, le d4T, le 3TC et le ABC,
- les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNRT), dont notamment le Viramune et le  
10                   Sustiva,
- les inhibiteurs de la protéase, dont notamment l'Agénérase et le Kaletra,
- les inhibiteurs de la fusion, dont notamment l'enfuvirtide (Fuzeon),
- 15                   • les inhibiteurs d'entrée, dont notamment l'AMD-3100 et, éventuellement

- d'au moins un agent pharmacologique choisi dans le groupe comprenant les agents anti-nauséux, les agents anti-diarrhéiques, les agents anti-hyperbilirubinémie, les agents anti-douleurs, les agents pour  
20                   traitements dermatologiques, les agents anti-néphrotoxiques, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des maladies rétrovirales, de préférence causées par les lentivirus et les oncovirus, plus préférentiellement par le VIH, notamment par les souches de ces rétrovirus résistantes aux agents anti-rétroviraux déjà connus.

25

#### 10. Utilisation d'une quantité efficace

- d'un polysaccharide de formule (I) dans laquelle R<sup>1</sup> représente soit un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate, soit un glucose sulfaté ou phosphaté lié, de préférence, par  
30                   une liaison de type  $\beta(1\rightarrow6)$  à la structure saccharidique, R<sup>2</sup> représente un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate,

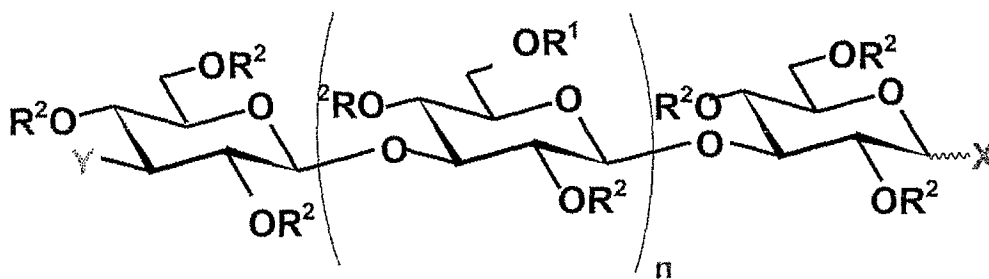
X et Y représentent, chacun indépendamment, un groupement OH, un glucose, un glucose sulfaté ou phosphaté, un mannitol, ou un mannitol sulfaté ou phosphaté, n représente un nombre entier de 11 à 30, préférentiellement de 20 à 30, plus préférentiellement de 25 à 30, ledit  
5 polysaccharide ayant un degré de sulfatation supérieur à 2, préférentiellement de 2,2 à 2,4, ou un degré de phosphatation supérieur à 1, préférentiellement de 1,5 à 2,5,

- d'au moins un agent antirétroviral choisi dans le groupe comprenant :

- 10 • les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INRT), dont notamment l'AZT, le ddl, le ddC, le d4T, le 3TC et le ABC,
- les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNRT), dont notamment le Viramune et le  
15 Sustiva,
- les inhibiteurs de la protéase, dont notamment l'Agénérase et le Kaletra,
- les inhibiteurs de la fusion, dont notamment l'enfuvirtide (Fuzeon),
- 20 • les inhibiteurs d'entrée, dont notamment l'AMD-3100 et, éventuellement

- d'au moins un agent pharmacologique choisi dans le groupe comprenant les agents anti-nauséeux, les agents anti-diarrhéiques, les agents anti-hyperbilirubinémie, les agents anti-douleurs, les agents pour  
25 traitements dermatologiques, les agents anti-néphrotoxiques, pour la mise en œuvre d'une méthode de traitement des maladies rétrovirales, de préférence causées par les lentivirus et les oncovirus, plus préférentiellement par le VIH, notamment par les souches de ces rétrovirus résistantes aux agents anti-rétroviraux déjà connus.

11. Méthode de traitement d'une maladie rétrovirale, de préférence causée par les lentivirus et les oncovirus, plus préférentiellement par le VIH, notamment par les souches de ces rétrovirus résistantes aux agents anti-rétroviraux déjà connus, comprenant l'administration, chez un patient atteint par ladite maladie rétrovirale, d'une quantité efficace d'un médicament comprenant à titre d'agent actif au moins un polysaccharide de formule (I)



(I)

- 10 dans laquelle  $R^1$  représente soit un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate, soit un glucose sulfaté ou phosphaté lié, de préférence, par une liaison de type  $\beta(1 \rightarrow 6)$  à la structure saccharidique,  $R^2$  représente un atome d'hydrogène, un groupement sulfate ou un groupement phosphate, X et Y représentent, chacun
- 15 indépendamment, un groupement OH, un glucose, un glucose sulfaté ou phosphaté, un mannitol, ou un mannitol sulfaté ou phosphaté, n représente un nombre entier de 11 à 30, préférentiellement de 20 à 30, plus préférentiellement de 25 à 30, ledit polysaccharide ayant un degré de sulfatation supérieur à 2, préférentiellement de 2,2 à 2,4, ou un degré de
- 20 phosphatation supérieur à 1, préférentiellement de 1,5 à 2,5 ; ou d'un produit de combinaison tel que revendiqué dans la revendication 8.

12. Méthode de traitement selon la revendication 11, dans laquelle le polysaccharide de formule (I) est une laminarine sulfatée, caractérisée en

ce qu'elle possède un degré de sulfatation supérieur à 2, de préférence de 2,2 à 2,4, et un degré de polymérisation de 11 à 28.

13. Méthode de traitement selon la revendication 11, dans laquelle le  
5 polysaccharide de formule (I) est une laminarine phosphatée, caractérisée en ce qu'elle possède un degré de phosphatation supérieur à 1, de préférence de 1,5 à 2,5, et un degré de polymérisation de 11 à 28.

FIG. 1

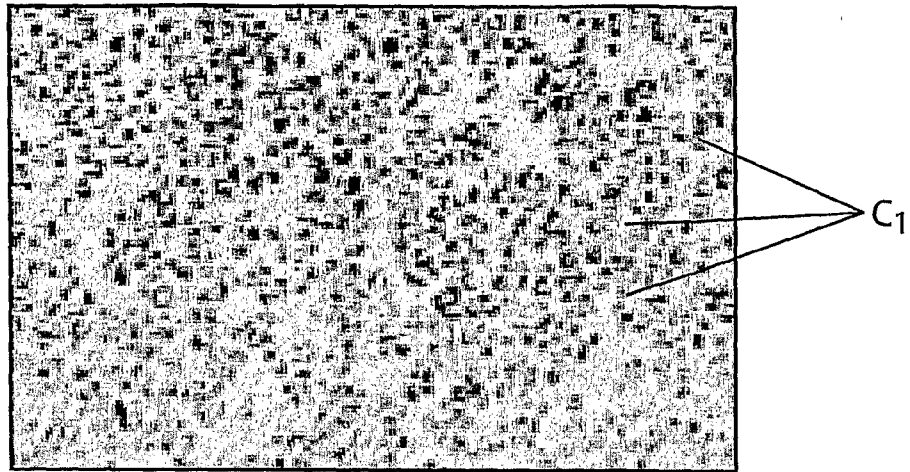
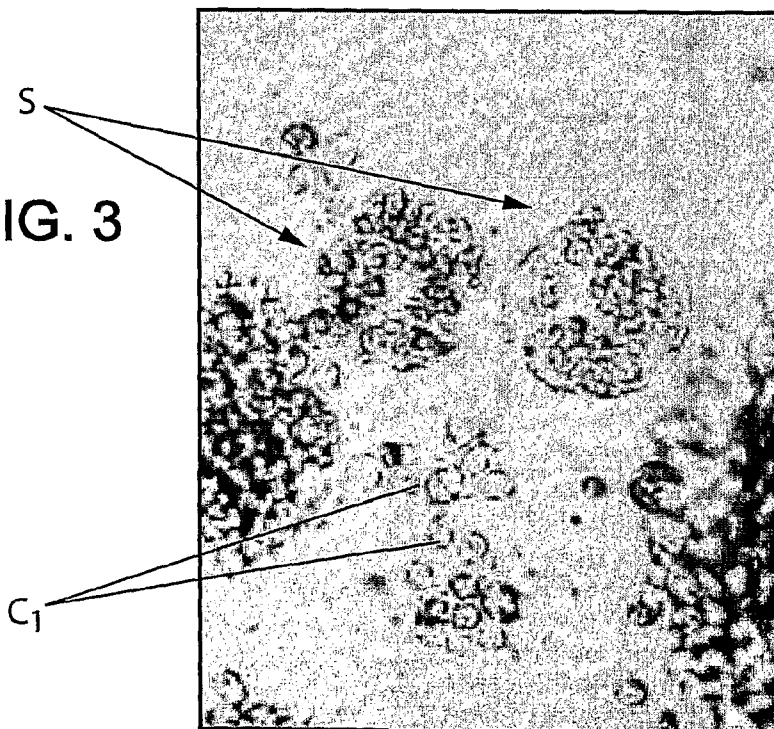


FIG. 2



FIG. 3



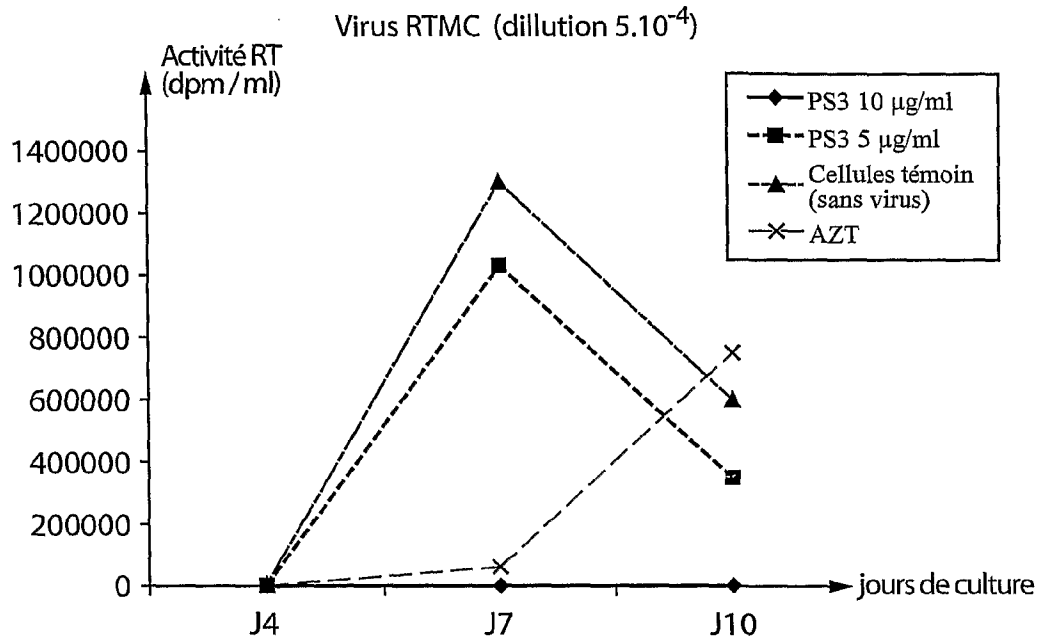


FIG. 4

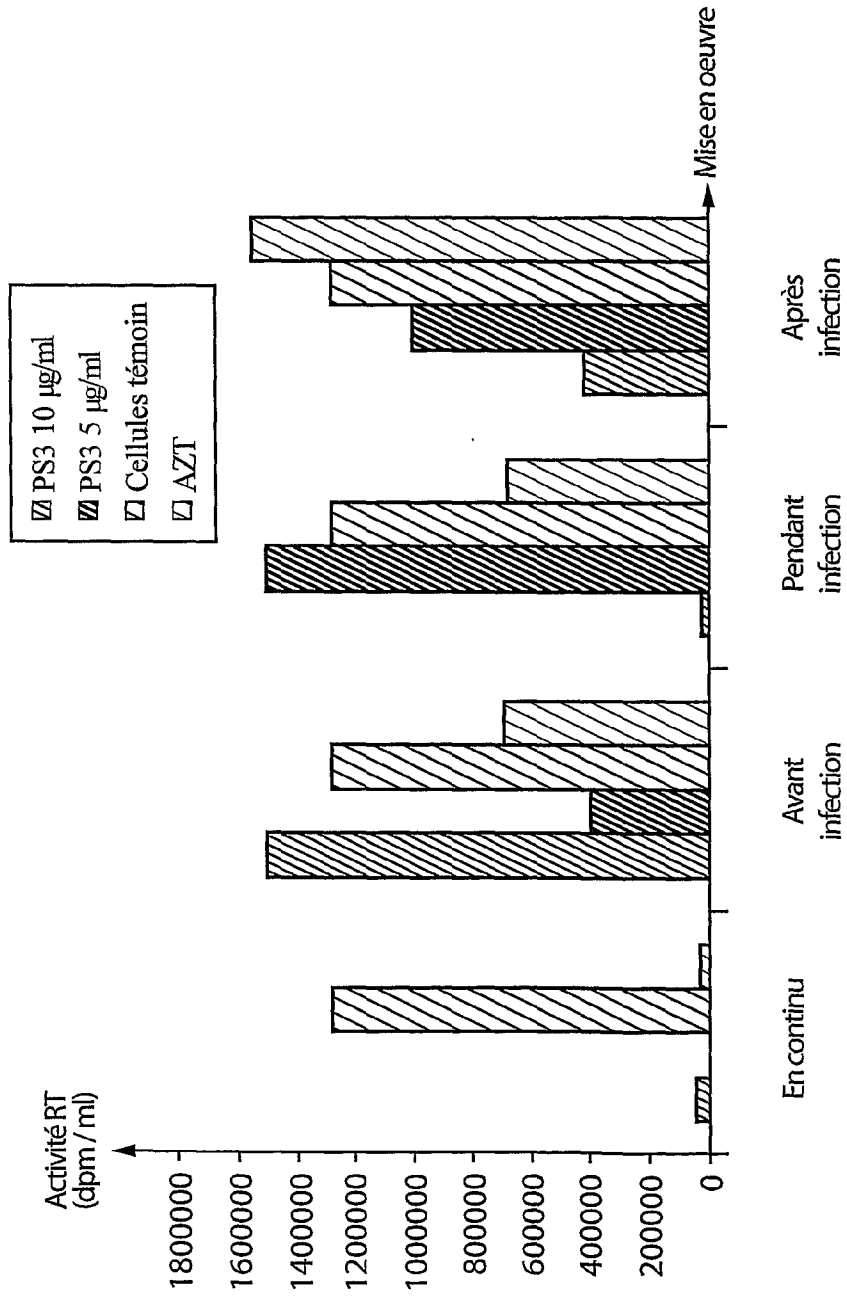
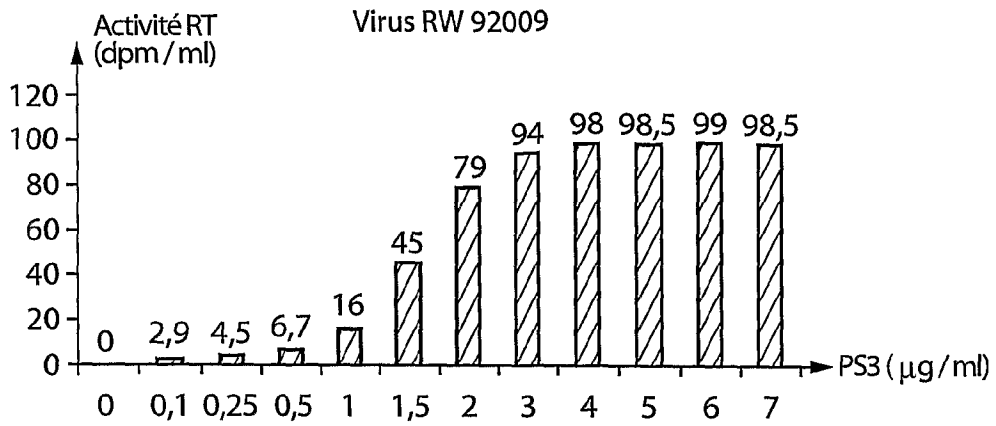
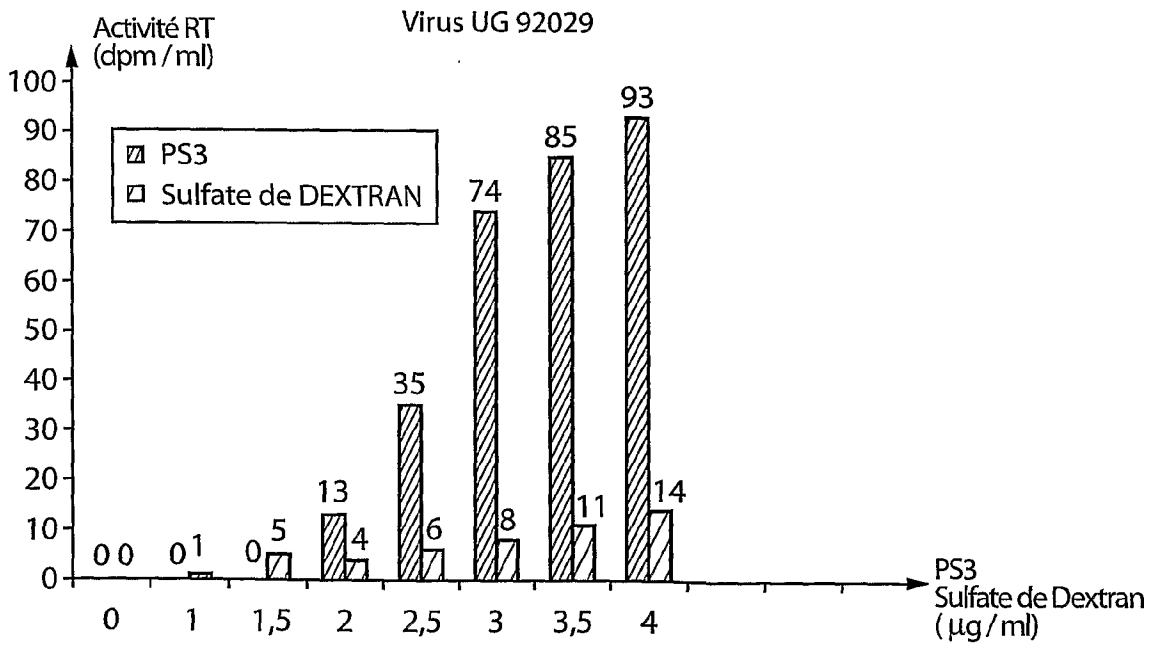


FIG. 5



**FIG. 6**



**FIG. 7**

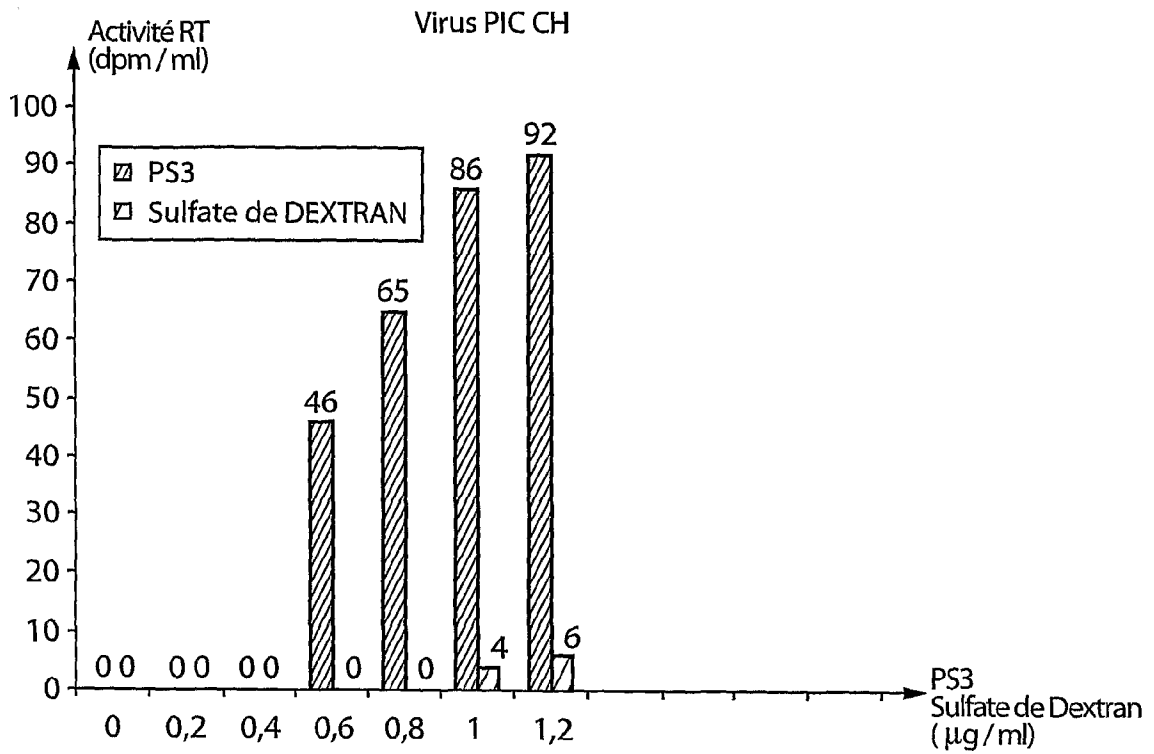


FIG. 8

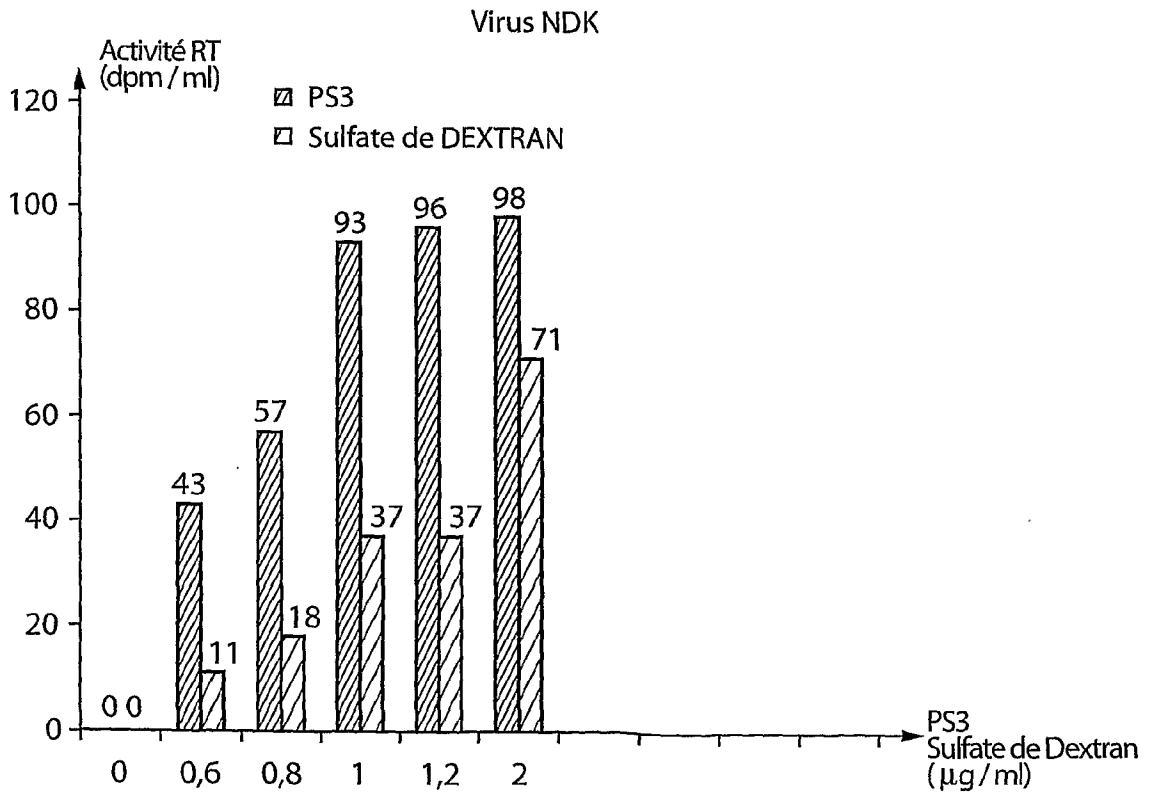


FIG. 9

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/FR2007/000630

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 INV. A61K31/716 A61K31/737 A61K45/06 A61P31/14 A61P31/18  
 A61P35/00

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)  
 A61K

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, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, PASCAL, SCISEARCH

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 240 098 A2 (UENO SEIYAKU OYO KENKYUJO KK [JP]) 7 October 1987 (1987-10-07) cited in the application page 2, line 4 - line 10 page 4, line 14 - line 15 page 4, line 32 - line 38 claims 1,4	1-3,5-12
X	EP 0 464 759 A2 (HOECHST AG [DE]) 8 January 1992 (1992-01-08) cited in the application page 4, line 30 - line 34 claims 2,5	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	*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
*E* earlier document but published on or after the international filing date	*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
*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)	*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.
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*&* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  23 August 2007	Date of mailing of the international search report  03/09/2007
---	--

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  Albrecht, Silke
---	---

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 2-7, 10-13  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Although claims 2-7 and 10-13 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the product or composition.**
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR2007/000630

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 03/045414 A2 (GOEMAR LAB SA [FR]; YVIN JEAN-CLAUDE [FR]; VETVICKA VACLAV [US]) 5 June 2003 (2003-06-05) page 20, line 22 - line 25 page 2, line 9 - line 20	1-3,5-12 4,13
Y	JP 03 145425 A (DAINIPPON INK & CHEMICALS) 20 June 1991 (1991-06-20) cited in the application the whole document	1-3,5-12
Y	US 2003/138397 A1 (KURTZ CAROLINE ISABELLE BACON [US] ET AL BACON KURTZ CAROLINE ISABELLE) 24 July 2003 (2003-07-24) page 5, column 1, paragraph 45 page 7, column 2, paragraph 72	1-3,5-12
Y	NAKASHIMA H ET AL: "SULFATION OF POLYSACCHARIDES GENERATES POTENT AND SELECTIVE INHIBITORS OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS INFECTION AND REPLICATION IN-VITRO" JAPANESE JOURNAL OF CANCER RESEARCH, vol. 78, no. 11, 1987, pages 1164-1168, XP009075444 ISSN: 0910-5050 cited in the application the whole document	1-3,5-12
Y	YAMAMOTO N ET AL: "EFFECT OF THE SULFATED POLYSACCHARIDES ON HIV: A NOVEL STRATEGY OF CHEMICAL MODIFICATION FOR HIV ANTIVIRALS" ARCHIVES OF AIDS RESEARCH, REPRODUCTIVE HEALTH CENTER, KIAWAH ISLAND, SC, US, vol. 1, no. 1, 1987, pages 45-56, XP000869532 ISSN: 0899-4811 page 54, paragraph 2 - paragraph 4	1-3,5-12
Y A	KATO J ET AL: "INHIBITION OF RETROVIRAL REVERSE TRANSCRIPTASES BY COMMERCIAL POLYSACCHARIDE PREPARATIONS" BULLETIN OF THE COLLEGE OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE NIHON UNIVERSITY, no. 47, 1990, pages 81-83, XP001248339 ISSN: 0078-0839 abstract page 82, column 2	1-3,5-12 4,13
A	WO 02/36132 A (GOEMAR LAB SA [FR]; YVIN JEAN CLAUDE [FR]; ALBAN SUSANNE [DE]; FRANZ G) 10 May 2002 (2002-05-10) the whole document	1-13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2007/000630

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0240098	A2	07-10-1987	AU 597635 B2 07-06-1990
			AU 7107487 A 08-10-1987
			CA 1277239 C 04-12-1990
			OA 8581 A 30-09-1988
			PH 25964 A 13-01-1992
			US 4840941 A 20-06-1989
EP 0464759	A2	08-01-1992	AU 7947091 A 09-01-1992
			CA 2046037 A1 04-01-1992
			DE 4021066 A1 09-01-1992
			IE 912320 A1 15-01-1992
			JP 4230325 A 19-08-1992
			PT 98185 A 28-02-1994
WO 03045414	A2	05-06-2003	AU 2002352187 A1 10-06-2003
			CA 2468314 A1 05-06-2003
			CN 1596118 A 16-03-2005
			EP 1448215 A2 25-08-2004
			JP 2005510543 T 21-04-2005
			US 2003119780 A1 26-06-2003
JP 3145425	A	20-06-1991	NONE
US 2003138397	A1	24-07-2003	NONE
WO 0236132	A	10-05-2002	AT 357239 T 15-04-2007
			AU 2373102 A 15-05-2002
			CA 2427744 A1 10-05-2002
			EP 1337261 A1 27-08-2003
			FR 2816213 A1 10-05-2002
			US 2004127457 A1 01-07-2004

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/000630

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**

 INV. A61K31/716 A61K31/737 A61K45/06 A61P31/14 A61P31/18  
 A61P35/00

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)  
 A61K

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, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, PASCAL, SCISEARCH

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 240 098 A2 (UENO SEIYAKU OYO KENKYUJO KK [JP]) 7 octobre 1987 (1987-10-07) cité dans la demande page 2, ligne 4 - ligne 10 page 4, ligne 14 - ligne 15 page 4, ligne 32 - ligne 38 revendications 1,4	1-3,5-12
X	EP 0 464 759 A2 (HOECHST AG [DE]) 8 janvier 1992 (1992-01-08) cité dans la demande page 4, ligne 30 - ligne 34 revendications 2,5	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

23 août 2007

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/09/2007

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

Albrecht, Silke

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	WO 03/045414 A2 (GOEMAR LAB SA [FR]; YVIN JEAN-CLAUDE [FR]; VETVICKA VACLAV [US]) 5 juin 2003 (2003-06-05)	1-3,5-12
A	page 20, ligne 22 - ligne 25 page 2, ligne 9 - ligne 20	4,13
Y	JP 03 145425 A (DAINIPPON INK & CHEMICALS) 20 juin 1991 (1991-06-20) cité dans la demande le document en entier	1-3,5-12
Y	US 2003/138397 A1 (KURTZ CAROLINE ISABELLE BACON [US] ET AL BACON KURTZ CAROLINE ISABELLE) 24 juillet 2003 (2003-07-24) page 5, colonne 1, alinéa 45 page 7, colonne 2, alinéa 72	1-3,5-12
Y	NAKASHIMA H ET AL: "SULFATION OF POLYSACCHARIDES GENERATES POTENT AND SELECTIVE INHIBITORS OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS INFECTION AND REPLICATION IN-VITRO" JAPANESE JOURNAL OF CANCER RESEARCH, vol. 78, no. 11, 1987, pages 1164-1168, XP009075444 ISSN: 0910-5050 cité dans la demande le document en entier	1-3,5-12
Y	YAMAMOTO N ET AL: "EFFECT OF THE SULFATED POLYSACCHARIDES ON HIV: A NOVEL STRATEGY OF CHEMICAL MODIFICATION FOR HIV ANTIVIRALS" ARCHIVES OF AIDS RESEARCH, REPRODUCTIVE HEALTH CENTER, KIAWAH ISLAND, SC, US, vol. 1, no. 1, 1987, pages 45-56, XP000869532 ISSN: 0899-4811 page 54, alinéa 2 - alinéa 4	1-3,5-12
Y	KATO J ET AL: "INHIBITION OF RETROVIRAL REVERSE TRANSCRIPTASES BY COMMERCIAL POLYSACCHARIDE PREPARATIONS" BULLETIN OF THE COLLEGE OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE NIHON UNIVERSITY, no. 47, 1990, pages 81-83, XP001248339 ISSN: 0078-0839	1-3,5-12
A	abrégé page 82, colonne 2	4,13
A	WO 02/36132 A (GOEMAR LAB SA [FR]; YVIN JEAN CLAUDE [FR]; ALBAN SUSANNE [DE]; FRANZ G) 10 mai 2002 (2002-05-10) le document en entier	1-13

**Cadre II Observations – lorsqu’il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l’objet d’une recherche (suite du point 2 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1.  Les revendications n<sup>os</sup> 2-7,10-13 se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  

Bien que les revendications 2-7,10-13 concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit à la composition.
2.  Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3.  Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre III Observations – lorsqu’il y a absence d’unité de l’invention (suite du point 3 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1.  Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2.  Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3.  Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4.  Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2007/000630

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0240098	A2	07-10-1987	AU 597635 B2	07-06-1990
			AU 7107487 A	08-10-1987
			CA 1277239 C	04-12-1990
			OA 8581 A	30-09-1988
			PH 25964 A	13-01-1992
			US 4840941 A	20-06-1989
EP 0464759	A2	08-01-1992	AU 7947091 A	09-01-1992
			CA 2046037 A1	04-01-1992
			DE 4021066 A1	09-01-1992
			IE 912320 A1	15-01-1992
			JP 4230325 A	19-08-1992
			PT 98185 A	28-02-1994
WO 03045414	A2	05-06-2003	AU 2002352187 A1	10-06-2003
			CA 2468314 A1	05-06-2003
			CN 1596118 A	16-03-2005
			EP 1448215 A2	25-08-2004
			JP 2005510543 T	21-04-2005
			US 2003119780 A1	26-06-2003
JP 3145425	A	20-06-1991	AUCUN	
US 2003138397	A1	24-07-2003	AUCUN	
WO 0236132	A	10-05-2002	AT 357239 T	15-04-2007
			AU 2373102 A	15-05-2002
			CA 2427744 A1	10-05-2002
			EP 1337261 A1	27-08-2003
			FR 2816213 A1	10-05-2002
			US 2004127457 A1	01-07-2004