

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 900 577**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **06 03990**

⑤① Int Cl⁸ : **A 61 K 31/737** (2006.01), A 61 K 31/715, A 61 P 31/22

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 04.05.06.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 09.11.07 Bulletin 07/45.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *LABORATOIRES GOEMAR Société
anonyme — FR.*

⑦② Inventeur(s) : *BOURGOUGNON NATALHIE et YVIN
JEAN CLAUDE.*

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : *CABINET PLASSERAUD.*

⑤④ **NOUVEAUX MEDICAMENTS POUR LES TRAITEMENTS CONTRE LE VIRUS DE L'HERPES.**

⑤⑦ La présente invention concerne l'utilisation d'un poly-
saccharide sulfaté ou phosphaté pour la préparation d'un
médicament utilisé pour les traitements contre les herpèsvi-
rus, plus particulièrement contre les alpha herpèsvirus, et
notamment contre les HSV-1 et HSV-2, ainsi que contre des
souches de ces virus qui sont résistantes aux agents anti-
viraux déjà connus.

FR 2 900 577 - A1



NOUVEAUX MEDICAMENTS POUR LES TRAITEMENTS CONTRE LE VIRUS DE L'HERPÈS

5 L'invention a pour objet de nouveaux médicaments pour les traitements contre les herpèsvirus (*Herpèsviridae*).

Il est rappelé que les herpèsvirus appartiennent à une famille de virus dont le génome est à ADN linéaire double brin codant 100 à 200 gènes et qui est encapsulé dans une cage protéinique icosaédrique appelée la capside, elle-même
10 enveloppée dans une membrane lipidique appelée enveloppe.

La famille des herpèsvirus comporte trois sous familles, à savoir les alpha herpèsvirus, les bêta herpèsvirus et les gamma herpèsvirus.

Les alpha herpèsvirus sont caractérisés par un tropisme à l'égard d'un grand nombre de types cellulaires. Parmi les alphavirus, on peut citer le virus
15 Herpès simplex 1 (HSV-1) et le virus Herpès simplex 2 (HSV-2) qui sont responsables de l'herpès buccal et/ou génital, ainsi que le virus varicelle-zona (VZV) responsable de la varicelle et du zona.

Les bêta herpèsvirus sont caractérisés par un tropisme à l'égard d'un nombre restreint de types cellulaires. Le cytomégalovirus (CMV) responsable
20 d'un syndrome mononucléosique et les herpès virus humains de type 6 (HHV6) et de type 7 (HHV7) responsables de la roséole, appartiennent à cette sous famille.

Les gamma herpèsvirus sont caractérisés par un tropisme limité aux lymphocytes. Parmi les virus de cette sous famille, on peut citer le virus d'Epstein-Barr (EBV) responsable de la mononucléose infectieuse, du lymphome de Burkitt
25 et du carcinome nasopharyngé, et l'herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi ou Rhadinovirus (KSHV) responsable d'un lymphome.

L'infection herpétique comprend une phase d'infection primaire et des phases de latence interrompues par des phases de réactivation. Lors de l'infection primaire ou infection initiale, le virus pénètre dans les cellules épithéliales où il va
30 se multiplier et produire une lyse cellulaire au niveau du site d'inoculation. Le virus peut alors emprunter la voie des nerfs sensitifs pour cheminer jusqu'aux

noyaux des neurones des ganglions. Alors que l'infection primaire est souvent accompagnée d'une période courte de maladie clinique, la latence à long terme est asymptomatique. Lors des phases de latence, le virus intracellulaire ne se réplique pas. Le virus demeure dans le noyau des neurones des ganglions nerveux sous
5 forme d'ADN extrachromosomal sans intégrer le génome cellulaire. Le choix des neurones comme site de latence permet aux virus d'échapper au système immunitaire. Suite à certains stimuli tels que les rayonnements ultraviolets, la fièvre ou un stress émotionnel, le virus peut se réactiver et entamer la transcription de nombreux gènes qui conduisent à une réplication accélérée. Cliniquement, la
10 réactivation s'accompagne souvent de l'apparition de symptômes non spécifiques tels qu'une faible fièvre, un état de fatigue, un érythème, ainsi que de signes cliniques tels que des ganglions lymphatiques enflés ou douloureux et de signes immunologiques tels qu'une diminution du nombre des cellules tueuses naturelles.

Une des particularités de l'herpèsvirus réside dans sa capacité à rester
15 présent dans une cellule hôte sous forme latente sans produire de particules virales tout au long de la vie de l'hôte, et dans sa capacité de réactivation, celle-ci pouvant donner lieu à de multiples infections.

La pénétration de l'herpèsvirus dans la cellule hôte constitue une étape essentielle de l'infection. Elle débute par l'adsorption du virus à la surface
20 cellulaire par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques et de récepteurs non spécifiques à l'égard des récepteurs comportés par la membrane cellulaire. Après le processus d'adsorption, le virus pénètre dans la cellule par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, libérant ainsi la nucléocapside dans le cytoplasme. La nucléocapside est ensuite dégradée par protéolyse
25 enzymatique avec comme conséquence la libération de l'ADN viral qui migre vers le noyau de la cellule hôte et pénètre dans ce dernier.

Une fois parvenu à l'intérieur du noyau, l'ADN viral est transcrit en ARNm viral par l'ARN polymérase II cellulaire. L'expression des gènes viraux est dite "ordonnée", ce qui traduit le fait qu'elle comporte plusieurs phases successives, à
30 savoir une phase dite « très précoce », une phase dite « précoce » et une phase dite « tardive ».

Lors de la phase très précoce, des protéines très précoces virales (Immediate Early Antigens) sont exprimées. Il s'agit de protéines régulatrices qui se fixent sur l'ADN cellulaire et provoquent l'arrêt de la synthèse de certaines protéines cellulaires tout en provoquant l'augmentation de la synthèse d'autres protéines.

Lors de la phase précoce, des protéines enzymatiques virales telles que l'ADN polymérase et la thymidine kinase sont exprimées. Ces deux enzymes sont très importantes pour la réplication du virus. Des mutations de ces enzymes sont responsables de résistance aux agents anti-herpétiques.

Enfin, lors de la phase tardive, ce sont des protéines tardives virales (Late Antigens) qui correspondent entre autres aux protéines de structure de la capsid et du tégument qui sont exprimées.

L'assemblage de la nucléocapside des virus nouvellement formés par réplication s'effectue en plusieurs étapes qui demeurent mal définies.

Le virus mature devient infectieux lors de son bourgeonnement au niveau de la membrane nucléaire. Les virus nouvellement formés par réplication sont libérés à l'extérieur de la cellule soit par lyse de la membrane cellulaire, soit par la formation d'une vacuole. La durée du cycle de réplication est d'environ 18 à 20 heures. L'efficacité de la réplication se traduit par le fait qu'il y a synthèse d'une particule virale infectieuse pour 100 à 1000 virus produits dans la cellule hôte.

Les traitements actuellement mis en œuvre pour combattre les herpèsvirus, notamment HSV-1 et HSV-2, visent à bloquer leur cycle de réplication.

Dans ces traitements, on utilise deux groupes d'agents anti-viraux propres à inhiber la synthèse de l'ADN des herpèsvirus, s'agissant d'une part d'inhibiteurs nucléosidiques et, d'autre part d'inhibiteurs non nucléosidiques de l'ADN polymérase virale.

Parmi les inhibiteurs nucléosidiques de l'ADN polymérase virale, on peut citer l'acyclovir, le penciclovir ainsi que leurs prodrogues respectives, à savoir le valacyclovir et le famcyclovir. Les inhibiteurs nucléosidiques se distinguent des nucléosides naturels par des modifications de leur sucre ou de leur base purique

ou pyrimidique. Ils entrent en compétition avec les nucléosides naturels et empêchent l'élongation de la chaîne d'ADN.

L'acyclovir est l'inhibiteur nucléosidique préféré pour le traitement des infections herpétiques. Pour pouvoir agir contre le virus, il doit tout d'abord être phosphorylé par l'enzyme virale thymidine kinase (TK) ; il doit ensuite être soumis à d'autres phosphorylations réalisées par des enzymes cellulaires ce qui permet d'aboutir à sa forme active. Sous cette forme active, l'acyclovir est un inhibiteur très sélectif de l'ADN polymérase virale qu'il inhibe davantage que l'ADN polymérase cellulaire.

Pour ce qui est des inhibiteurs non nucléosidiques, ce sont des analogues de pyrophosphate anorganique. Ces molécules n'ont pas à être préalablement phosphorylées pour inhiber les enzymes virales. Les traitements à base d'inhibiteurs non nucléosidiques sont utilisés dans le cas d'infections résistantes aux analogues nucléosidiques. Parmi les inhibiteurs non nucléosidiques de l'ADN polymérase virale on peut citer le Foscarnet.

Actuellement, les limites des traitements utilisés pour combattre les herpesvirus, notamment HSV-1 et HSV-2 sont dues à la toxicité des inhibiteurs mis en oeuvre, à l'émergence de souches virales résistantes ainsi qu'au fait que ces traitements ne sont actifs que sur des virus en phase de réplication.

Le mécanisme de résistance de certaines souches virales à l'acyclovir est principalement dû à la présence de mutations sur le gène codant pour la TK virale, ce qui induit une altération de sa fonction. Ainsi, une TK déficiente ne sera plus en mesure de phosphoryler l'acyclovir. Mais une souche virale mutante comportant une TK déficiente n'en reste pas moins viable car l'enzyme TK n'est pas essentielle pour la réplication du virus.

Chez les individus immunocompétents, l'apparition de souches HSV résistantes à l'acyclovir est très rare mais a été signalée. En revanche, ce risque est plus grand dans le cas des individus immunodéficients, c'est-à-dire ceux qui sont soumis à une thérapie immunodépressive ce qui est le cas notamment pour les personnes ayant subi une transplantation d'organe, ceux atteints du syndrome de

l'immunodéficience acquise (SIDA) ou ceux qui présente des grandes altérations de la peau tels que les grands brûlés.

Plusieurs facteurs seraient associés à ce phénomène de résistance rencontré chez les individus immunodéficients. Il y a tout d'abord l'hétérogénéité des populations virales présentes chez un individu infecté. Certaines souches mutantes seraient issues de sous-populations virales minoritaires naturellement résistantes à un antiviral donné (ainsi, environ 0,01% des virus HSV sont spontanément résistants à l'acyclovir ou ACV). Il y a également le fait que le degré d'immunodéficience d'un individu infecté semblerait jouer un rôle important en influençant les facteurs immunitaires qui interviennent dans la limitation de la réplication virale. Enfin, l'usage prolongé d'agents antiviraux à des doses parfois suboptimales peut favoriser le développement de la résistance virale (Englund et al., Ann. Intern. Med., 1990, **112** : 416-22).

Comme déjà indiqué plus haut, le Foscarnet est actuellement le seul agent anti-herpèsvirus approuvé pour le traitement des infections causées par des HSV résistants aux analogues nucléosidiques. Cependant, un traitement à long terme au Foscarnet entraîne fréquemment une forte intolérance.

Enfin, il n'existe pas, actuellement, de vaccin anti-Herpès permettant un traitement de prévention.

Au vu des considérations qui précèdent, il est devenu nécessaire de faire porter l'effort de recherche sur d'autres cibles thérapeutiques et de mettre au point de nouveaux agents antiviraux permettant de combattre l'infection herpétique.

Il s'est avéré qu'une telle cible thérapeutique prometteuse se situe au niveau de l'entrée des particules virales dans la cellule, et plus particulièrement au niveau du mécanisme d'adsorption de ces particules virales à la surface cellulaire ; un intérêt particulier de cette cible est qu'elle se situe en amont de la pénétration des nucléocapsides dans les cellules, autrement dit de la réplication virale.

L'adsorption est une étape critique de l'infection.

Il est déjà connu que certains polysaccharides sulfatés dont notamment le sulfate de dextran étaient capables d'interférer dans le mécanisme d'adsorption de

certains virus enveloppés, s'agissant notamment du HSV-1 et du HSV-2. (Baba et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1988, **32** : 1742-1745).

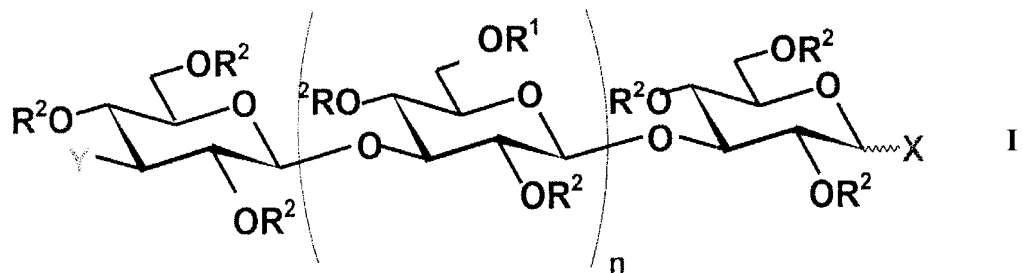
Ainsi, Mazumder et al. (*Inter. J. Biol. Macromol*, 2002, **31** : 87-95) ont montré qu'un polysaccharide de très haut poids moléculaire (165197 Da), extrait
5 d'une algue rouge *Gracilaria corticata* exerçait un effet d'inhibition à l'égard de l'adsorption de virus HSV-1 et HSV-2 sur des cellules Vero.

Par ailleurs, Yingzhou et al. (*China J.I.*, 2004, **6** : 23) ont montré qu'un polysaccharide extrait d'une autre espèce d'algue rouge *Eucheuma striatum* avait également un effet inhibiteur sur l'adsorption du virus HSV-1 sur des cellules *in*
10 *vitro*.

Ces travaux n'ont toutefois pas conduit à la mise au point de nouveaux traitements contre les herpèsvirus.

L'invention a donc pour but, surtout, de mettre à la disposition du corps médical de nouveaux médicaments à indice thérapeutique élevé pour lutter contre
15 les herpèsvirus en général, et plus particulièrement contre les alpha herpèsvirus, et notamment contre les HSV-1 et HSV-2, ces médicaments s'opposant essentiellement à la multiplication desdits virus par inhibition de l'adsorption de ces derniers sur la cellule hôte.

Et il est du mérite de la Société Demanderesse d'avoir trouvé que, de façon
20 surprenante et inattendue, ce but pouvait être atteint par le recours, pour la constitution d'un médicament pour les traitements contre les herpèsvirus, plus particulièrement contre les alpha herpèsvirus, et notamment contre les HSV-1 et HSV-2, ainsi que contre des souches de ces virus qui sont résistantes aux agents antiviraux déjà connus, aux représentants d'une famille de polysaccharides,



représentée par la 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
5 β de type β -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, ledit médicament agissant notamment par inhibition de l'adsorption des virus en question sur la cellule hôte.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention vise l'utilisation de
10 la laminarine sulfatée ayant un degré de sulfatation supérieur à 2 et de préférence de 2,2 à 2,4 pour la préparation d'un médicament pour les traitements contre les herpèsvirus en général plus particulièrement contre les alpha herpèsvirus, et notamment contre les HSV-1 et HSV-2, ce médicament qui est également actif contre des souches résistantes aux agents antiviraux déjà connus agissant sur la
15 multiplication desdits virus notamment par inhibition de l'adsorption de ces derniers sur la cellule hôte.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, l'invention vise l'utilisation du phosphate de laminarine ayant un degré de phosphatation supérieur à 1 et de préférence de 1,5 à 2,5 pour la préparation d'un médicament pour les traitements
20 contre les herpèsvirus en général, plus particulièrement contre les alpha herpèsvirus, et notamment contre les HSV-1 et HSV-2, ce médicament qui est également actif contre des souches résistantes aux agents antiviraux déjà connus agissant sur la multiplication desdits virus notamment par inhibition de l'adsorption de ces derniers sur la cellule hôte.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, l'invention vise
25 l'utilisation d'un oligosaccharide, obtenu à partir de la laminarine sulfatée de degré de sulfatation supérieur à 2 et de préférence de 2,2 à 2,4, le degré de polymérisation de cet oligosaccharide étant de 11 à 28, pour la préparation d'un médicament pour les traitements contre les herpèsvirus en général, plus
30 particulièrement contre les alpha herpèsvirus, et notamment contre les HSV-1 et HSV-2, ce médicament qui est également actif contre des souches résistantes aux

agents antiviraux déjà connus agissant sur la multiplication desdits virus notamment par inhibition de l'adsorption de ces derniers sur la cellule hôte.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, l'invention vise l'utilisation d'un oligosaccharide obtenu à partir du phosphate de laminarine de degré de phosphatation supérieur à 1 et de préférence de 1,5 à 2,5, le degré de polymérisation de cet oligosaccharide étant de 11 à 28, pour la préparation d'un médicament pour les traitements contre les herpèsvirus en général, plus particulièrement contre les alpha herpèsvirus, et notamment contre les HSV-1 et HSV-2, ce médicament qui est également actif contre des souches résistantes aux agents antiviraux déjà connus agissant sur la multiplication desdits virus notamment par inhibition de l'adsorption de ces derniers sur la cellule hôte.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention vise l'utilisation d'un polysaccharide de formule I, plus particulièrement de la laminarine sulfatée ayant un degré de sulfatation supérieur à 2 et de préférence de 2,2 à 2,4 pour la préparation d'un médicament pour les traitements contre les alpha herpèsvirus, et notamment contre les HSV-1 et HSV-2, tout particulièrement destiné aux individus immunodéficients, plus particulièrement à des individus transplantés, des individus atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) ou des individus qui présentent des grandes altérations de la peau, et notamment les grands brûlés.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, l'invention vise une composition pharmaceutique comprenant au titre de substance active une quantité efficace d'au moins un polysaccharide de formule I, plus particulièrement la laminarine sulfatée ayant un degré de sulfatation supérieur à 2 et de préférence de 2,2 à 2,4, ainsi qu'une quantité efficace d'au moins l'un des composés du groupe comprenant les inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs non-nucléosidiques d'une enzyme virale d'un herpèsvirus.

Ceci étant et quel que soit le mode de réalisation choisi, l'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui suit.

Se proposant par conséquent de mettre à la disposition du monde médical un nouveau médicament pour la lutte contre les herpèsvirus, conformément à l'invention on s'y prend comme suit ou de façon équivalente.

Pour préparer ce nouveau médicament, on a recours à l'un des polysaccharides de la famille des polysaccharides de formule I définie plus haut.

Et c'est en rapport avec les polysaccharides sulfatés de formule I et plus précisément avec un représentant particulièrement préféré de ces polysaccharides, s'agissant de la laminarine sulfatée, que sont démontrés les avantages aussi exceptionnels qu'inattendus de l'invention.

Pour préparer le sulfate de laminarine, on extrait d'abord la laminarine d'une matière première constituée par des algues brunes puis on procède à la sulfatation de la laminarine ainsi extraite.

10 L'extraction de la laminarine peut être réalisée par mise en œuvre du procédé décrit dans le brevet FR 92 08387.

La sulfatation de cette laminarine peut être effectuée par mise en œuvre du procédé décrit dans la publication d'Alban S, Kraus J, Franz G -Synthesis of laminarin sulfates with anticoagulant activity, *Arzneim.Forsch./drug Res*, 1992, 15 **42** ; 1005-1008).

Un procédé perfectionné de sulfatation de la laminarine est décrit 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 permettent d'obtenir un sulfate de laminarine hautement substitué, sans dégradation et avec une bonne reproductibilité sous de bonnes conditions du point de vue économique, tout en restant simples.

Ces procédés peuvent être adaptés à la sulfatation des β 1-3 glucanes en général.

Pour aboutir à une sulfatation efficace de la laminarine sans dégradation des chaînes polysaccharidiques, la réaction de sulfatation doit être effectuée sous des conditions correspondant à une absence absolue d'eau.

Avant la sulfatation, la laminarine est séchée, par exemple sur pentoxide de phosphore (P_2O_5) et ensuite dissoute 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

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.

5 Par suite de la coordination de l'accepteur d'électrons SO_3 avec le 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
10 réaction.

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_3 -pyridine par mole de glucose.

15 Pour garantir l'absence d'eau, on peut travailler sous atmosphère d'argon.

De plus, dès le début de la réaction on ajoute 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_3 -pyridine avec l'eau. Tant la concentration de la laminarine que celle du réactif de sulfatation
20 doivent être aussi élevées que possible, la solubilité du polysaccharide et du réactif de sulfatation, étant limitants. 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 solution du complexe SO_3 -pyridine dans le DMF pourrait ne pas être ajoutée en une seule fois mais de
25 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 entraînent une substitution plus efficace mais, également, une dégradation des chaînes.

Après l'addition du réactif de sulfatation, on continue à agiter le mélange
30 pendant 6 heures à 60°C. A cette température, il se produit une substitution supplémentaire sans dégradation des chaînes.

Le surnageant du mélange est séparé par décantation. Le résidu est dissous dans 2,5 M de NaOH puis mélangé avec 10 fois son volume d'éthanol à 99%. Le précipité qui se produit à une température de 4-8°C pendant la nuit est isolé puis dissous dans de la soude diluée (solution de pH d'environ 9). La solution est
5 dialysée pour enlever les sels et les molécules de bas poids moléculaire grâce à une membrane de type Spectrapor à seuil de coupure 1000 D puis amenée à un pH de 7,0 par addition de NaOH et ensuite lyophilisée. Le sulfate de laminarine résultant se présente sous forme de sel de sodium.

Le degré de sulfatation est déterminé par voie de titration
10 conductimétrique de l'acide libre du polysaccharide sulfaté en utilisant de la soude 0,1N, ou par chromatographie ionique après hydrolyse en utilisant un système 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 éliminés) alors que la méthode HPLC nécessite
15 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 dans la molécule de glucose par une forme modifiée de l'analyse de méthylation suivie d'un examen
20 GC-MS (à savoir Chromatographie Gaz, Spectrométrie de Masse). La sulfatation est pratiquement totale, c'est-à-dire presque tous les groupes hydroxyle en position 6 sont sulfatés. Lors de la substitution des groupes OH secondaires, il n'y a pas de différence significative entre la sulfatation des groupes en position 2 et celle des groupes en position 4.

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

Le degré de polymérisation du sulfate de laminarine ainsi obtenu est de 11 à 28, plus précisément de 23 à 25.

L'étude in vitro de l'activité anti-herpèsvirus de cette laminarine sulfatée
30 généralement désignée par PS3 a permis de trouver les résultats surprenants et inattendus mentionnés plus haut et exposés ci-après.

Cette étude vise à déterminer l'action du polysaccharide notamment sulfaté de formule I, en l'occurrence la laminarine sulfatée, dont l'obtention et les caractéristiques viennent d'être décrites, sur la multiplication des herpèsvirus.

Tout d'abord, l'étude met en évidence l'activité antivirale du polysaccharide sulfaté sur plusieurs souches virales par appréciation de la viabilité de cellules Vero infectées en présence du polysaccharide sulfaté, ladite activité antivirale se traduisant par l'inhibition de l'adsorption des souches virales en question sur la cellule hôte.

Pour chaque souche virale, on mesure la concentration efficace (CE50%), c'est-à-dire la concentration du polysaccharide sulfaté qui permet d'inhiber l'infection de 50 % des cellules d'une culture.

L'étude met en évidence le mécanisme d'action du polysaccharide sulfaté en déterminant son effet sur l'adsorption virale. Le polysaccharide sulfaté est mis en œuvre soit avant, pendant ou après l'infection des cellules Vero par différentes souches virales, soit en permanence.

A titre de comparaison les mêmes expériences sont effectuées en utilisant trois produits de comparaison à savoir le sulfate de dextran, l'acyclovir et la phycarine qui est à la forme non sulfatée de la laminarine.

Dans ce qui suit, il est fait référence à neuf figures, identifiées ci-après.

La figure 1 montre la courbe de titrage d'une suspension stock d'une souche HSV-1 : les pourcentages de cellules Vero détruites sont exprimés en fonction des dilutions virales de la suspension stock (de 10^{-1} à 10^{-8}).

La figure 2 montre l'évolution de la valeur CE_{50} du PS3 ($\mu\text{g/ml}$) dans le cas de cellules Vero infectées par des suspensions virales HSV-1 ayant des MOI différentes (MOI 0,01 $ID_{50}/\text{cellule}$, courbe A, MOI 0,1 $ID_{50}/\text{cellule}$, courbe B et MOI 1 $ID_{50}/\text{cellule}$, courbe C), en fonction des temps d'incubation du PS3 (exprimé en heures h).

La figure 3 est un diagramme montrant les valeurs CE_{50} du PS3 et de l'acyclovir pour chacune des souches virales étudiées, HSV-1, HSV-IR, HSV-2 et HSV-2R, après un traitement de 48 heures des cellules Vero infectées.

La figure 4 est un diagramme montrant les valeurs CE_{50} du PS3 et de l'acyclovir pour chacune des souches virales étudiées HSV-1, HSV-1R, HSV-2 et HSV-2R, après un traitement de 72 heures des cellules Vero infectées.

La figure 5 est un graphique montrant une courbe D traduisant l'activité cytotoxique du PS3, les pourcentages de destruction cellulaires (CC_{50}) étant exprimés en fonction des temps d'incubation du PS3 (heures h).

La figure 6 est un diagramme montrant les valeurs CE_{50} du PS3 et de l'acyclovir obtenues pour des cellules Vero infectées par les suspensions virales HSV-1, HSV-1R, HSV-2 et HSV-2R préalablement traitées par le PS3 ou l'acyclovir, après 48 heures de culture .

La figure 7 est un diagramme montrant les valeurs CE_{50} du PS3 et de l'acyclovir obtenues pour des cellules Vero infectées par les suspensions virales HSV-1, HSV-1R, HSV-2 et HSV-2R préalablement traitées par le PS3 ou l'acyclovir, après 72 heures de culture.

La figure 8 regroupe les quatre graphiques 8A, 8B, 8C et 8D sur lesquels apparaissent les courbes représentant l'évolution des valeurs CE_{50} du PS3 et de l'acyclovir en fonction de la durée de contact du PS3 ou de l'acyclovir avec les cellules Vero infectées par les souches virales HSV-1 (graphique 8A), HSV-1R (graphique 8B) ; HSV-2 (graphique 8C) et HSV-2R (graphique 8D), respectivement.

La figure 9 regroupe les quatre graphiques 9A, 9B, 9C et 9D qui mettent en évidence l'effet du PS3 sur l'adsorption virale des souches virales HSV-1, HSV-1R, HSV-2 et HSV-2R respectivement par mesure des valeurs CE_{50} du PS3 et de l'acyclovir déterminées sur des cellules Vero traitées pendant l'infection (traitement A), après l'infection (traitement B), ou pendant et après l'infection (traitement C).

Les cellules Vero auxquelles il est fait recours sont des cellules fibroblastiques de rein de singe vert (*Cercopithecus aethiops*, ATCC : CCL 81). Ces cellules ont un taux de croissance de 1 :20 en 7 jours quand elles sont ensemencées à une concentration de 3×10^5 cellules/ml dans un milieu de culture MEM supplémenté en sérum de veau fœtal.

Les souches virales mises en œuvre sont :

- la souche 17 sauvage de HSV-1 ACVs et PFAs
- la souche HSV-2 ,
- la souche HSV-1R résistante à l'Acyclovir,
- la souche HSV-2R résistante à l'Acyclovir.

5 Ces souches virales ont été fournies par le Professeur Ingrand (Laboratoire de virologie de Reims, France). Pour obtenir un stock viral pour chacune de ces souches, on a procédé de la façon suivante.

Des cellules Vero sont cultivées dans un flacon jusqu'à confluence (350 000 cellules/ml) dans 5 ml de milieu minimum essentiel de Eagle «Minimum
10 Essential Medium Eagle» (MEM) additionné de 8% de sérum de veau foetal (SVF) contenant
500 µl de suspension virale.

Le flacon de culture est placé dans une étuve à 37°C pendant 2h. Après cette incubation, les cellules sont rincées puis recouvertes de milieu MEM
15 contenant 8% de SVF.

Après 3 à 4 cycles de multiplication virale correspondant à environ 3 jours de culture, le flacon est soumis à 2 cycles successifs de congélation et de décongélation afin de faire éclater les cellules et libérer les virions intracellulaires.

Le surnageant de culture est récupéré puis centrifugé 10 minutes à 600g à
20 l'aide d'une centrifugeuse Jouan MR22i, de façon à éliminer les débris cellulaires.

Le surnageant de culture est congelé à -80°C et constitue le stock viral. Ce stock viral est ensuite titré, puis réparti dans des cryotubes par aliquots de 2 ml qui sont conservés à -80°C.

Pour chaque souche virale, on détermine le titre infectieux qui correspond
25 au nombre de particules virales par unité de volume capables d'infecter des cellules permissives.

Ce titrage est réalisé selon le protocole suivant dans des plaques de microtitration de 96 puits. Chaque plaque de microtitration se compose de 8 lignes de 12 puits formant par conséquent 12 colonnes de 8 puits. Chaque ligne
30 correspond à une dilution de la suspension virale stock de 10^{-1} à 10^{-8} .

Des cellules Vero sontensemencées à une densité cellulaire de $3,5 \cdot 10^4$ cellules/puits dans 100 μ l milieu MEM contenant 8% de SVF :

- une des colonnes, dite colonne témoin négatif, est complétée par 50 μ L de milieu MEM avec 8% de SVF,
- 5 ▪ une autre, dite colonne témoin positif, est complétée par 50 μ L de surnageant de culture issu du stock viral,
- les dix autres colonnes sont successivement complétées par 50 μ L de surnageant viral dilué de 10 en 10 dans du milieu MEM contenant 8% de SVF.

10 La plaque de microtitration est ensuite placée dans une étuve à 37°C pendant 72 heures. Pendant cette période, quatre à cinq cycles de multiplication du virus se produisent. Après 72 heures, le surnageant est éliminé et l'effet cytopathique du virus HSV est examiné Cet effet cytopathique se visualise d'une part par un gonflement et un arrondissement des noyaux des cellules qui prennent
15 un aspect globuleux et d'autre part, par une organisation des cellules infectées en chapelets.

Le titre de chaque souche virale est déterminé par la méthode de Reed et Muench (Am, J. Hyg., 1938, 27 : 493-497). Selon cette méthode de titrage, on compte, pour chaque dilution virale, le nombre de puits présentant un effet
20 cytopatique ainsi que le nombre de puits ne présentant pas d'effet cytopatique. La gamme de dilutions employée est choisie suffisamment large pour inclure d'une part la dilution pour laquelle toutes les réponses sont positives et, d'autre part, la dilution pour laquelle toutes les réponses sont négatives.

Le titre infectieux est exprimé en DI_{50}/ml , qui désigne la dose qui infecte
25 50% des cellules de la culture considérée. Ce titre est calculé selon une formule statistique, après avoir déterminé les dilutions encadrant le point d'infection 50% :

$$\text{Log } DI_{50} = \text{Log}10^{-(\text{dilution supérieure à } 50\%+d)} + d$$

$$\text{où } d = \frac{(\% \text{ dilution supérieure à } 50\% - 50\%)}{(\% \text{ dilution supérieure à } 50\% - \% \text{ dilution inférieure à } 50\%)}$$

A partir de ce calcul, on détermine ce qu'on appelle la multiplicité d'infection MOI (Multiplicity Of Infection) en fonction du nombre de cellules.

A titre d'exemple, la dose infectieuse à 50% de la souche virale HSV-1 est de $10^{4,75}$ DI₅₀ pour 50 µl soit un titrage de $2 \times 10^{5,75}$ DI₅₀ pour 1 ml selon la
5 méthode de Reed et Muench.

Parallèlement à cette méthode, le titre infectieux de la suspension stock de chaque souche virale est également déterminé par la mesure par coloration au rouge neutre de la viabilité de cellules infectées.

Cette méthode repose sur le principe que les cellules vivantes absorbent le
10 rouge neutre qui est un colorant vital. La densité optique du milieu est mesurée à la longueur d'onde d'absorption maximale du rouge neutre, c'est-à-dire 540 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (SpectraCount TM, microplate photometer, Packard). La densité optique à 540 nm est proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans une culture infectée (McLaren et al, Antiviral Research, 1983 ; 3 :
15 223-234 et Langlois et al, Standardization, 1986, 14 : 201-211).

La figure 1 montre la courbe de titrage de la souche virale HSV-1 obtenue par la méthode de viabilité cellulaire au rouge neutre. La dose infectieuse à 50% de la souche virale HSV-1 est de $10^{5,05}$ pour 50 µl ce qui correspond à un titre infectieux de $2 \times 10^{6,05}$ pour 1 ml ; la valeur de $2 \times 10^{6,05}$ est la moyenne de 4 titrages
20 réalisés pour la souche HSV-1.

Le même protocole a permis de déterminer le titre viral de chaque suspension stock :

25 $2 \times 10^{6,05}$ DI₅₀/ml pour HSV-1
 $2 \times 10^{4,42}$ DI₅₀/ml pour HSV-1R
 $2 \times 10^{5,31}$ DI₅₀/ml pour HSV-2
 $2 \times 10^{4,44}$ DI₅₀/ml pour HSV-2R

Il a été procédé à un certain nombre d'expériences en vue de la mise en évidence de l'activité anti-herpétique du polysaccharide utilisé conformément à
30 l'invention.

Dans une première série d'expériences, on a eu recours à la méthode de viabilité cellulaire pour déterminer l'activité anti-herpétique de la souche virale HSV-1 dont le titre infectieux viral est $2 \times 10^{6,05}$ DI₅₀/ml.

5 Cette activité anti-herpétique a été évaluée en déterminant les concentrations effectives (CE₅₀) de PS3 qui permettent de protéger 50% des cellules d'une culture contre l'infection par des suspensions virales HSV-1 ayant des MOI différentes, en fonction de la durée d'incubation du PS3 (48, 72, 96 et 120 heures).

L'acyclovir a été utilisé comme produit de comparaison.

10 Les gammes de concentration de PS3 utilisées ont été déterminées pour une MOI donnée, à savoir

- la gamme de concentrations de PS3 utilisée varie de 12,5 à 1250 µg/ml, pour une suspension virale HSV-1 ayant une MOI de 1 DI₅₀/cellule,
- 15 ▪ la gamme de concentrations de PS3 utilisée varie de 1,25 à 125 µg/ml, pour une suspension virale HSV-1 ayant une MOI de 0,1 DI₅₀/cellule,
- la gamme de concentrations de PS3 utilisée varie de 0,5 à 125 µg/ml, pour une suspension virale HSV-1 ayant une MOI de 0,01 DI₅₀/cellule.

20 La détermination des CE₅₀ a été réalisée dans des plaques à microtitration de 96 puits selon le protocole suivant. Des cellules Vero sontensemencées à une densité cellulaire de $3,5 \cdot 10^4$ cellules/puits dans 100 µl milieu MEM contenant 8% de SVF. Pour chaque suspension virale définie par sa MOI :

- la colonne témoin négatif est complétée par 100 µl de milieu MEM avec 8% de SVF,
- 25 ▪ la colonne témoin virus est complétée par 50 µl de la suspension virale à la MOI voulue et par 50 µl de milieu MEM avec 8% de SVF,
- la colonne témoin PS3 ou acyclovir est complétée par 50 µl de PS3 à la gamme de concentration voulue ou 50 µl d'acyclovir (Zovirax 0,05 – 5 µg/ml),

- et enfin toutes les autres colonnes sont successivement complétées par 50 µL de PS3 à la gamme de concentration voulue ou 50 µl d'acyclovir (Zovirax 0,05 – 5 µg/ml) et par 50 µl de suspension virale à la MOI voulue.

5 Les cellules sont ensuite incubées dans une étuve à 37°C pendant 48, 72, 96 et 120 heures et la viabilité des cellules est évaluée dans chaque puits après coloration par le rouge neutre selon la méthode décrite ci-dessus.

La CE₅₀ correspondant à la concentration permettant de diminuer de 50 % l'effet cytopathique du virus est calculé selon la formule suivante :

10

$$\frac{DO_{(\text{cellules+virus+PS3 ou acyclovir})} - DO_{(\text{témoin virus})}}{DO_{(\text{cellules + PS3 ou acyclovir})} - DO_{(\text{témoin virus})}}$$

La Figure 2 résume l'activité cinétique anti-herpétique du PS3 pour les trois différentes MOI. Pour chaque temps d'incubation, c'est pour la MOI de 0,01
15 DI₅₀/cellule que l'on enregistre les valeurs de CE₅₀ les plus faibles et, inversement, c'est pour la MOI de 1 DI₅₀/cellule que l'on enregistre les valeurs de CE₅₀ les plus élevées.

Une seconde série d'expériences a permis d'évaluer et de comparer l'activité anti-herpétique du PS3 sur chaque suspension virale HSV-1, HSV-1R,
20 HSV-2 et HSV-2R définie par une MOI de 0,01 DI₅₀/cellule pour une concentration cellulaire de 350 000 cellules/ml, après des temps d'incubation de 48 et 72 heures.

Cette série d'expériences a été réalisée en appliquant le protocole permettant de déterminer les CE₅₀, tel que décrit ci-dessus. Les figures 3 et 4
25 permettent de comparer les CE₅₀ du PS3 sur les différentes souches pour des temps d'incubation de 48 et 72 heures respectivement, le produit de comparaison étant l'acyclovir.

L'examen de ces figures permet de conclure que le PS3 est plus efficace que l'acyclovir pour protéger les cellules Vero contre les souches HSV-1R, HSV-
30 2 et HSV-2R.

En effet, la valeur CE_{50} du PS3 est plus faible que celle de l'acyclovir pour chacune de ces souches, quel que soit le temps de traitement.

Pour déterminer si le PS3 a une activité cytotoxique, on a procédé de la façon suivante. Dans chaque puits, les cellules Vero sontensemencées à une densité cellulaire de $3,5 \cdot 10^5$ cellules/ml dans 100 μ l de milieu MEM contenant 8% de SVF. Les cellules sont traitées par 50 μ l de PS3 dont la concentration varie de 0,125 à 2500 μ g/ml ou par 50 μ l d'acyclovir à une concentration de 5 ; 1 ; 0,5 ; 0,1 et 0,05 μ g/ml. Cinquante μ l de milieu MEM contenant 8% de SVF sont ajoutés à chaque puits. Les puits contenant des cellules non traitées sont complétés par 100 μ l de milieu MEM contenant 8% de SVF. Les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 48, 72, 96 heures. L'activité cytotoxique du PS3 est déterminée par la mesure de la concentration cytotoxique à 50% ou CC_{50} . La CC_{50} correspond à la concentration de PS3 qui inhibe la croissance de 50 % des cellules d'une culture. La valeur CC_{50} , exprimée en pourcentage de destruction cellulaire est mesurée par la méthode de viabilité cellulaire après coloration par le rouge neutre selon la méthode décrite ci-dessus selon la formule :

$$\frac{\text{Densité optique}_{(\text{cellules non traitées})} - \text{Densité optique}_{(\text{cellules traitées})}}{\text{Densité optique}_{(\text{cellules non traitées})}} \times 100$$

La figure 5 illustre le pourcentage de destruction cellulaire (CC_{50}) pour la plus forte concentration de PS3, à savoir 2500 μ g/ml en fonction du temps d'incubation (48, 72 et 96 heures). L'examen de la figure 5 révèle que le PS3 n'a aucun effet toxique pour les cellules Vero quel que soit le temps d'incubation.

Parallèlement, les indices thérapeutiques (IT) du PS3, ainsi que de trois autres produits de référence, à savoir l'acyclovir, le sulfate de dextran et la phycarine ont été déterminés pour chaque souche virale. Les valeurs des IT sont résumées dans le tableau I ci dessous.

TABLEAU I

Temps d'incubation	substances	Indice thérapeutique			
		HSV-1	HSV-1R	HSV-2	HSV-2R
48 heures	PS3	> 1761	> 1157	> 4808	> 3788
	Acyclovir	> 4902	0	> 579	0
	Sulfate de dextran	-	-	-	-
	phycarine	-	-	-	-
72 heures	PS3	> 651	> 530	> 1344	> 1712
	Acyclovir	> 1429	0	> 613	0
	Sulfate de dextran	> 868	> 641	> 3571	> 4545
	phycarine	0	0	0	0

5 - valeur non déterminée

Dans le tableau I sont réunies les valeurs des IT du PS3, de l'acyclovir, du sulfate de dextran et de la phycarine obtenues pour chacune des quatre souches virales, après des temps d'incubation de 48 et 72 heures.

- 10 L'examen des valeurs réunies dans le tableau I permet de conclure
- que le PS3 est aussi efficace que le sulfate de dextran sur toutes les souches étudiées pour des concentrations identiques (0,125 – 1250 µg/ml),
 - que l'acyclovir n'a aucune efficacité sur les souches HSV-1R et HSV-2R, contrairement au PS3 et
 - que la phycarine qui correspond à la forme non sulfatée du PS3 ne présente aucune activité anti-herpétique.
- 15

Au vu d'une part des résultats traduits par les figures 3 et 4 et d'autre part de ceux réunis au tableau I, il apparaît que le PS3 est efficace sur toutes les souches virales étudiées, avec des valeurs de CE₅₀ inférieures à 2 µg/ml après 48 heures de traitement et inférieures à 5 µg/ml après 72 heures de traitement.

20

Il est particulièrement intéressant de noter que le PS3 est efficace sur les souches résistantes à l'acyclovir qui est l'inhibiteur couramment utilisé chez les patients atteints d'herpès.

Une troisième série d'expériences a été réalisée afin de déterminer le
5 mécanisme d'action du PS3.

Chaque étape du cycle de réplication du virus peut constituer une cible thérapeutique pour combattre le virus.

On a testé les susdites suspensions virales HSV-1, HSV-1R, HSV-2 et HSV-2R définies par une MOI de 0,01 DI_{50} /cellule pour une concentration
10 cellulaire de 350 000 cellules/ml.

Les produits de référence utilisés dans cette série d'expériences sont l'acyclovir et le sulfate de dextran mis en œuvre à des concentrations comprises entre 0,05 et 5 μ g/ml. Les concentrations de PS3 sont de 0,125 à 1250 μ g/ml. Les expériences sont réalisées dans des plaques à microtitration de 96 puits.

15 Pour vérifier si le PS3 protège une culture cellulaire lorsqu'il est mis en œuvre avant son infection par les susdites souches virales, on procède de la façon suivante.

Des cellules Vero sontensemencées à une densité cellulaire de $3,5 \cdot 10^4$ cellules/puits dans 100 μ l de milieu MEM contenant 8% de SVF.

20 Une solution de 50 μ l de PS3 ou de produit de comparaison, c'est-à-dire d'acyclovir ayant une concentration donnée est ajoutée à chaque puits complété de 50 μ l de milieu MEM avec 8% de SVF.

La plaque de microtitration comportant les cellules traitées avec le PS3 ou le produit de référence est placée dans une étuve à 37°C pendant 6, 12 ou 24
25 heures. Les cellules sont ensuite lavées par 100 μ l de milieu MEM afin d'enlever le PS3 ou le produit de référence.

Un volume de 50 μ l d'une suspension virale sont ajoutés dans chaque puits, ainsi que 50 μ l de milieu MEM avec 8% de SVF ; on maintient les plaques pendant 1 heure à 4°C.

30 Les cellules infectées sont ensuite placées dans une étuve à 37°C pendant 48 ou 72 heures.

La viabilité des cellules est évaluée dans chaque puits par coloration par le rouge neutre selon la méthode décrite plus haut.

Au vu des résultats obtenus, on peut conclure que les cellules prétraitées avant l'infection avec du PS3 ou de l'acyclovir ne sont protégées contre aucune
5 des souches étudiées.

Le PS3 ne protège donc pas les cellules de l'infection virale.

Pour déterminer si le PS3 a un effet virucide, on procède de la façon suivante.

Des cellules Vero sontensemencées 24 heures, avant l'essai, à une densité
10 cellulaire de $3,5 \cdot 10^4$ cellules/puits d'une plaque de microtitration dans 100 μ l de milieu MEM contenant 8% de SVF.

Le jour de l'essai, 50 μ l de chacune des suspensions virales identifiées plus haut sont traités avec 50 μ l de PS3 ou de produit de référence (acyclovir) ayant une concentration donnée pendant une heure à 37°C.

15 Une quantité de 100 μ l du mélange de cette suspension virale à laquelle a été ajouté le PS3 ou le produit de référence est introduite dans chaque puits de la plaque de microtitration. On maintient pendant une heure à 4°C.

Il est à noter que des témoins de la croissance des cellules et des virus sont réalisés simultanément.

20 Les plaques contenant les cellules infectées sont ensuite placées dans une étuve à 37°C pendant 48 ou 72 heures.

L'effet virucide du PS3 est évalué par la mesure des valeurs CE_{50} déterminées selon la méthode décrite plus haut.

Les figures 6 et 7 donnent les CE_{50} du PS3 sur les différentes souches pour
25 des temps d'incubation de 48 et 72 heures respectivement, le produit de comparaison étant l'acyclovir.

Si le PS3 avait une activité virucide, les valeurs CE_{50} (illustrées par les figures 6 et 7) devraient être inférieures à celles obtenues lors des évaluations d'activité anti-herpétique (illustrées par les figures 3 et 4). L'examen des résultats
30 réunis dans ces figures 6 et 7 montre que les valeurs de CE_{50} sont comparables à

celles obtenues lors des évaluations d'activité anti-herpétique. Le PS3 n'a donc aucun effet virucide sur les souches étudiées.

Pour déterminer à quel moment il convient de mettre le PS3 en oeuvre, on procède de la façon suivante.

5 Des cellules Vero sontensemencées à une densité cellulaire de $3,5 \cdot 10^4$ cellules/puits d'une plaque de microtitration à 96 puits dans 100 μ l de milieu MEM contenant 8% de SVF puis infectées par mise en contact avec les différentes souches virales identifiées plus haut pendant 1 heure à 4°C.

10 Les cellules infectées sont lavées avec un tampon salin afin d'éliminer les particules virales n'ayant pas été adsorbées.

Les cellules infectées sont ensuite traitées avec du PS3 ou avec le produit de comparaison :

- soit au moment de l'infection,
- soit 1, 2, 3 et 5 heures après l'infection.

15 Dans chaque cas on a maintenu les plaques de microtitration à 37°C pendant 72 heures. Ensuite on a déterminé l'effet inhibiteur du PS3 ou du produit de comparaison, ici l'acyclovir, pour chaque souche virale.

La figure 8 montre les valeurs de CE_{50} du PS3 en fonction du moment de mise en contact du PS3 avec les cellules.

20 Les résultats mettent en évidence que le PS3 est particulièrement efficace sur les souches virales HSV-1R et HSV-2R même lorsqu'il est mis en oeuvre 3 heures après l'infection. L'acyclovir n'a aucun effet sur les souches virales HSV-1R et HSV-2R.

25 Même si l'effet inhibiteur du PS3 sur les quatre souches virales est confirmé, les résultats révèlent que la présence du PS3 au tout début de l'infection permet de conserver une efficacité à de faibles concentrations. Le PS3 est d'autant plus efficace qu'il est introduit tôt, c'est-à-dire au tout début de l'infection.

Afin de déterminer si le PS3 a un effet sur l'adsorption virale, on procède de la façon suivante.

30 Des cellules Vero sontensemencées 24 heures avant l'essai à une densité cellulaire de $3,5 \cdot 10^4$ cellules/puits d'une plaque de microtitration à 96 puits

dans 100 µl de milieu MEM contenant 8% de SVF. On a testé les suspensions virales HSV-1, HSV-1R, HSV-2 et HSV-2R définies par une MOI de 0,01 DI_{50} /cellule pour une concentration cellulaire de 350 000 cellules/ml.

Le jour de l'essai, les cellules sont soumises à trois traitements différents désignés par A, B et C :

Selon le traitement A, les cellules traitées par 50 µl de PS3 ou de produit de comparaison (acyclovir) d'une concentration donnée sont infectées par 50 µl d'une des suspensions virales identifiées plus haut pendant une heure à 4°C.

Les cellules infectées sont ensuite lavées par 100 µl de tampon salin afin d'éliminer le PS3 ou le produit de référence ainsi que les particules virales n'ayant pas été adsorbées par les cellules.

Après avoir complété chaque puits par suffisamment de milieu MEM contenant 8% de SVF pour arriver à un volume de 200 µl, les cellules sont ensuite placées dans une étuve à 37°C pendant 72 heures.

Selon le traitement B, les cellules sont mises en contact avec l'une des suspensions virales identifiées plus haut pendant 1 heure à 4°C. Les cellules infectées sont ensuite lavées par 100 µl de tampon salin afin d'éliminer les particules virales n'ayant pas été adsorbées. Les cellules sont ensuite traitées pendant 72 heures par différentes concentrations de PS3 ou du produit de référence dans un volume total de 200 µl par puits.

Selon le traitement C, les cellules traitées par 50 µl de PS3 ou de produit de référence d'une concentration donnée sont infectées par 50 µl de l'une des suspensions virales identifiées plus haut pendant une heure à 4°C. Les cellules infectées sont ensuite lavées par 100 µl de tampon salin afin d'éliminer le PS3 ou le produit de référence ainsi que les particules virales n'ayant pas été adsorbées. Les cellules sont ensuite remises en contact pendant 72 heures avec les différentes concentrations de PS3 ou du produit de référence dans un volume total de 200 µl par puits.

Pour ces 3 traitements, l'effet inhibiteur du PS3 et du produit de référence (exprimé en CE_{50}) sur l'adsorption des quatre susdites souches virales est évalué après 72 heures par la mesure des valeurs CE_{50} selon la méthode décrite plus haut.

La figure 9 montre les CE_{50} du PS3 déterminées pour les quatre susdites souches virales identifiées plus haut après des temps d'incubation de 48 et 72 heures respectivement, le produit de comparaison étant l'acyclovir.

L'examen de cette figure 9 montre que les valeurs de CE_{50} du PS3 sont très basses lors du traitement C, en particuliers pour les souches ayant développé une résistance à l'acyclovir.

En effet, on observe des valeurs de CE_{50} du PS3 de 3,84 $\mu\text{g/ml}$ pour la souche HSV-1, de 5,54 $\mu\text{g/ml}$, pour la souche HSV-1R, de 0,24 $\mu\text{g/ml}$ pour la souche HSV-2 et 0,30 $\mu\text{g/ml}$ pour la souche HSV-2R.

Par conséquent, le PS3 a un effet inhibiteur sur les 4 souches virales uniquement lors du traitement C c'est-à-dire lorsque le PS3 est présent au moment et après l'adsorption virale. Le PS3 exerce donc une activité antivirale dans la première phase de l'infection virale.

Pour déterminer si le PS3 a un effet sur la pénétration virale, on procède de la façon suivante.

Des cellules Vero sontensemencées à une densité cellulaire de $3,5 \cdot 10^4$ cellules/puits d'une plaque de microtitration dans 100 μl de milieu MEM contenant 8% de SVF.

Après 24 heures, les cellules confluentes sont mises en contact avec 50 μl d'une suspension virale pendant 1 heure à 4°C .

Le tapis cellulaire est ensuite incubé avec différentes concentrations de PS3 (0,125 – 1250 $\mu\text{g/ml}$) ou de produit de référence, ici l'acyclovir (0,005 – 5 $\mu\text{l/ml}$), à 37°C afin de faciliter la pénétration des virus.

Après des temps d'incubation de 15, 30 et 60 minutes, les cellules correspondantes sont lavées avec 100 μl de PBS puis traitées pendant 1 minute par 0,5 mg/ml de protéinase K (Sigma) en solution dans du PBS afin d'éliminer tous les virus extracellulaires non adsorbés.

Ce traitement est arrêté par addition de 1 mM de phénylméthylsulfonyl fluoride (Sigma) en solution dans du PBS contenant 3% de SVF.

Les cellules sont ensuite lavées par 100 µl de PBS par puits et remises en culture à 37°C dans 200 µl de MEM complété de 8% de SVF.

5 Des témoins de la croissance des cellules et des virus sont menés simultanément. Après 48 heures d'incubation, on vérifie si le PS3 et l'acyclovir ont un effet sur la pénétration du virus en ayant recours à la méthode du rouge neutre.

10 Les résultats obtenus montrent que le PS3 n'a pas d'activité anti-virale au niveau de la pénétration du virus dans la cellule dans le cas des quatre souches virales.

On a réuni dans le tableau (II) les résultats obtenus dans les expériences qui viennent d'être décrites en rapport avec les quatre souches virales identifiées plus haut.

15

TABLEAU II

	PS3 Souches virales étudiées : HSV-1, HSV-2, HSV-1R, HSV-2R	Acyclovir Souches non résistantes HSV-1 et HSV-2
Effet avant infection	non	non
Effet virucide	non	non
Effet en rapport avec le moment d'addition	Peu efficace après l'infection	Efficace jusqu'à 5 heures après l'infection
Effet sur l'adsorption	<u>oui</u>	non
Effet sur la pénétration	non	non

20 En conclusion, le PS3 présente une activité antivirale à l'égard des quatre souches virales testées, HSV-1, HSV-1R, HSV-2, HSV-2R en agissant plus particulièrement sur l'adsorption des virus sur les cellules ; il est efficace lorsqu'il est présent dès le début de l'infection.

Il est particulièrement important de souligner que le PS3 présente un effet anti-herpétique à l'égard des souches virales résistantes à l'acyclovir.

L'invention vise donc tout particulièrement l'utilisation du PS3 pour la préparation d'un médicament pour un traitement contre les souches d'herpèsvirus
5 résistantes à l'égard des inhibiteurs du type analogue nucléosidique, et en particulier à l'égard de l'acyclovir.

Chez les individus immunocompétents, le développement d'une infection herpétique causée par des souches de virus résistant à l'acyclovir est très rare.

En revanche, dans le cas des individus immunodéficients, ce risque de
10 développer des infections herpétiques causées par des souches résistantes aux analogues nucléosidiques est plus grand.

Les individus immunodéficients sont ceux qui sont soumis à une thérapie immunodépressive, ceux qui ont subi une transplantation d'organes, ainsi que ceux atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) ou encore ceux qui
15 présentent des grandes altérations de la peau tels que les grands brûlés.

On a également recherché une éventuelle toxicité in vivo du polysaccharide sulfaté utilisé conformément à l'invention.

Cette étude a été réalisée sur des lapins blancs de race New Zealand et sur
20 des rats de race Sprague Dawley.

Les lapins blancs ont été soumis d'une part au test d'irritation oculaire et d'autre part au test d'irritation cutanée primaire.

A l'issue du premier de ces tests il a été conclu à une action légèrement irritante et dans le deuxième à une action non irritante.

25 Les rats ont été soumis d'une part à une étude de détermination de la toxicité dermique aigue et d'autre part à une étude de détermination de la toxicité orale aigue.

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.

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
5 réalisées sous la direction du Docteur R. SHRIVASTAVA au Service de Toxicologie de l'établissement dénommé

Elevage Scientifique des Dombes (ESD)

ROMANS

01400 CHATILLON SUR CHALARONNE

10

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 et 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.

15 La laminarine sulfatée testée provenait du lot PS3 8/2001 fourni par les Laboratoires Goëmar.

Les rapports correspondants sont conservés dans les archives de la Société Demanderesse.

Suivant un mode de réalisation avantageux, le polysaccharide de formule I,
20 plus particulièrement le polysaccharide sulfaté de formule I et, de préférence, la laminarine sulfatée et les oligosaccharides de degré de polymérisation de 11 à 28 obtenus à partir de la laminarine sulfatée sont utilisés pour la préparation d'un médicament pour les traitements contre les herpèsvirus, plus particulièrement contre les alpha herpèsvirus, et notamment contre les HSV-1 et HSV-2, ainsi que
25 contre des souches de ces virus qui sont résistantes aux agents antiviraux déjà connus, essentiellement par voie générale et de préférence par les voies orale, rectale, pulmonaire topique (incluant les voies transdermale, buccale et sublinguale) et parentérale (incluant les voies sous-cutanées intramusculaire, intraveineuse, intra-dermale et intra-vitréale).

La dose quotidienne est généralement de 0,01 à 250 mg par kilo de 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, 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 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 du groupe comprenant les inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs non-nucléosidiques d'une enzyme virale d'un herpèsvirus.

A titre d'exemples non limitatifs, correspondant à des modes de réalisation avantageux, on indique ci-après quelques formulations pharmaceutiques à base du médicament obtenu conformément à l'invention.

20

25 1 – Composition d'une crème

Eau déminéralisée	69,7%
Glycérine	5,0%
Sulfate de laminarine	1,0%
30 PEG 100 stéarate	4,0%
Alcool cétéarylique	2,0%

	Conservateur	1,0%
	PEG 40 stéarate	3,0%
	Acétate de vitamine E	0,5%
	C – 12-15 alkyl benzoate	6,5%
5	Caprylic/capric triglycerides	5,5%
	NaOH 0,1 N	1,8%
		<hr/>
		100%

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

2 – Composition d'une solution pour aérosol

	Sulfate de laminarine	2,5%
15	Chlorure de sodium	9,0%
	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.

20

3 – Composition d'un suppositoire

	Sel de potassium de sulfate d'oligo β 1-3 glucan	5,0%
	Glycérines hémisynthétiques solides	95,0%
25		

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

4 – Composition d'une solution injectable

	Sel de sodium de sulfate d'oligolaminaritol (DP20)	5,0%
	Bicarbonate de sodium	3,0%
30	Eau ppi	92,0%

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

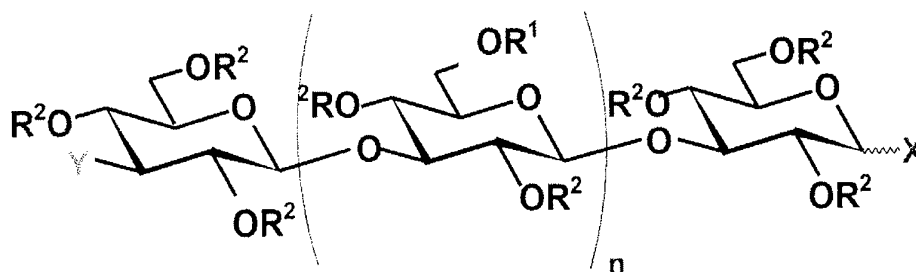
5 5 – Composition d'une solution vaginale (flacon unidose de 140 ml avec canule)

	Sel de sodium de sulfate d'oligo β 1-3 glucan	0,1%
	Chlorure de sodium	9,0%
	Alcool éthylique à 95°	5,0%
10	Arôme rose	0,2%
	Eau purifiée	84,7%
	Conservateurs (chlorure de benzalkonium)	0,2%
	Edétate de sodium	0,3%
	Polysorbate 20	0,5%
15		_____
		100%

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

REVENDICATIONS

1. Utilisation pour la préparation d'un médicament pour les traitements
 5 contre les herpèsvirus, plus particulièrement contre les alpha herpèsvirus, et
 notamment contre les HSV-1 et HSV-2, ainsi que contre des souches de ces virus
 qui sont résistantes aux agents antiviraux déjà connus, des représentants d'une
 famille de polysaccharides, représentée par la formule



- dans laquelle R_1 et R_2 peuvent être soit identiques et représentent alors un
 10 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
 β de type β -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, ledit médicament agissant notamment par inhibition de l'adsorption des
 15 virus en question sur la cellule hôte.

2. Utilisation selon la revendication 1, au titre de polysaccharide de
 formule I, de la laminarine sulfatée ayant un degré de sulfatation supérieur à 2 et
 de préférence de 2,2 à 2,4.

3. Utilisation selon la revendication 1, au titre de polysaccharide de
 20 formule I, du phosphate de laminarine ayant un degré de phosphatation supérieur
 à 1 et de préférence de 1,5 à 2,5.

4. Utilisation selon la revendication 2 d'un oligosaccharide, obtenu à partir de la laminarine sulfatée de degré de sulfatation supérieur à 2 et de préférence de 2,2 à 2,4, le degré de polymérisation de cet oligosaccharide étant de 11 à 28.

5. Utilisation selon la revendication 3 d'un oligosaccharide, obtenu à partir du phosphate de laminarine de degré de phosphatation supérieur à 1 et de préférence de 1,5 à 2,5, le degré de polymérisation de cet oligosaccharide étant de 11 à 28.

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5 d'un polysaccharide de formule I, plus particulièrement de la laminarine sulfatée ayant un degré de sulfatation supérieur à 2 et de préférence de 2,2 à 2,4 pour la préparation d'un médicament pour les traitements contre les alpha herpèsvirus, et notamment contre les HSV-1 et HSV-2, tout particulièrement destiné aux individus immunodéficients, plus particulièrement à des individus transplantés, des individus atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise ou des individus qui présentent des grandes altérations de la peau, et notamment les grands brûlés.

7. Composition pharmaceutique comprenant au titre de substance active une quantité efficace d'au moins l'un des polysaccharides de formule I utilisé selon l'une des revendications 1 à 5, et plus particulièrement la laminarine sulfatée ayant un degré de sulfatation supérieur à 2 et de préférence de 2,2 à 2,4, ainsi qu'une quantité efficace d'au moins l'un des composés du groupe comprenant les inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs non-nucléosidiques d'une enzyme virale d'un herpèsvirus.

1/6

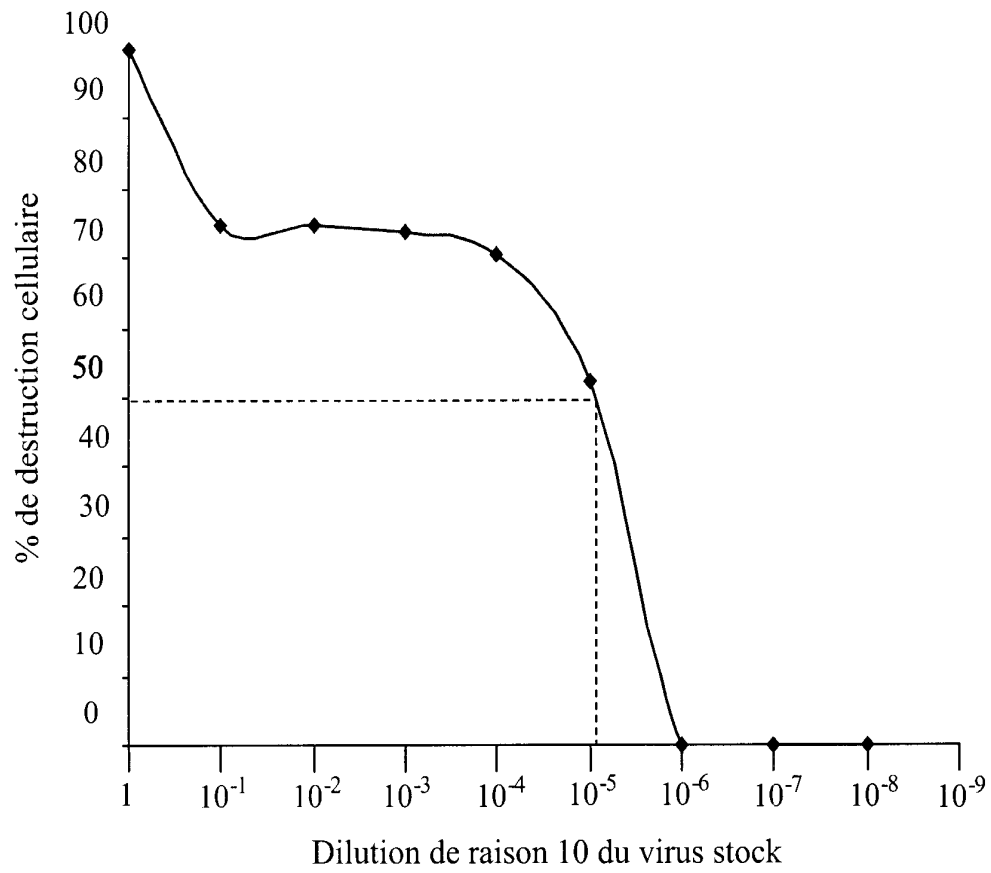


FIG. 1

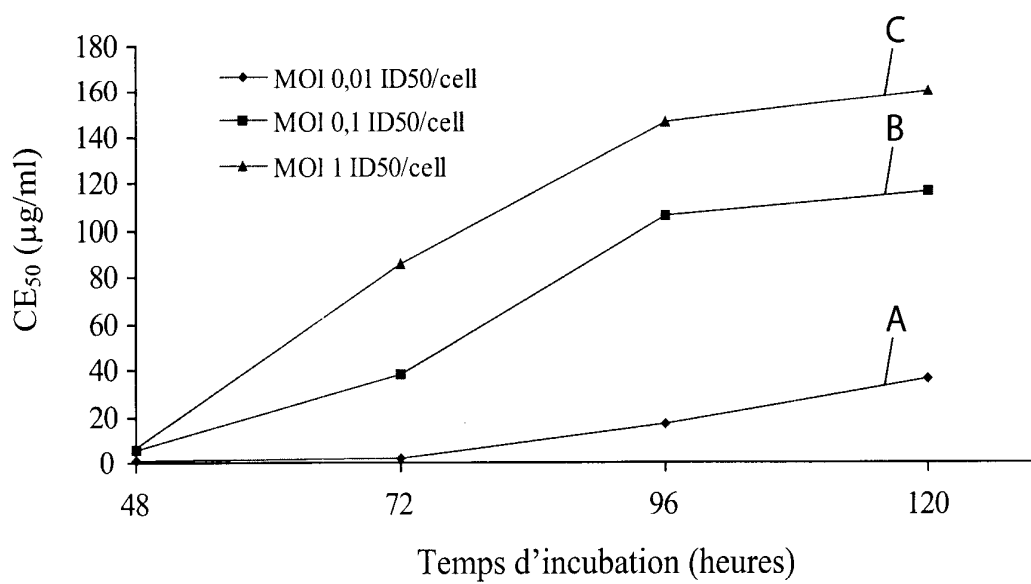


FIG. 2

2/6

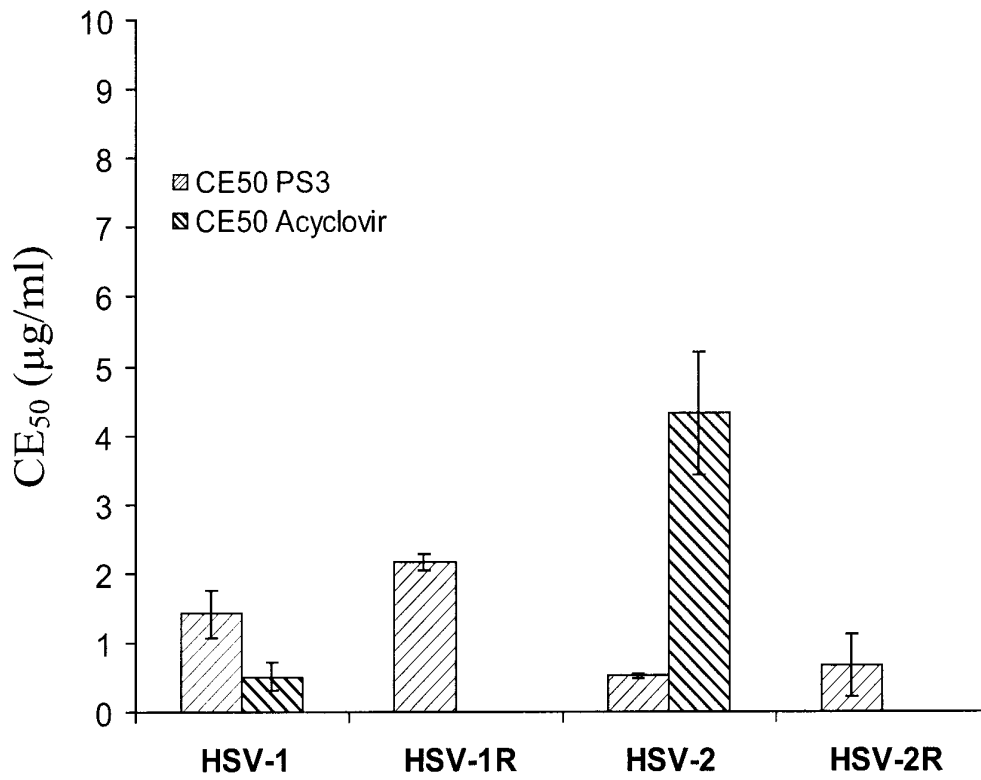


FIG. 3

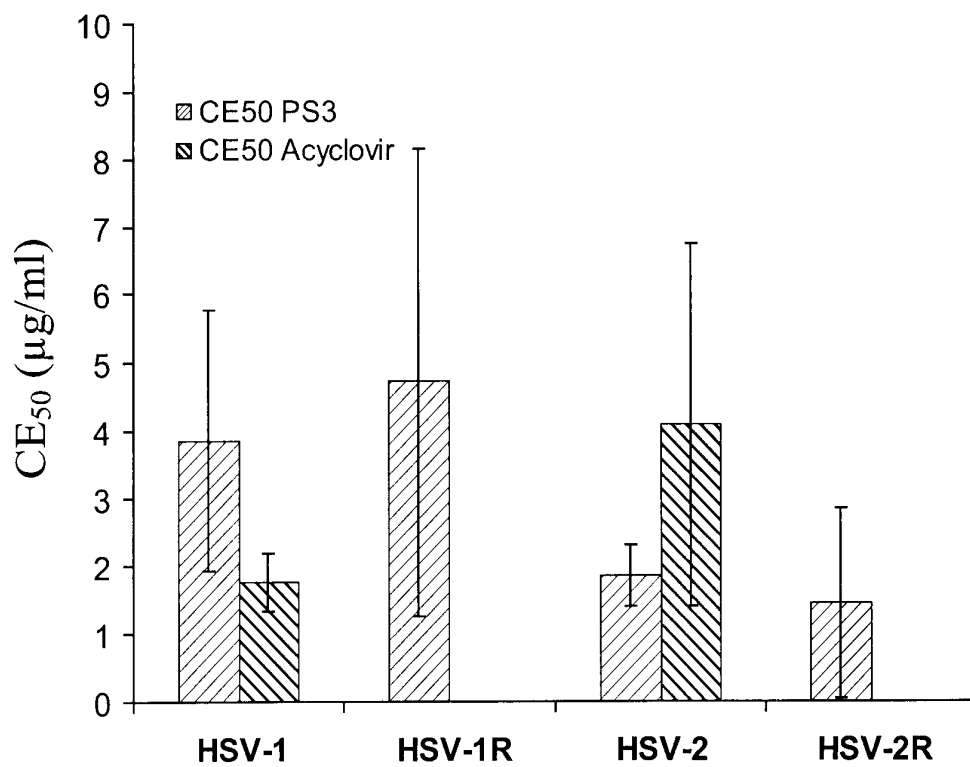


FIG. 4

3/6

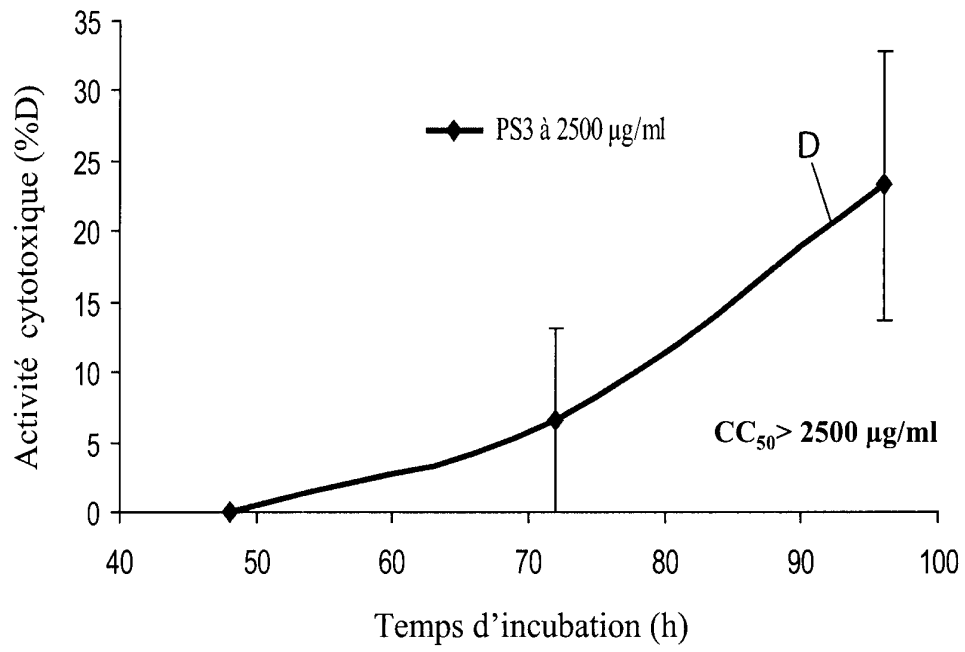


FIG. 5

4/6

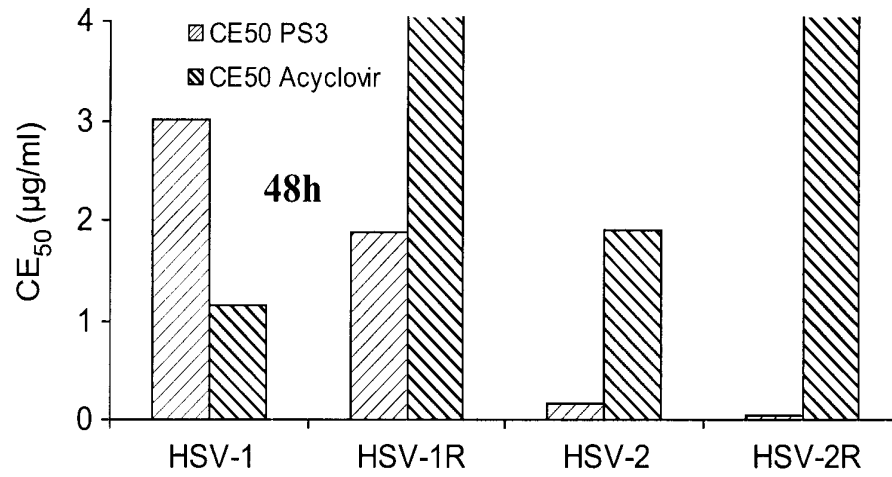


FIG. 6

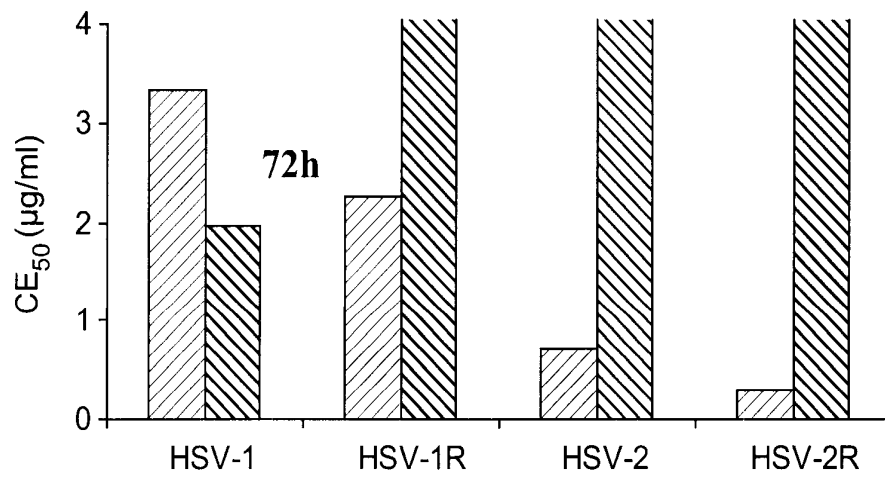


FIG. 7

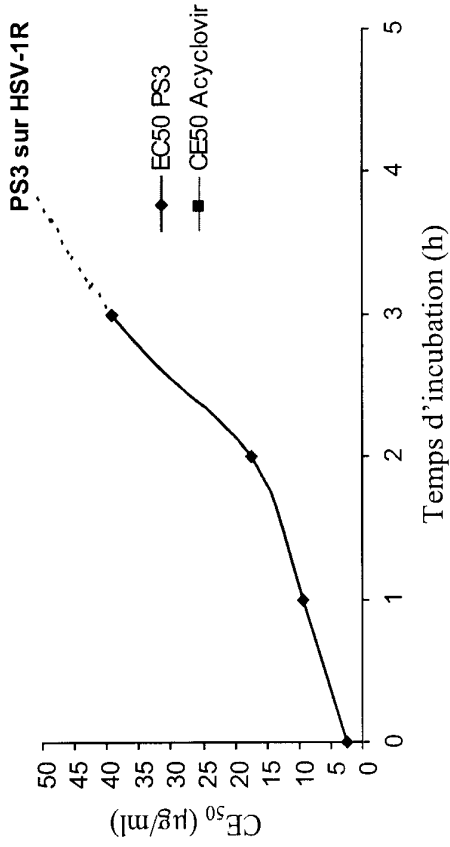


FIG. 8B

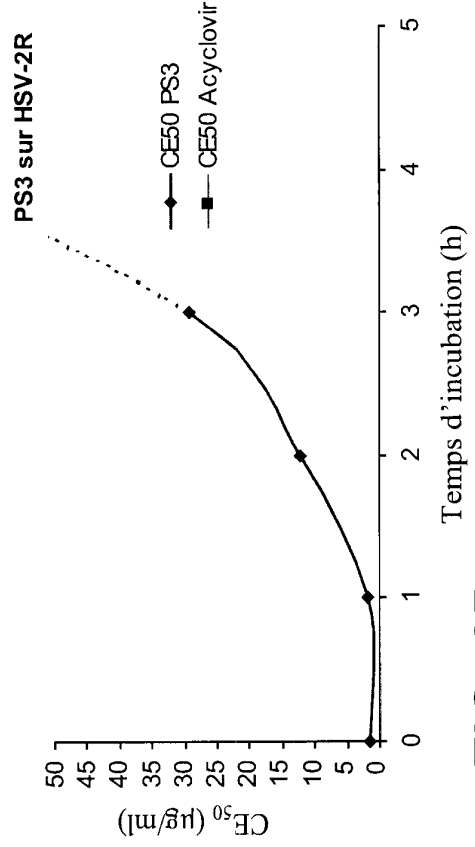


FIG. 8D

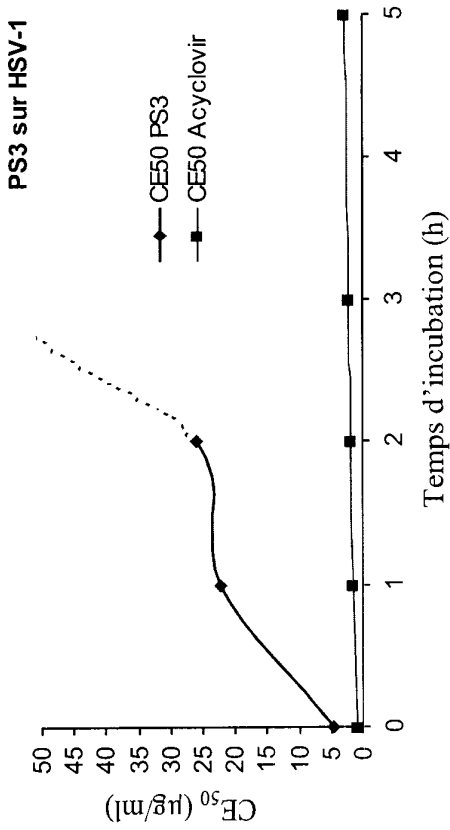


FIG. 8A

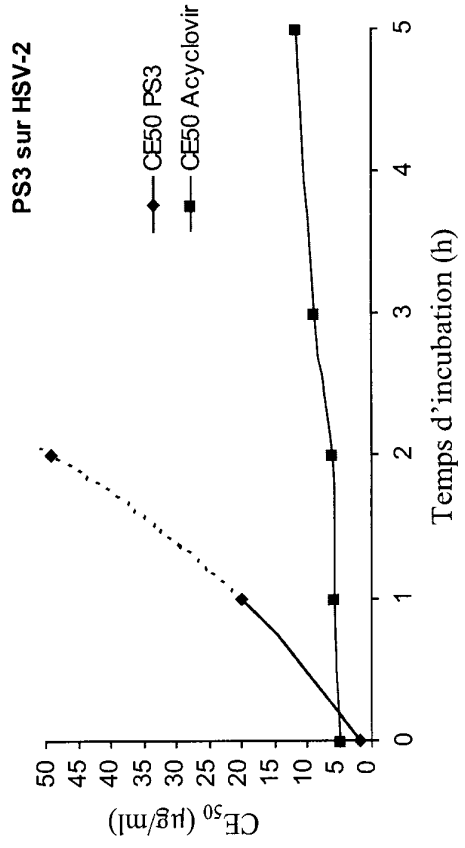


FIG. 8C

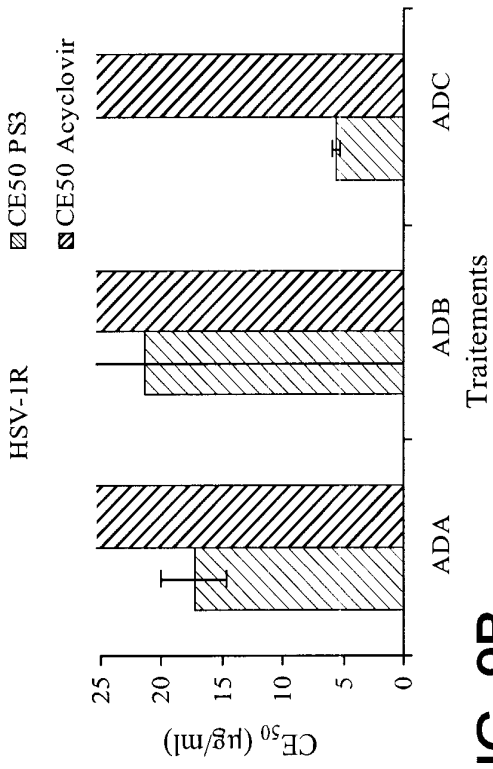


FIG. 9B

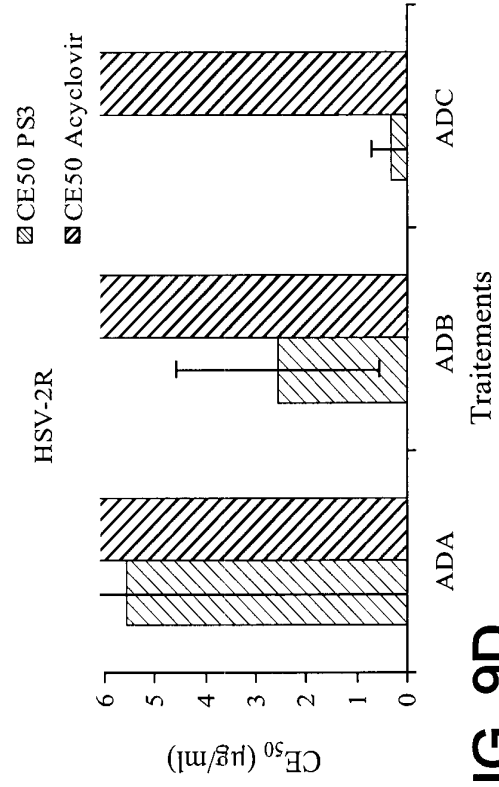


FIG. 9D

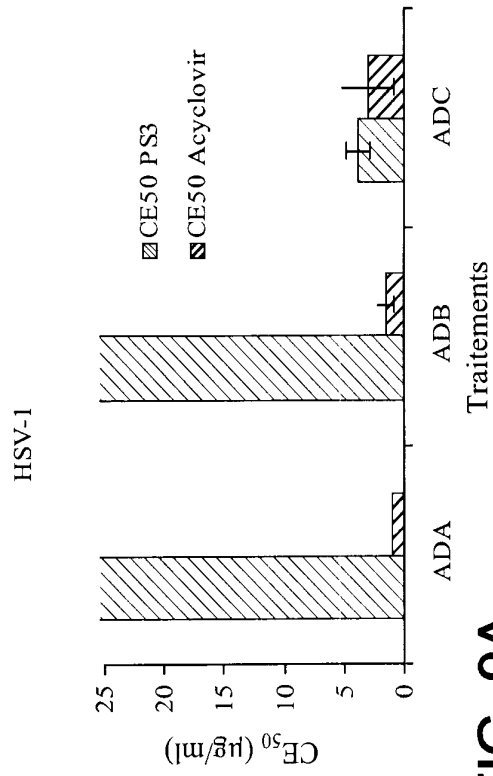


FIG. 9A

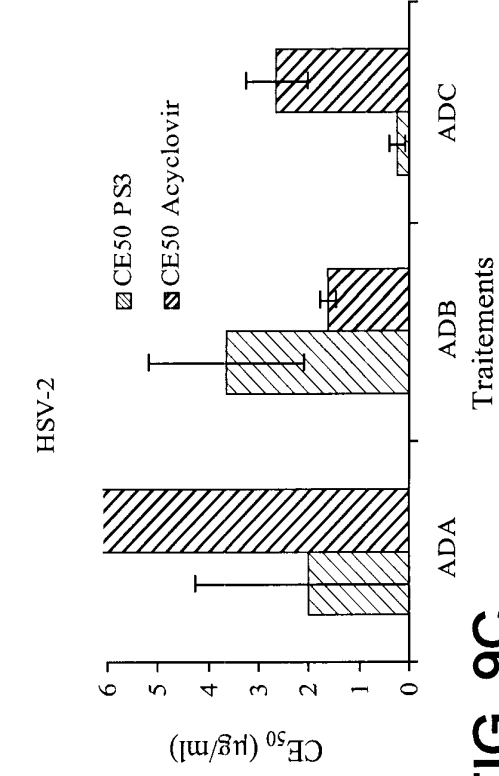


FIG. 9C



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 681490
FR 0603990

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,Y	BABA M ET AL: "SULFATED POLYSACCHARIDES ARE POTENT AND SELECTIVE INHIBITORS OF VARIOUS ENVELOPED VIRUSES INCLUDING HERPES SIMPLEX VIRUS CYTOMEGALOVIRUS VESICULAR STOMATITIS VIRUS AND HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 32, no. 11, 1988, pages 1742-1745, XP002413849 ISSN: 0066-4804 * tableau 1 * * page 1744, colonne 2, alinéa 2 * * page 1742, colonne 1, ligne 14 - ligne 15 *	1-7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61K
Y	WO 95/24907 A2 (HADASIT MED RES SERVICE [IL]; WHALLEY KEVIN [GB]; VLODAVSKY ISRAEL [IL]) 21 septembre 1995 (1995-09-21) * page 5, alinéa 1 * * page 2, dernier alinéa - page 3, alinéa 1 * * page 4, dernier alinéa *	1-7	
Y	HASHIMOTO K ET AL: "Antiviral activity of a sulphated polysaccharide extracted from the marine Pseudomonas and marine plant Dinoflagellata against human immunodeficiency viruses and other enveloped viruses" ANTIVIRAL CHEMISTRY AND CHEMOTHERAPY, vol. 7, no. 4, 1996, pages 189-196, XP009076780 ISSN: 0956-3202 * le document en entier *	1-7	
----- -/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
29 janvier 2007		Giacobbe, Simone	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 3



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 681490
FR 0603990

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	KATSURAYA K ET AL: "SYNTHESIS OF SULFATED ALKYL MALTO- AND LAMINARA-OLIGOSACCHARIDES WITH POTENT INHIBITORY EFFECTS ON AIDS VIRUS INFECTION" CARBOHYDRATE RESEARCH, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHING COMPANY. AMSTERDAM, NL, vol. 260, no. 1, 1994, pages 51-61, XP008042468 ISSN: 0008-6215 * le document en entier * * page 52, alinéa 3 * -----	1-7	
Y	SHIEH M T ET AL: "Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans." THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY. MAR 1992, vol. 116, no. 5, mars 1992 (1992-03), pages 1273-1281, XP002413851 ISSN: 0021-9525 * le document en entier * -----	1-7	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		29 janvier 2007	Giacobbe, Simone
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 3

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0603990 FA 681490**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 29-01-2007

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
WO 9524907	A2	21-09-1995	AU 1856795 A	03-10-1995
