

(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
26 octobre 2012 (26.10.2012)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/143141 A2

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 31/192 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2012/001720

(22) Date de dépôt international :
20 avril 2012 (20.04.2012)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
FR 1101253 21 avril 2011 (21.04.2011) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE** [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75338 Paris Cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **SLAMA SCHWOK, Anny** [FR/FR]; 1 Jardin des Tilleuls, F-91190 Saint Auban (FR). **DELMAS, Bernard** [FR/FR]; 14 Rue Elie le Gallais, F-92340 Bourg-la-Reine (FR). **QUIDEAU, Stéphane** [FR/FR]; 23 Avenue de Lattre de Tassigny, F-33400 Talence (FR). **BERTRAND, Hélène** [FR/FR]; 20 Boulevard Saint Marcel, F-75005 Paris (FR). **TARUS, Bogdan** [RO/FR]; 19 Rue Jean-Claude Ponsard, F- 57950 Montigny Les Metz (FR).

(74) Mandataire : **BARBOT, Willy**; Cabinet Simodoro-ip, Parc Cézanne II, Bat. G., 290 Avenue Galilée, F-13857 Aix-en-Provence Cedex 3 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : ANTIVIRAL COMPOSITIONS DIRECTED AGAINST THE INFLUENZA VIRUS NUCLEOPROTEIN

(54) Titre : COMPOSITIONS ANTIVIRALES DIRIGÉES CONTRE LA NUCLEOPROTEINE DES VIRUS INFLUENZA

(57) Abstract : The invention relates to a pharmaceutical composition intended for the treatment of a viral infection by an influenza type A virus in an individual, which composition comprises a compound having the property of acting as an inhibitor of the binding of the viral RNA to the nucleoprotein of influenza type A viruses, said compound having the property of binding to the viral-RNA-binding domain on said nucleoprotein. The invention also relates to a pharmaceutical composition intended for the treatment of a viral infection by an orthomyxovirus in an individual, which composition comprises a compound having the property of acting as an inhibitor of the binding of the viral RNA to the nucleoprotein of orthomyxoviruses, said compound having the property of binding to the viral-RNA-binding domain on the nucleoprotein of said viruses. The invention also relates to a compound having the property of acting as an inhibitor of the binding of the viral RNA to the nucleoprotein of influenza type A viruses, said compound having the property of binding to the viral-RNA-binding domain on the nucleoprotein of influenza type A viruses and to a method for identifying a compound having the property of binding at the level of the viral-RNA-binding domain on the nucleoprotein of influenza type A viruses.

(57) Abrégé : L'invention porte sur une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un virus Influenza de type A chez un sujet, laquelle composition comprend un composé ayant la propriété d'agir en tant qu'inhibiteur de la fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine des virus Influenza de type A, ledit composé ayant la propriété de se lier au domaine de liaison de l'ARN viral sur ladite nucléoprotéine. L'invention porte également sur une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un Orthomyxo virus chez un sujet, laquelle composition comprend un composé ayant la propriété d'agir en tant qu'inhibiteur de la fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine des Orthomyxovirus, ledit composé ayant la propriété de se lier au domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine desdits virus. L'invention porte en outre sur un composé ayant la propriété d'agir en tant qu'inhibiteur de la fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine des virus Influenza de type A, ledit composé ayant la propriété de se lier au domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine des virus Influenza de type A et sur un procédé d'identification d'un composé ayant la propriété de se lier au niveau du domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine des virus Influenza de type A.



WO 2012/143141 A2

COMPOSITIONS ANTIVIRALES DIRIGÉES CONTRE LA NUCLEOPROTEINE DES VIRUS INFLUENZA

La présente demande de brevet revendique la priorité de la demande de brevet français
5 FR11/01253 déposée le 21 avril 2011 dont le contenu est incorporé ici par référence.

Art antérieur

La présente invention concerne des compositions pharmaceutiques comprenant des
composés inhibiteurs de la fixation de l'ARN viral aux nucléoprotéines des virus Influenza A,
l'utilisation desdites compositions pour le traitement d'infection par un virus Influenza de
10 type A ainsi qu'une méthode d'identification de tels composés inhibiteurs.

Les virus de la grippe, à savoir les virus Influenza, sont responsables chaque année de
nombreuses infections touchant les voies respiratoires et allant jusqu'à tuer entre 250 000 et
500 000 personnes dans le monde. Outre les souches saisonnières, de nouvelles souches ont
émergé au cours de ces dernières années : le virus Influenza A H1N1 qui a émergé chez le
15 porc a provoqué une pandémie relativement importante en 2009 entraînant toutefois une
faible mortalité. La souche Influenza A H5N1, plus communément connu sous le nom de
« grippe aviaire », ayant émergé chez les races animales aviaires, est apparue particulièrement
pathogène, l'infection s'étendant aux humains avec un taux de mortalité atteignant les 60%.

Les virus Influenza responsables de la grippe sont des virus à ARN simple brin
20 appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae* et constituant le genre Influenza virus. Ce
genre est réparti en trois types de virus Influenza A, B ou C, le type dépendant des
caractéristiques antigéniques de certaines protéines desdits virus et n'infectant pas les mêmes
hôtes.

Les virus Influenza de type A ont la capacité d'infecter différentes espèces animales,
25 notamment les mammifères et les oiseaux, et possèdent un fort pouvoir pathogène. Ils
présentent la particularité d'être subdivisés en différents sous-types dépendant des protéines
de surface hémagglutinines (HA) et neuraminidases (NA) qu'ils présentent. A ce jour, 16
hémagglutinines (H1 à H16) et 9 neuraminidases (N1 à N9) ont été identifiées.

Ces virus sont structuralement constitués de 8 segments d'ARN simple brin de polarité
30 négative dans une capsid virale elle-même protégée par une enveloppe phospholipidique.
Ces 8 segments d'ARN codent pour les différentes protéines virales nécessaires à la
transcription des segments d'ARN à polarité négative en fragments d'ARN à polarité positive

mais aussi nécessaires à la réplication virale, à savoir les nucléoprotéines qui s'associeront chacune à un fragment d'ARN ainsi que les protéines PA, PB1 et PB2 formant un complexe polymérase ribonucléoprotéique. Sont également encodés par ces derniers les protéines structurales du virus telles que les protéines de l'enveloppe (neuraminidase et hémagglutinine) mais aussi les protéines M1 et M2 se situant sous ou dans l'enveloppe virale pour maintenir la structure des virus ainsi que les protéines non structurales NS1 et NS2.

Les fragments ARN des virus Influenza ayant une polarité négative, ils doivent être transcrits en des fragments d'ARN messagers à polarité positive par des enzymes virales ARN polymérase ARN-dépendante en vue d'une réplication virale. Les fragments ARN à polarité positive servent alors d'ARN messagers nécessaires à la traduction protéique.

L'infection de cellules hôtes par virus Influenza A et la propagation des virions produits par lesdites cellules est assurée par l'activité de deux protéines de l'enveloppe virale: l'hémagglutinine et la neuraminidase.

L'hémagglutinine HA est une glycoprotéine trimérique constituée de deux sous-unités HA1 et HA2 possédant des sites de fixation spécifiques à certains récepteurs pour l'attachement du virus à la cellule hôte et la libération du génome viral dans le cytoplasme de ladite cellule hôte. L'hémagglutinine est en effet responsable de l'attachement du virus à la cellule cible au niveau de l'acide sialique, également appelé acide N-acétyl-neuraminique, terminal des chaînes des glycoprotéines ou glycolipides des récepteurs membranaires de la cellule hôte permettant ainsi l'entrée du virus dans la cellule par endocytose. Une fois que le virus a fusionné avec la membrane de la cellule hôte, le génome viral contenu dans la capsid est libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte.

La neuraminidase est également une protéine de surface des virus Influenza A. Bien que présente en moins grande quantité que l'hémagglutinine, son rôle n'en est pas moins complémentaire. En effet, la neuraminidase possède une activité enzymatique responsable du clivage des liaisons osidiques formées entre l'hémagglutinine à la surface des virions et les résidus d'acide sialique de la membrane de la cellule hôte. Les virions nouvellement formés et attachés à la membrane de la cellule infectée peuvent donc être libérés, ceci évitant leur agrégation au niveau de la cellule hôte. Cette activité enzymatique facilite également le détachement des virions du mucus riche en acide sialique et présent au niveau de l'épithélium respiratoire.

Face à la virulence de certaines souches de virus Influenza A, telles que la souche H5N1, mais également face au grand nombre d'infections provoqués par les virus Influenza A responsables des grippes saisonnières entraînant un taux de mortalité non négligeable, il apparaît comme étant de plus en plus nécessaire de mettre au point des inhibiteurs de ces virus en vue d'une meilleure protection et d'un meilleur traitement de la population.

Les traitements actuels de la grippe consistent majoritairement en des antiviraux dirigés contre les protéines des virus influenza A.

L'Amantadine, distribué sous le nom MANTADIX®, permet d'inhiber la réplication du virus par fixation à la protéine M2, protéine-canal ionique de la capsidie des virus. Il permet également d'inhiber la fusion entre ladite capsidie et la membrane plasmique de la cellule hôte ainsi que le relargage du matériel génétique viral dans le cytoplasme de la cellule hôte.

La Rimantadine présente également une action d'inhibition de la fusion de la capsidie virale avec la membrane de la cellule hôte par inactivation de la protéine M2.

La neuraminidase est également une des cibles antivirales existantes avec notamment l'oseltamivir (sous le nom commercial TAMIFLU ®) et le zanamivir (RELENZA ®) inhibiteurs de ladite protéine présente en surface des virus.

D'autres inhibiteurs des virus Influenza et dirigés contre les ARN polymérases ARN-dépendante restent potentiellement utilisables mais interfèrent fréquemment avec les fonctions cellulaires de l'hôte et sont très peu spécifiques des virus Influenza. La Ribavirin est un de ces inhibiteurs. Outre le traitement des virus Influenza, elle est également utilisée pour le traitement d'infections au virus syncytial respiratoire ou le traitement de l'hépatite C.

Malheureusement, les virus Influenza développent de plus en plus de résistance à ces traitements antiviraux. Ces phénomènes de résistance sont dus à la grande plasticité génique que présentent les virus Influenza. Deux phénomènes sont impliqués dans l'apparition d'une forte variation du génome des virus : les glissements antigéniques, causés par des variations mineurs du génome résultant de substitution d'un ou plusieurs acides aminés sur une ou deux protéines (HA ou NA), ainsi que les sauts antigéniques, résultant de l'infection mixte de deux virus de type A différents dont les fragments sont recombinaisonnés.

Au cours de l'épidémie de grippe de 2008-2009, la quasi-totalité des virus saisonniers H1N1 circulant aux Etats-Unis s'est avérée résistante au TAMIFLU® et toutes les souches isolées de H3N2 étaient résistantes aux amantadines. Il a également été noté que la moitié des

individus infectés par le virus H5N1 sont morts malgré un traitement avec les deux classes d'antiviraux dirigés contre les protéines de surface des virus Influenza A. Il apparaît donc comme étant nécessaire de mettre au point au plus vite de nouveaux inhibiteurs des virus Influenza A capables de traiter les infections auxdits virus tout en étant moins sensibles aux phénomènes de variations géniques de ceux-ci.

Résumé de l'invention

Dans cette optique, les inventeurs ont identifié de nouveaux antiviraux ciblant la nucléoprotéine (NP) des virus Influenza A, laquelle protéine s'associe avec l'ARN viral ainsi qu'une ARN polymérase virale pour former le complexe ribonucléoprotéique responsable de la transcription et de la réplication virale.

Constitutive de la structure des virus, la nucléoprotéine des virus Influenza de type A est une protéine interne synthétisée à partir de l'ARN messager viral dans la cellule hôte, ce qui lui confère un taux de mutation nettement inférieur à celui des protéines de surface sujettes aux sauts et glissements antigéniques tels que décrits précédemment. Il a en effet été observé que les nucléoprotéines des virus de type H1 et H5 présentent un très fort taux d'identité (97%). Par ailleurs, la nucléoprotéine présente également l'avantage de ne pas être présente dans les cellules hôtes infectées par des virus. Ainsi, tout composé destiné à agir spécifiquement au niveau de la nucléoprotéine n'entraînera pas à priori d'interférence avec les mécanismes cellulaires ou les protéines de la cellule hôte.

Les inventeurs ont donc identifié des composés capables de se lier spécifiquement au niveau du domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine des virus Influenza de type A. La fixation de l'ARN viral sur la nucléoprotéine desdits virus n'est pas spécifiquement dépendante d'une séquence particulière. C'est la structure même de la protéine qui permet à l'ARN viral de se loger dans un sillon formé au niveau du centre de la nucléoprotéine pour former le complexe nucléoprotéique auquel se fixera l'ARN polymérase pour former le complexe ribonucléoprotéique.

Les inventeurs ont en effet démontré que l'utilisation de composés capables de se lier au niveau dudit domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine des virus Influenza de type A empêche la fixation dudit ARN sur la nucléoprotéine, et ce de manière compétitive. L'absence de fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine inhibe la formation du complexe

ribonucléoprotéique avec l'ARN polymérase, complexe nécessaire à la transcription et à la réplication virales.

En analysant la structure du domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine des virus Influenza ainsi que les portions protéiques à proximité dudit domaine, les inventeurs ont également mis en évidence une corrélation entre la fixation de l'ARN et l'oligomérisation de la nucléoprotéine ; ceci implique que des inhibiteurs capables d'empêcher la fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine des virus Influenza de type A entraîneront aussi une déficience au niveau de l'oligomérisation de la nucléoprotéine, étape nécessaire à la réplication virale.

L'utilisation de composés capable de se lier au domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine permet donc d'inhiber la réplication virale à deux niveaux par inhibition de la formation du complexe ribonucléoprotéique ainsi que par inhibition de l'oligomérisation de la nucléoprotéine.

Les antiviraux selon l'invention sont donc destinés à traiter des sujets infectés par un virus Influenza, notamment de type A grâce à un mécanisme d'action spécifique associé au site de fixation de l'ARN viral sur la nucléoprotéine dudit virus.

Par ailleurs, les antiviraux actuellement disponibles pour lutter contre les infections par certaines souches de virus Influenza de type A sont soumis aux contraintes de variabilité desdites souches du fait de mutations fréquentes au niveau des protéines de surface desdits virus. En plus d'être soumis à ces phénomènes de mutation entraînant la mise au point d'antiviraux capables d'agir contre les virus mutés, l'utilisation des antiviraux actuellement disponibles est également limitée au traitement spécifique d'infections par certaines souches de virus Influenza de type A, lesdites souches étant dépendantes des types de protéines cibles présentes à la surface des virus.

Au contraire, les antiviraux selon l'invention ne ciblent pas les protéines de surface des virus Influenza, notamment de type A, mais sont destinés à se fixer au niveau du domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine desdits virus.

La nucléoprotéine des virus Influenza constitue une protéine interne non sujette aux phénomènes fréquents de mutation tels qu'observés chez les protéines de surface de ces virus. Ainsi, même les souches de virus Influenza, notamment de type A, qui présenteront des mutations notamment au niveau de leurs protéines de surface resteront des cibles des antiviraux selon l'invention.

En outre, la nucléoprotéine constitue également une protéine majoritairement conservée au sein des différentes souches de virus Influenza de type A et des autres types. Outre la conservation de la séquence de la nucléoprotéine au sein des souches de virus Influenza (supérieure à 90%), il a été démontré que le sillon fixant l'ARN en particulier au niveau de ladite nucléoprotéine ne varie pas au niveau structural entre un virus H1N1 et H5N1 (Ye et al, 2006, Ng et al, 2008). Ainsi, en plus de s'astreindre des problèmes de variabilité de la nucléoprotéine, les antiviraux selon l'invention présentent l'avantage de pouvoir être utilisés pour traiter un large spectre d'infections par des virus Influenza de type A et ce, sans spécificité de souches, contrairement aux antiviraux actuellement sur le marché.

L'invention porte donc sur de nouveaux composés ayant la propriété d'agir en tant qu'inhibiteur de la fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine des virus Influenza de type A en se liant au domaine de liaison de l'ARN viral sur ladite nucléoprotéine, inhibant ainsi la réplication virale.

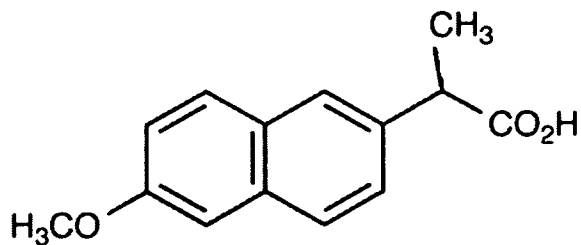
Un premier aspect de l'invention porte donc sur une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un virus Influenza de type A chez un sujet, laquelle composition comprend un composé ayant la propriété d'agir en tant qu'inhibiteur de la fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine des virus Influenza de type A, ledit composé ayant la propriété de se lier dans un site formant une sphère d'au moins 12 ångströms (Å) de diamètre centrée sur le résidu TYR148 appartenant au domaine de liaison de l'ARN viral sur ladite nucléoprotéine, ledit domaine :

- comprenant les acides aminés Arg65, Gln149, Tyr148, Arg150, Arg152, Arg156, Arg174, Arg175, Arg195, Arg199, Arg213, Arg214, Arg221, Arg236, Pro354, Arg355, Lys357, Arg361, Arg391, Lys184, Lys198, Gly212, Ile217, Ala218, Lys227, Lys229, Lys273 et Val353 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1, de préférence tout acide aminé situé à une distance de moins de 5 ångströms desdits acides aminés, et
- étant délimité de deux boucles, la première boucle comprenant les résidus acides aminés Glu73 à Lys90 et la deuxième boucle comprenant les résidus acides aminés Gly200 à Arg214 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1.

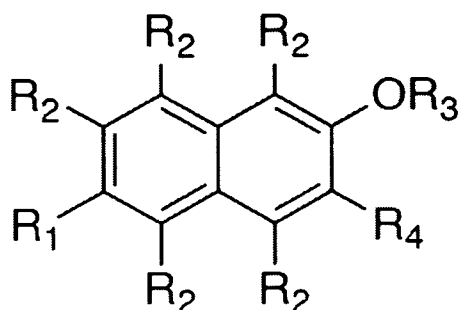
et caractérisée en ce que ledit composé est choisi parmi :

- un composé Naproxène de formule (A) ou un de ses dérivés de formule (B) avec :

Formule (A)



Formule (B)



5

Avec :

- R1 = $-\text{Ph}(\text{COOH})_2$ ou $-\text{Ph}(\text{COOH})_2\text{-X-Ar}$ avec X = CH₂ ou O et Ar = Ph ou PhOH ou PhOMe ou PhNH₂ ou imidazole ou pyrrole

Ou R1 = $-\text{CHR}_5\text{R}_6$ avec :

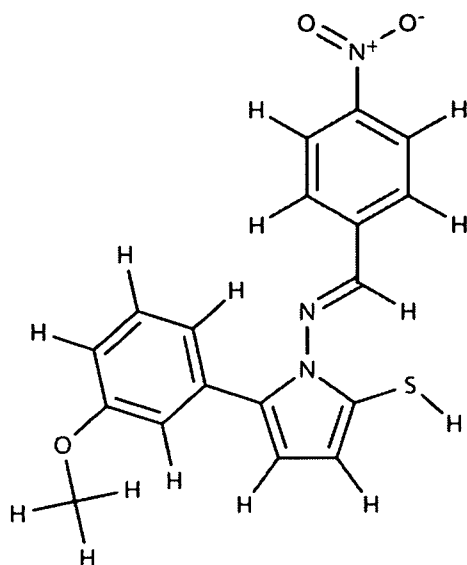
- 10 R5 = $-(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ou $-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$ avec n = 0-3 ou $-(\text{CH}_2)_n\text{PhCOOH}$ ou $-\text{Ph}(\text{COOH})_2$ ou $-(\text{CH}_2)_n\text{PhSO}_3\text{H}$

Et R6 = H, $-\text{CH}_3$ ou tout groupement aliphatique linéaire ou $-(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ avec n = 1-3 ou CONH₂ ou Cl ou F ou R6 = R5

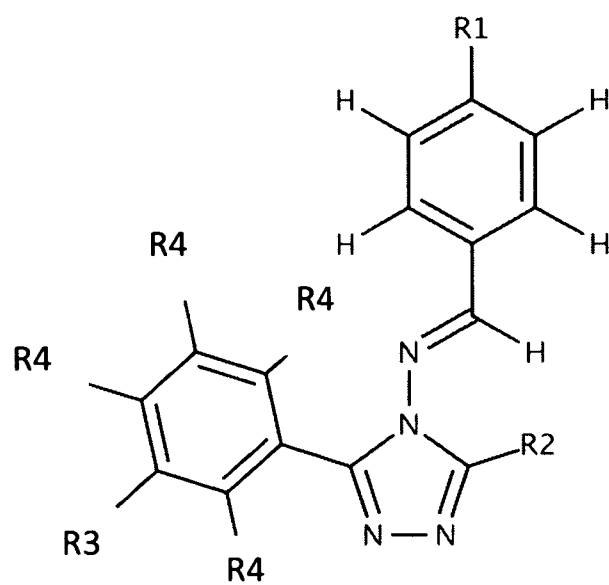
- R2 = F, Cl ou R2 = R3
- 15 - R3 = H, $-\text{CH}_3$ ou tout groupement aliphatique linéaire ou équivalents ramifiés ou $-(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ avec n = 0-4 ou $-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ avec n = 0-4 ou $-(\text{CH}_2)_n\text{CONH}_2$ avec n = 0-3
- R4 = OH ou OR3 ou H
- le triazole de formule (C) ou un de ses dérivés de formule (D) ou (E) avec :

20

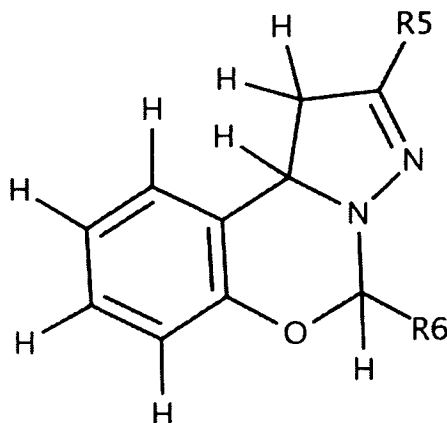
Formule (C)



Formule (D)



Formule (E)



Avec :

- 5
- R1 = $(\text{CH}_2)_n(\text{COOH})_m$ ou $(\text{CH}_2)_n(\text{SO}_3\text{H})_m$ avec $n=0-3$, $m=1$ ou NO_2 ,
 - R2 = H, F, Cl, ou SH
 - R3 = CH_3 ou tout groupement aliphatique ou $-(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$ $n=0-4$ ou $-(\text{CH}_2)_n\text{-NH}_2$ ou OCH_3 ou $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ou $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$
 - R4 = H, F, Cl
- 10 avec pour la formule E :
- R5 = un phenyl carboxylate ou sulfate ou sulfonate $-\text{Ph}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ou $\text{Ph}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$ ou R5 = H, F, Cl et
 - R6 = R5 ou R6 = $-\text{Ph}(\text{OH})_m$ ($m = 0-4$) ou $-\text{Ph}(\text{OCH}_3)$ ou R6 = H, F, Cl

De manière préférée, ladite composition selon l'invention est caractérisée en ce que
 15 ladite séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1 correspondant à la séquence SEQ ID N°2.

De manière préférée, ladite composition selon l'invention est caractérisée en ce que
 ledit domaine de liaison comprenant plus de 10% de résidus acides aminés arginines,
 préférentiellement plus de 20% de résidus acides aminés arginine.

20 De manière préférée, ladite composition selon l'invention est caractérisée en ce que
 ledit composé n'est pas un dérivé nitré du Naproxène tel que décrit dans la demande
 internationale PCT WO 2005/030224 A1 de ligne 1, page 2 à la ligne 14, page 17.

De manière préférée, la composition selon l'invention est caractérisée en ce que le sujet est un mammifère, de préférence un humain, infecté par un virus Influenza de type A.

Selon un autre aspect, l'invention porte sur une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un Orthomyxovirus chez un sujet, laquelle composition comprend un composé tel que défini dans la revendication 1.

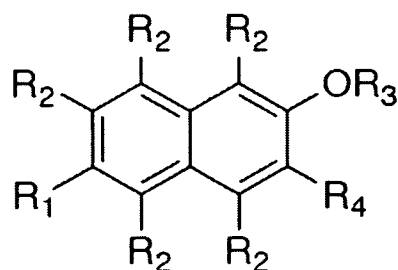
De manière préférée, la composition selon l'invention est caractérisée en ce que ledit composé n'est pas un dérivé nitré du Naproxène tel que décrit dans la demande PCT WO 2005/030224 A1 (NICOX) de la ligne 1, page 2 à la ligne 14, page 17.

De manière préférée, la composition selon l'invention est caractérisée en ce que ledit composé n'est pas un dérivé du triazole tel que décrit dans la demande internationale PCT WO 2007134678 A2 (MERCK) de la ligne 4, page 19 à la ligne 20, page 39 et de la ligne 19, page 45 à la ligne 31, page 50.

De manière préférée, la composition selon l'invention est caractérisée en ce que ledit composé est le composé Naproxène de formule (A) ou un de ses dérivés de formule (B) tels que définis dans la revendication 1.

De manière préférée, la composition selon l'invention est caractérisée en ce que ledit composé est un dérivé du Naproxène de Formule (L)

Formule (L)



Avec :

- R1 = -Ph(COOH)₂ ou -Ph(COOH)₂-X-Ar avec X = CH₂ ou O et Ar = Ph ou PhOH ou PhOMe ou PhNH₂ ou imidazole ou pyrrole

Ou R1 = -CHR₅R₆ avec :

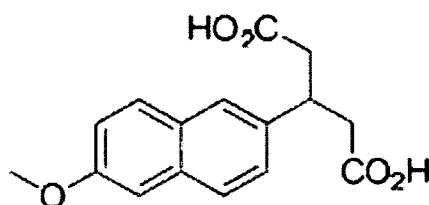
R₅ = -(CH₂)_nCOOH ou -(CH₂)_nSO₃H avec n = 0-3 ou -(CH₂)_nPhCOOH ou -Ph(COOH)₂ ou -(CH₂)_nPhSO₃H

Et R6 = H, -CH3 ou tout groupement aliphatique linéaire ou -(CH2)*n*OH avec *n* = 1-3 ou CONH2 ou Cl ou F ou R6 = R5

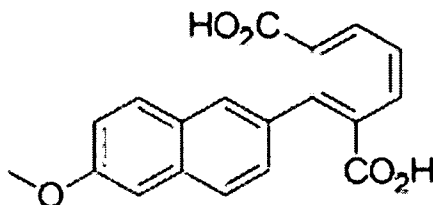
- R2 = R3
- R3 = H
- 5 - R4 = H

De manière encore plus préférée, la composition selon l'invention est caractérisée en ce que ledit composé est le composé dérivé du Naproxène de formule (F) ou le composé dérivé du Naproxène de formule (G) :

Formule (F)



Formule (G)



De manière préférée, la composition selon l'invention est caractérisée en ce que ledit composé est un triazole de formule (C) ou un de ses dérivés de formules (D) ou (E) tels que définis précédemment.

De manière préférée, la composition selon l'invention est caractérisée en ce que le sujet est un mammifère, plus préférentiellement un humain, infecté par un Orthomyxovirus.

De manière préférée, la composition selon l'invention est caractérisée en ce que ladite composition est destinée au traitement d'une infection virale par un virus Influenza chez un sujet.

De manière préférée, la composition selon l'invention est caractérisée en ce que le sujet est un mammifère, plus préférentiellement un humain, infecté par un virus Influenza.

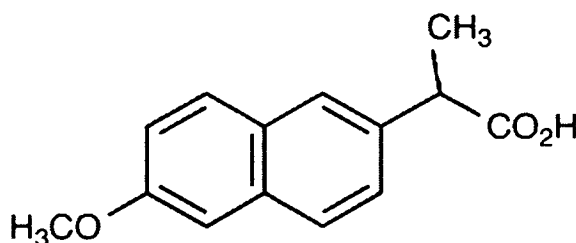
De manière préférée, la composition selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle peut comprendre un support pharmaceutiquement acceptable.

5 Un autre aspect de l'invention concerne un composé ayant la propriété d'agir en tant qu'inhibiteur de la fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine des virus Influenza de type A, ledit composé ayant la propriété de se lier dans un site formant une sphère d'au moins 12 ångströms (Å) de diamètre centrée sur le résidu TYR148 appartenant au domaine de liaison de l'ARN viral sur ladite nucléoprotéine, ledit domaine :

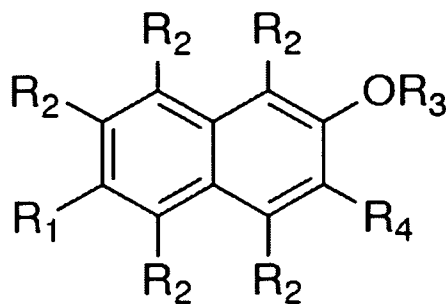
- 10 - comprenant les acides aminés Arg65, Gln149, Tyr148, Arg150, Arg152, Arg156, Arg174, Arg175, Arg195, Arg199, Arg213, Arg214, Arg221, Arg236, Pro354, Arg355, Lys357, Arg361, Arg391, Lys184, Lys198, Gly212, Ile217, Ala218, Lys227, Lys229, Lys273 et Val353 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1, de préférence tout acide aminé situé à une distance de moins de 5
- 15 ångströms desdits acides aminés, et
- étant délimité de deux boucles, la première boucle comprenant les résidus acides aminés Glu73 à Lys90 et la deuxième boucle comprenant les résidus acides aminés Gly200 à Arg214 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1.

et caractérisée en ce que ledit composé est choisi parmi :

- 20 • un composé Naproxène de formule (A) ou un de ses dérivés de formule (B) avec :
- Formule (A)



Formule (B)



Avec :

- 5 - R1 = $-\text{Ph}(\text{COOH})_2$ ou $-\text{Ph}(\text{COOH})_2\text{-X-Ar}$ avec X = CH₂ ou O et Ar = Ph ou PhOH ou PhOMe ou PhNH₂ ou imidazole ou pyrrole

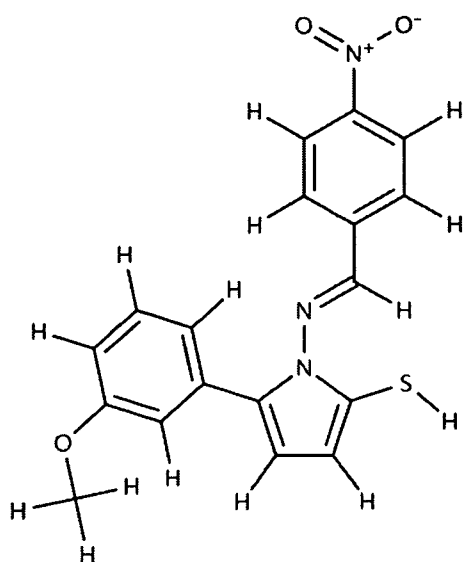
Ou R1 = $-\text{CHR}_5\text{R}_6$ avec :

R5 = $-(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ou $-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$ avec n = 0-3 ou $-(\text{CH}_2)_n\text{PhCOOH}$ ou $-\text{Ph}(\text{COOH})_2$ ou $-(\text{CH}_2)_n\text{PhSO}_3\text{H}$

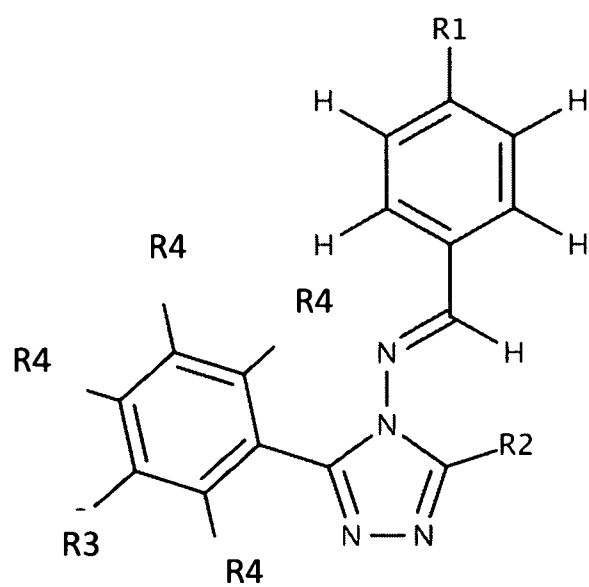
Et R6 = H, $-\text{CH}_3$ ou tout groupement aliphatique linéaire ou $-(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ avec n = 1-3 ou CONH₂ ou Cl ou F ou R6 = R5

- 10 - R2 = F, Cl ou R2 = R3
- R3 = H, $-\text{CH}_3$ ou tout groupement aliphatique linéaire ou équivalents ramifiés ou $-(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ avec n = 0-4 ou $-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ avec n = 0-4 ou $-(\text{CH}_2)_n\text{CONH}_2$ avec n = 0-3
- 15 - R4 = OH ou OR3 ou H
- le triazole de formule (C) ou un de ses dérivés de formule (D) ou (E) avec :

Formule (C)

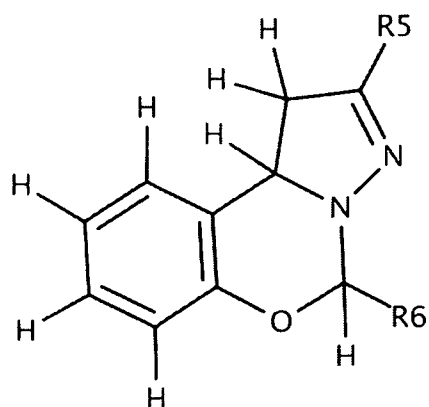


Formule (D)



5

Formule (E)



Avec :

- R1 = (CH₂)_n(COOH)_m ou (CH₂)_n(SO₃H)_m avec n=0-3, m=1 ou NO₂,
- R2 = H, F, Cl, ou SH
- R3 = CH₃ ou tout groupement aliphatique ou -(CH₂)_n-OH n=0-4 ou -(CH₂)_n-NH₂ ou OCH₃ ou O(CH₂)_nCH₃ ou O(CH₂)_nNH₂
- R4 = H, F, Cl

avec pour la formule E :

- R5 = un phenyl carboxylate ou sulfate ou sulfonate Ph(CH₂)_nCOOH ou Ph(CH₂)_nSO₃H ou R5 = H, F, Cl et
- R6 = R5 ou R6 = Ph-(OH)_m (m = 0 -4) ou Ph-(OCH₃) ou R6 = H, F, Cl

et caractérisé en ce qu'il n'est ni un dérivé du triazole tel que décrit dans la demande internationale PCT WO 2007134678 A2 (MERCK) de la ligne 4, page 19 à la ligne 20, page 39 et de la ligne 19, page 45 à la ligne 31, page 50, ni un dérivé nitré du Naproxène tel que décrit dans la demande PCT WO 2005/030224 A1 (NICOX) de la ligne 1, page 2 à la ligne 14, page 17.

Un autre aspect de l'invention concerne un procédé d'identification d'un composé ayant la propriété de se lier au niveau du domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine des virus Influenza de type A, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

a) Modéliser la structure en trois dimensions (3D) de la nucléoprotéine d'un virus Influenza de type A ;

b) Générer un modèle en 3 dimensions (3D) du domaine de liaison de l'ARN viral sur ladite nucléoprotéine à partir de la structure obtenue en a):

- Ledit domaine comprenant les acides aminés Arg65, Gln149, Tyr148, Arg150, Arg152, Arg156, Arg174, Arg175, Arg195, Arg199, Arg213, Arg214, Arg221, Arg236, Pro354, Arg355, Lys357, Arg361, Arg391, Lys184, Lys198, Gly212, Ile217, Ala218, Lys227, Lys229, Lys273 et Val353 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1, de préférence tout acide aminé situé à une distance de moins de 5 ångströms desdits acides aminés, et
- Ledit domaine étant délimité par deux boucles, la première boucle comprenant les résidus acides aminés Glu 73 à Lys 90 et la deuxième boucle comprenant les résidus

acides aminés Gly 200 à Arg 214 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1.

c) Cribler un ou plusieurs composés sur le modèle en 3D dans un site du domaine de liaison de l'ARN selon b) formé par une sphère d'au moins 12 ångströms (Å) de diamètre centrée sur le résidu Tyr 148;

d) Identifier un composé capable de se lier audit domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine, ledit composé étant susceptible d'inhiber la fixation de l'ARN à la nucléoprotéine des virus Influenza de type A et pouvant donc potentiellement être utilisé comme un inhibiteur de la réplication virale.

De manière préférée, ledit procédé est caractérisé en ce qu'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1 est la séquence SEQ ID N°2.

De manière préférée, ledit procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape complémentaire e) consistant à tester *in vitro* la capacité d'un composé identifié selon l'étape d) à inhiber la fixation de l'ARN viral sur la nucléoprotéine ainsi que la réplication virale.

De manière préférée, ledit procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape (f) consistant à sélectionner un tel composé comme étant un inhibiteur de la réplication virale.

Description des figures

Figure 1 : Structure représentative de la de la Nucléoprotéine sauvage de virus Influenza de type A.

Figure 2 : Structure cristalline de la Nucléoprotéine de virus Influenza de type A montrant un large sillon central destiné à la fixation de l'ARN.

Figure 3 : Root Mean Square Fluctuation (RMSF) de la nucléoprotéine NP et des mutants R361A et R416A.

Figure 4 : Fixation du naproxène dans le sillon de fixation de l'ARN de la nucléoprotéine et résidus impliqués dans l'interaction, à la fois par formation de liaisons électrostatiques avec R361 (R355) ou polaire (N149) et hydrophobes avec Y148, F489.

Figure 5 : Nucléoprotéine de virus Influenza de type A dont les acides aminés correspondant au sillon destiné à la fixation de l'ARN sont représentés en foncé.

Figure 6 : Détection de signaux résultant de la fixation de NP ou des mutants R416A et R361A à des ARN simples brins.

Figure 7 : Corrélation entre la vitesse de formation du complexe de NP ou des mutants R416A et R361A avec la vitesse apparente d'oligomérisation

5 Figure 8 Décroissance du titre viral de cellules MDCK infectées par un virus Influenza de type A/WSN avec une multiplicité d'infection (MOI) de 10^{-3} en présence de naproxène ajouté à $t=0$.

Figure 9 : Comparaison de l'effet du naproxène – tamiflu sur des cellules MDCK infectées par un virus Influenza A /WSN.

10 Figure 10 : Test de viabilité cellulaire MTT sur des cellules A549 avec du naproxène

Figure 11 : Effet d'un traitement au naproxène chez la souris. A : perte de poids normalisée au poids initial au jour de l'infection ; B : titre viral des poumons de souris 7 jours après infection. Résultats représentatifs de 3 expériences, 7 à 10 souris sont utilisées pour chaque concentration de naproxène et pour le témoin dans chaque expérience; infection
15 intranasale avec 2000 pfu par le virus A/PR8 (H1N1)

Figure 12 Comparaison de la perte de poids moyenne par un virus Influenza de type A/PR8 à 50 pfu/ml sans et avec injection IP 2 mg de naproxène/souris/jour ou 0.2 mg tamiflu/souris/jour.

Figure 13 : Observation de cellules pulmonaires de cellules infectées (A), infectées et
20 traitées (B), non infectées (C).

Figure 14 : Docking du Naproxène A et cO dans la nucléoprotéine du virus Influenza A

Figure 15 : Structure des composés d'intérêt Naproxène A et Naproxène cO

Figure 16: Compétition du Naproxène avec l'association de l'ARN à NP

25 Figure 17 : Résultats du test par résonance à plasmon de surface pour le Naproxène et le Naproxène cO

Figure 18 : Schéma du test de fluorescence

Figure 19 : Mesure du titre viral en présence de différents inhibiteurs : composé 59, composé 72 et naproxène.

30 **Description détaillée de l'invention**

Selon un premier aspect, l'invention porte sur une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un virus Influenza de type A chez un sujet, laquelle composition comprend un composé ayant la propriété d'agir en tant qu'inhibiteur de la fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine des virus Influenza de type A, ledit composé
5 ayant la propriété de se lier dans un site formant une sphère d'au moins 12 ångströms (Å) de diamètre centrée sur le résidu Tyr 148, appartenant au domaine de liaison de l'ARN viral sur ladite nucléoprotéine, ledit domaine :

- comprenant les acides aminés Arg65, Gln149, Tyr148, Arg150, Arg152, Arg156, Arg174, Arg175, Arg195, Arg199, Arg213, Arg214, Arg221, Arg236, Pro354,
10 Arg355, Lys357, Arg361, Arg391, Lys184, Lys198, Gly212, Ile217, Ala218, Lys227, Lys229, Lys273 et Val353 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1, de préférence tout acide aminé situé à une distance de moins de 5 ångströms desdits acides aminés, et
- étant délimité par deux boucles, la première boucle comprenant les résidus acides
15 aminés Glu73 à Lys90 et la deuxième boucle comprenant les résidus acides aminés Gly200 à Arg214 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1.

On entend par « nucléoprotéine des virus Influenza de type A » la protéine virale destinée à s'associer avec un fragment nucléique virale ainsi qu'une ARN polymérase en vue de former le complexe ribonucléoprotéique responsable de la transcription ainsi que de la
20 réplication virale. Les nucléoprotéines sont des protéines connues de l'Homme de l'art et peuvent présenter des variations selon les souches dont elles sont issues. Des exemples de séquences protéiques de nucléoprotéines de virus Influenza de type A sont les suivants :

- SEQ ID N°2, nucléoprotéine de la souche H1N1 du virus Influenza de type A/WSN/1933, numéro d'accèsion GenBank CY034135,
- 25 - SEQ ID N°3, nucléoprotéine de la souche A/Brevig Mission/1/1918(H1N1), numéro d'accèsion GenBank AY744935,
- SEQ ID N°4, nucléoprotéine de la souche A/HongKong/483/97(H5N1), numéro d'accèsion GenBank AF084277.

De manière préférée, une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1 est la
30 séquence SEQ ID N°2.

Un composé selon l'invention est capable de se lier à la nucléoprotéine des virus influenza de type A au niveau du domaine de liaison de l'ARN viral empêchant ainsi la

liaison de ce dernier à la nucléoprotéine. L'inhibition de la fixation de l'ARN viral sur la nucléoprotéine a deux conséquences qui restent toutefois corrélées : d'une part, le complexe ribonucléoprotéique, composé de la nucléoprotéine, l'ARN viral et l'ARN polymérase, ne peut se former, d'autre part les inventeurs ont démontré que la fixation de l'ARN viral sur la nucléoprotéine jouait un rôle dans l'oligomérisation de la nucléoprotéine, étape nécessaire à la réplication virale. Ainsi, l'absence de fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine empêche non seulement la formation du complexe ribonucléoprotéique mais aussi l'oligomérisation de la protéine, ceci entraînant une absence de réplication virale.

Du fait du mécanisme d'action des composés selon l'invention au niveau du domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine des virus Influenza de type A, la composition pharmaceutique selon l'invention permet de traiter tout sujet infecté par un virus Influenza de type A sans spécificité de souches et en l'absence de problématique en lien avec la variabilité de la nucléoprotéine.

On entend par « domaine de liaison » en référence à la nucléoprotéine de virus Influenza de type A le domaine protéique auquel se fixe l'ARN viral pour former le complexe nucléoprotéique.

Le site de liaison des composés est centré autour d'un résidu acide aminé Tyrosine en position 148. Cet acide aminé est conservé dans les nucléoprotéines des différents types de virus Influenza de type A mais également dans les nucléoprotéines des virus Influenza de type B et C et est directement impliqué dans la formation de liaisons entre l'ARN viral et la nucléoprotéine.

Le domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine des virus Influenza de type A forme un sillon central distinct dans la structure de la nucléoprotéine comme on peut l'observer sur la figure 2. Ledit domaine constitue une région riche en acides aminés basiques Arginines et lysines favorisant la liaison avec une molécule inhibitrice ou un acide nucléique.

De manière préférée, ledit domaine de liaison comprend plus de 10% de résidus acides aminés arginines, préférentiellement plus de 15% de résidus acides aminés arginine.

De manière toujours préférée, ledit domaine de liaison comprend les résidus acides aminés arginines suivants : Arg65, Arg150, Arg152, Arg156, Arg174, Arg175, Arg195, Arg199, Arg213, Arg214, Arg221, Arg236, Arg355, Arg361, Arg391.

Toujours de manière préférée, ledit domaine de liaison comprend les résidus acides aminés lysines suivants : Lys357, Lys184, Lys198, Lys227, Lys229 et Lys273.

Les inventeurs ont également mis en évidence que le domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine des virus Influenza de type A est délimité par plusieurs boucles protéiques présentant un rôle dans l'activité de la nucléoprotéine. Ainsi, deux boucles ont été identifiées comme participant à la fixation de l'ARN viral sur la nucléoprotéine : la première

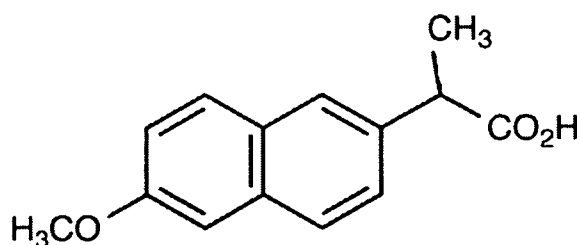
5 boucle comprend les résidus acides aminés Glu73 à Lys90 et la deuxième boucle comprend les résidus Gly200 à Arg214. Ces boucles (également appelées « loop ») sont visibles sur la figure 1.

On entend par « sujet » un mammifère, de préférence un humain, infecté par un virus Influenza de type A.

10 De manière préférée, un composé tel que défini précédemment n'est pas un dérivé nitré du Naproxène tel que décrit dans la demande internationale PCT WO 2005/030224 A1 de la ligne 30 page 2 à la page 17 incorporées ici par référence.

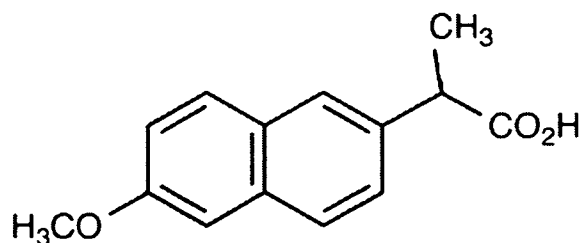
Le Naproxène, également « naproxen », est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) de formule (A) :

15 Formule (A)

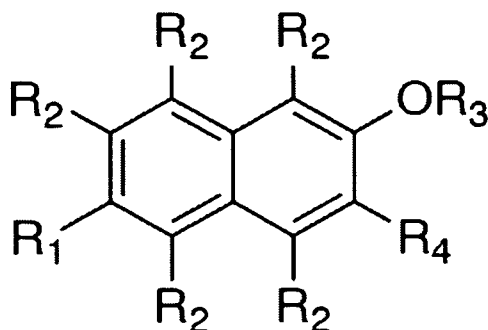


De manière préférée, un composé tel que défini précédemment est un composé Naproxène de formule (A) ou un de ses dérivés de formule (B) avec :

Formule (A)



Formule (B)



Avec :

- R1 = $-\text{Ph}(\text{COOH})_2$ ou $-\text{Ph}(\text{COOH})_2\text{-X-Ar}$ avec X = CH₂ ou O et Ar = Ph ou PhOH ou PhOMe ou PhNH₂ ou imidazole ou pyrrole

Ou R1 = $-\text{CHR}_5\text{R}_6$ avec :

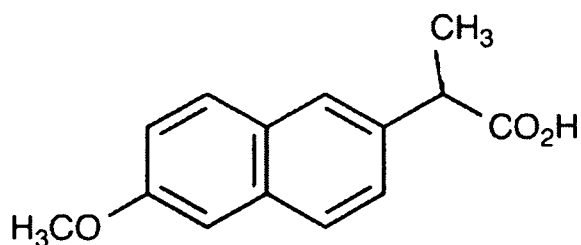
R5 = $-(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ou $-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$ avec n = 0-3 ou $-(\text{CH}_2)_n\text{PhCOOH}$ ou $-\text{Ph}(\text{COOH})_2$ ou $-(\text{CH}_2)_n\text{PhSO}_3\text{H}$

Et R6 = H, $-\text{CH}_3$ ou tout groupement aliphatique linéaire ou $-(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ avec n = 1-3 ou CONH₂ ou Cl ou F ou R6 = R5

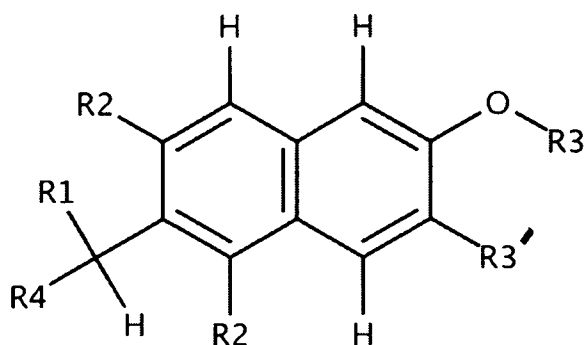
- R2 = F, Cl ou R2 = R3
- R3 = H, $-\text{CH}_3$ ou tout groupement aliphatique linéaire ou équivalents ramifiés ou $-(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ avec n = 0-4 ou $-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ avec n = 0-4 ou $-(\text{CH}_2)_n\text{CONH}_2$ avec n = 0-3
- R4 = OH ou OR3 ou H

Selon un autre mode de réalisation préféré, un composé tel que défini précédemment est un composé Naproxène de formule (A) ou un de ses dérivés de formule (B) avec :

Formule (A)



Formule (B)

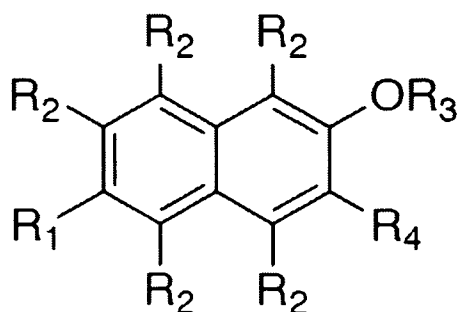


Avec :

- 5 - R₁ = $-(CH_2)_n(COOH)_m$ ou $-(CH_2)_n(SO_3H)_m$ avec $n=0-3$, $m=1$, phenyl carboxylate ou sulfate ou sulfonate $-Ph(CH_2)_nCOOH$ ou $-Ph(COOH)_2$ ou $-Ph(CH_2)_n(SO_3H)_2$
- R₂ = H, F, Cl, ou
- R₃ = $-CH_3$ ou tout groupement aliphatique $CH_3-(CH_2)_n-$ ou $-(CH_2)_n-OH$ avec $n=0-4$ ou $-(CH_2)_n-NH_2$ ou $-(CH_2)_nCONH_2$
- 10 - R₃' = OH ou OR₃ ou H
- R₄ = $-CH_3$ ou tout groupement aliphatique $CH_3-(CH_2)_n-$ ou $-(CH_2)_n-OH$ $n=0-3$ ou $CONH-R_3$ ou H, F, Cl ou R₃=R₂.

Toujours de manière préférée, un composé tel que défini précédemment est un dérivé du Naproxène de Formule (L) :

15 Formule (L)



Avec :

- $R1 = -Ph(COOH)_2$ ou $-Ph(COOH)_2-X-Ar$ avec $X = CH_2$ ou O et $Ar = Ph$ ou $PhOH$ ou $PhOMe$ ou $PhNH_2$ ou imidazole ou pyrrole

Ou $R1 = -CHR_5R_6$ avec :

- 5 $R_5 = -(CH_2)_nCOOH$ ou $-(CH_2)_nSO_3H$ avec $n = 0-3$ ou $-(CH_2)_nPhCOOH$ ou $-Ph(COOH)_2$ ou $-(CH_2)_nPhSO_3H$

Et $R_6 = H$, $-CH_3$ ou tout groupement aliphatique linéaire ou $-(CH_2)_nOH$ avec $n = 1-3$ ou $CONH_2$ ou Cl ou F ou $R_6 = R_5$

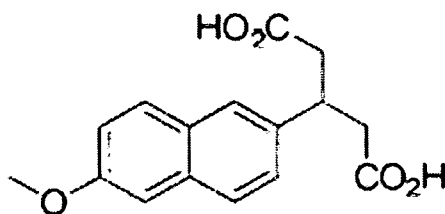
- $R_2 = R_3$

- 10 - $R_3 = H$

- $R_4 = H$

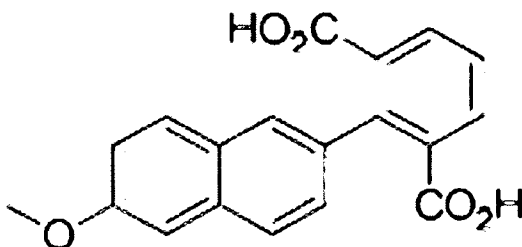
Toujours de manière préférée, un composé tel que défini précédemment est un dérivé de Naproxène de formule (F) et ci-après appelé « dérivé du Naproxène A » ou « Naproxène A » :

- 15 Formule (F)



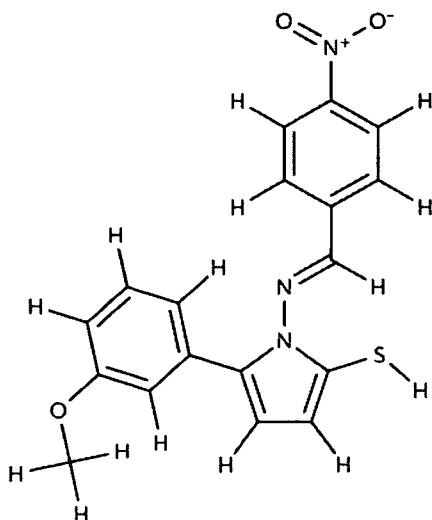
De manière encore plus préférée, un composé tel que défini précédemment est un dérivé de Naproxène de formule (G) et ci-après appelé « dérivé du Naproxène c0 » ou « Naproxène c0 » :

- 20 Formule (G)



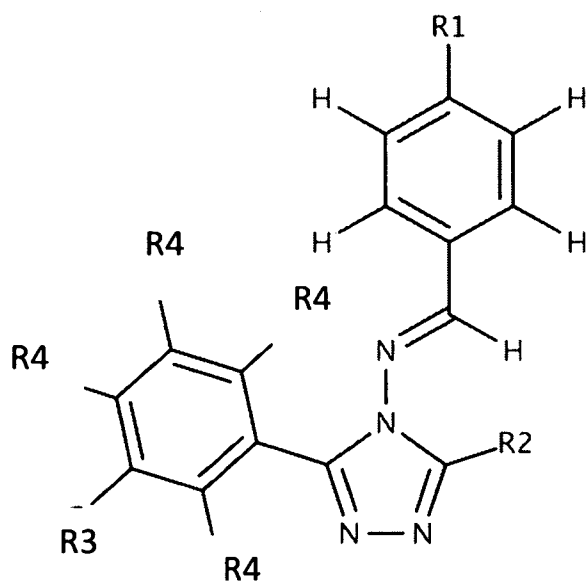
Toujours de manière préférée, un composé tel que défini précédemment est le triazole de formule (C) ou un de ses dérivés de formule (D) ou (E) avec :

Formule (C)

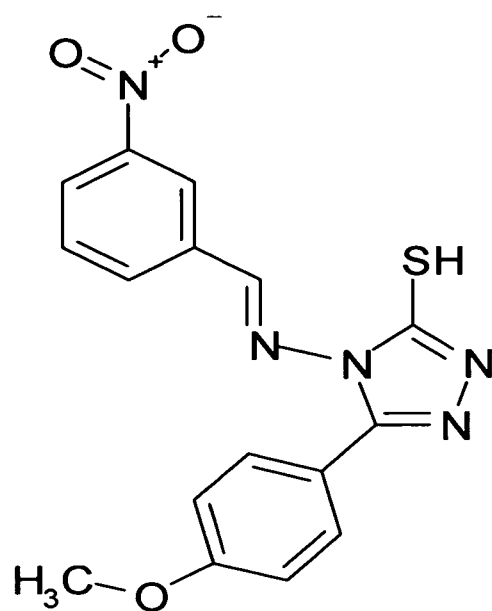


5

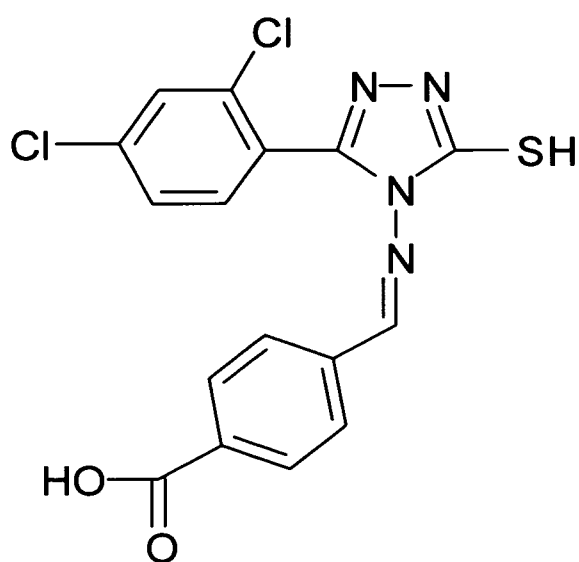
Formule (D)



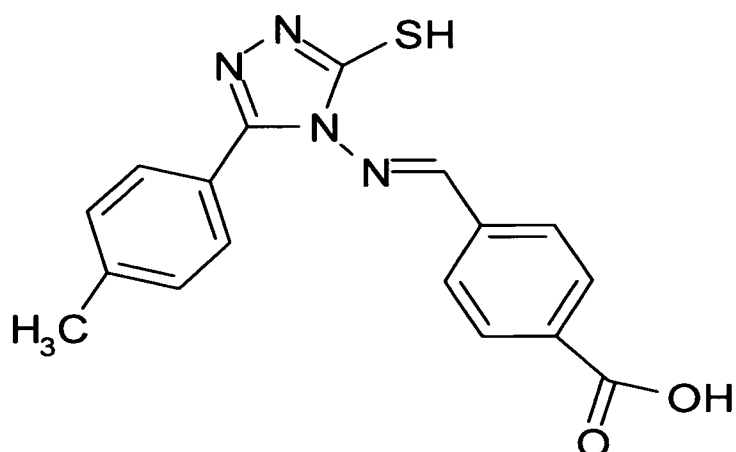
Formule (H) – L410



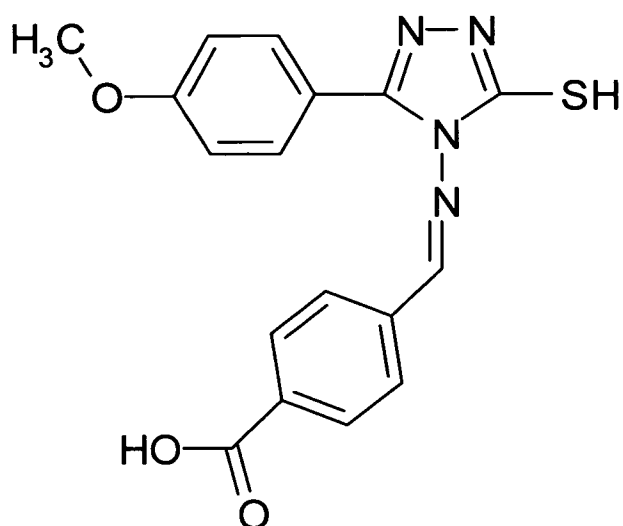
Formule (I) - 59



Formule (J) - 72



Formule (K) - 88



5 Selon un second aspect, l'invention porte sur une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un *Orthomyxovirus* chez un sujet, laquelle composition comprend un composé ayant la propriété d'agir en tant qu'inhibiteur de la fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine des *Orthomyxovirus*, ledit composé ayant la propriété de se lier au domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine desdits virus
10 tel que défini précédemment.

 Les Orthomyxovirus constituent la famille des virus à ARN simple brin Orthomyxoviridae. Cette famille inclue notamment les cinq genres de virus Influenza de type A, de type B et de type C, les Isovirus ainsi que les Thogotovirus. Les virus Influenza sont notamment à l'origine des infections grippales des vertébrés, lesdits virus de type A infectant
15 les humains ainsi que d'autres mammifères et oiseaux, les virus Influenza de type B étant responsable de l'infection des humains et des phoques et les virus Influenza de type C étant à

l'origine de l'infection des humains et des porcs. Concernant les Isovirus, ceux-ci sont responsables des infections de saumons tandis que les Thogotovirus infectent des vertébrés ainsi que des invertébrés tels que les parasites du poisson ou les moustiques.

On entend ici par « sujet » un mammifère, de préférence un humain, infecté par un virus appartenant à la famille des Orthomyxoviridae.

De manière préférée, un composé dans une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un Orthomyxovirus selon l'invention n'est pas un dérivé nitré du Naproxène tel que décrit dans la demande PCT WO 2005/030224 A1 (NICOX) de la ligne 1, page 2 à la ligne 14, page 17 incorporées ici par référence.

Toujours de manière préférée, un composé selon l'invention dans une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un Orthomyxovirus n'est pas un dérivé du triazole tel que décrit dans la demande internationale PCT WO 2007134678 A2 (MERCK) de la ligne 4, page 19 à la ligne 20, page 39 et de la ligne 19, page 45 à la ligne 31, page 50 incorporées ici par référence.

De manière préférée, un composé selon l'invention dans une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un Orthomyxovirus est le composé Naproxène de formule (A) ou un de ses dérivés de formule (B) tels que définis précédemment.

De manière encore plus préférée, un composé selon l'invention dans une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un Orthomyxovirus est un dérivé de Naproxène de formule (L).

De manière encore plus préférée, un composé selon l'invention dans une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un Orthomyxovirus est le dérivé de Naproxène de formule (F).

De manière encore plus préférée, un composé selon l'invention dans une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un Orthomyxovirus est le dérivé de Naproxène de formule (G).

Toujours de manière préférée, un composé selon l'invention dans une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un Orthomyxovirus est un triazole de formule (C) ou un de ses dérivés de formules (D) ou (E) tels que définis précédemment.

Toujours de manière préférée, un composé selon l'invention dans une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un Orthomyxovirus est un dérivé du triazole choisie parmi les composés de formules (H), (I), (J) et (K).

De manière préférée, la composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un Orthomyxovirus est destinée au traitement d'une infection virale par virus Influenza chez un sujet.

De préférence, un sujet selon l'invention est un mammifère, plus préférentiellement un humain, infecté par un virus Influenza.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut en outre comprendre un support pharmaceutiquement acceptable.

Le terme « pharmaceutiquement acceptable » se réfère à des entités moléculaires ou compositions étant physiologiquement tolérables et ne produisant pas typiquement de réaction allergique ou réaction similaire non supportable, tels qu'un dérangement intestinal ou des vertiges, lors de son administration chez le sujet. De manière préférée, le terme « pharmaceutiquement acceptable » utilisée ici signifie approuvé par une agence réglementaire d'un gouvernement fédéral ou d'un état ou listé dans la pharmacopée américaine ou toute autre pharmacopée généralement reconnue pour l'utilisation chez les animaux, et plus particulièrement chez les humains.

Le terme « support » se réfère à un diluant, adjuvant, excipient ou véhicule avec lequel le composé selon l'invention est administré. De tels supports pharmaceutiques peuvent être des liquides stériles, tels que l'eau ou des huiles, incluant ceux d'origines pétrolières, animale, végétale ou encore synthétique, telles que les huiles de cacahuète, soja, minérale ou encore de sésame. L'eau ou toute solution aqueuse, solution saline ou encore solution aqueuse de dextrose ou glycérol sont employées de manière préférée en tant que supports, et plus particulièrement pour des solutions injectables. À titre d'exemple, la composition peut comprendre des émulsions, des microémulsions, des émulsions huile dans l'eau, des lipides anhydres et des émulsions eau dans l'huile, ou d'autres types d'émulsions. Des supports pharmaceutiquement acceptables sont décrits dans l'ouvrage "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin.

La composition selon l'invention peut comprendre en outre un ou plusieurs additifs tels que les diluants, les excipients, les stabilisateurs et les conservateurs. De tels additifs sont bien connus de l'homme du métier et sont décrits notamment dans « Ullmann's Encyclopedia

of Industrial Chemistry, 6th Ed. » (différents éditeurs, 1989-1998, Marcel Dekker); et dans "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery System"s (ANSEL et al., 1994, WILLIAMS & WILKINS).

La composition selon l'invention pourra se trouver sous une forme administrable par
5 voie parentérale, notamment par voie intraveineuse, intra-péritonéale, intradermique, sous-
cutanée ou encore intra-artérielle ou sous une forme administrable par voie orale ou par voie
pulmonaire ou nasale. Le choix de la voie d'administration de la composition selon
l'invention dépendra de la forme de la composition à administrer, des supports
pharmaceutiquement acceptables choisis ou encore de la rapidité d'efficacité voulue.
10 L'homme du métier sera à même au regard de ses connaissances dans le domaine de choisir la
voie d'administration la mieux adaptée.

Selon un mode de réalisation préféré, ladite composition est destinée à une
administration par voie parentérale.

Selon un autre mode de réalisation préféré, ladite composition est destinée à une
15 administration par voie orale.

Le dosage du composé inhibiteur dans la composition pharmaceutique selon l'invention
sera ajusté selon le type d'administration de la composition.

Selon un troisième aspect, l'invention porte sur un composé ayant la propriété d'agir
en tant qu'inhibiteur de la fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine des virus Influenza de
20 type A, ledit composé ayant la propriété de se lier au domaine de liaison de l'ARN viral sur la
nucléoprotéine des virus Influenza de type A tel que défini précédemment, et caractérisé en ce
qu'il n'est ni un dérivé du triazole tel que décrit dans la demande internationale PCT WO
2007134678 A2 (MERCK) de la ligne 4, page 19 à la ligne 20, page 39 et de la ligne 19, page
45 à la ligne 31, page 50 incorporées ici par référence, ni un dérivé nitré du Naproxène tel que
25 décrit dans la demande PCT WO 2005/030224 A1 (NICOX) de la ligne 1, page 2 à la ligne
14, page 17 incorporées ici par référence.

De manière préférée, un composé selon l'invention est le composé Naproxène de
formule (A) ou un de ses dérivés de formule (B) tels que définis précédemment.

De manière encore plus préférée, un composé selon l'invention est un dérivé de
30 Naproxène de formule (L).

De manière encore plus préférée, un composé selon l'invention est le dérivé de
Naproxène de formule (F).

De manière encore plus préférée, un composé selon l'invention est le dérivé de Naproxène de formule (G).

Toujours de manière préférée, un composé selon l'invention est un triazole de formule (C) ou un de ses dérivés de formules (D) ou (E) tels que définis précédemment.

5 Toujours de manière préférée, un composé selon l'invention est un dérivé du triazole choisie parmi les composés de formules (H), (I), (J) et (K).

10 Selon un quatrième aspect, l'invention porte sur une méthode de traitement d'une infection par un Orthomyxovirus, de préférence un virus Influenza ou un virus Influenza de type A, chez un sujet, laquelle méthode comprend l'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace d'une composition telle que décrite précédemment audit sujet.

Tel qu'utilisé pour la présente méthode de traitement, le terme « sujet » correspond à un mammifère, de préférence ledit sujet est un humain, infecté par un Orthomyxovirus, de préférence un virus Influenza ou un virus Influenza de type A.

15 Les inventeurs ont en effet démontré que l'utilisation d'un composé capable de se lier au niveau du sillon dans lequel se loge l'ARN viral au niveau de la nucléoprotéine des virus Influenza A empêchait la fixation de l'ARN viral au niveau de ladite nucléoprotéine. Les inventeurs ont également démontré que l'absence de fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine aboutissait à l'absence d'oligomérisation de ladite protéine. Ainsi, l'utilisation d'un composé selon l'invention permet non seulement d'inhiber la fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine mais en outre d'inhiber l'oligomérisation de ladite protéine, ces deux inhibitions ayant pour conséquence d'inhiber la réplication virale.

Par « quantité thérapeutiquement efficace », on entend une quantité suffisante pour aboutir à l'effet biologique désirée, dans le présent cas une diminution du titre viral résultant d'une infection par un virus Influenza de type A.

25 Le composé selon l'invention peut être administré en une ou plusieurs fois, la quantité dudit composé étant alors ajustée en fonction du nombre d'administrations envisagées. Ainsi, la quantité de composé à administrer pour le traitement d'une infection par un virus Influenza de type A selon l'invention peut être comprise en 0,1 milligrammes (mg) et 2000 mg par jour.

30 L'homme du métier sera à même de déterminer ladite quantité thérapeutiquement efficace au regard de ses connaissances générales (voir par exemple e.g., Berkow (1987), infra, Goodman (1990), infra, Avery (1987), infra, Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and

Co., Boston, Mass. (1985), and Katsung (1992), *infra*) et/ou à l'aide de simples expériences de routine.

Selon un cinquième aspect, l'invention porte sur un procédé d'identification d'un composé ayant la propriété de se lier au niveau du domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine des virus Influenza de type A, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

a) Modéliser la structure en trois dimensions (3D) de la nucléoprotéine d'un virus Influenza de type A ;

b) Générer un modèle en 3 dimensions (3D) dudit domaine de liaison de l'ARN viral (Figure 5) sur ladite nucléoprotéine à partir de la structure obtenue en a):

- Ledit domaine comprenant les acides aminés Arg65, Gln149, Tyr148, Arg150, Arg152, Arg156, Arg174, Arg175, Arg195, Arg199, Arg213, Arg214, Arg221, Arg236, Pro354, Arg355, Lys357, Arg361, Arg391, Lys184, Lys198, Gly212, Ile217, Ala218, Lys227, Lys229, Lys273 et Val353 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1 de préférence tout acide aminé situé à une distance de moins de 5

- Ledit domaine étant délimité par deux boucles, la première boucle comprenant les résidus acides aminés Glu73 à Lys90 et la deuxième boucle comprenant les résidus acides aminés Gly200 à Arg214 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1.

c) Cribler un ou plusieurs composés sur le modèle en 3D du domaine de liaison selon b) ;

d) Identifier un composé capable de se lier dans un site formant une sphère d'au moins 12 ångströms (Å) de diamètre centrée sur le résidu Tyr 148, appartenant audit domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine, ledit composé étant susceptible d'inhiber la fixation de l'ARN à la nucléoprotéine des virus Influenza de type A et pouvant donc potentiellement être utilisé comme un inhibiteur de la réplication virale.

De manière préférée, une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1 est la séquence SEQ ID N°2.

De préférence, le domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine d'un virus Influenza de type A tel que défini précédemment a la forme d'un sillon logé au centre de la nucléoprotéine tel que représenté sur la figure 2.

On entend par « structure en trois dimensions (3D) » en référence à une protéine la conformation de ladite protéine dans l'espace obtenue à partir de la séquence primaire de cette protéine consistant en succession linéaire d'acides aminés.

La modélisation de la structure de la nucléoprotéine des virus Influenza de type A en trois dimensions (3D) à partir de la séquence primaire de ladite protéine est une méthode connue de l'Homme de l'art qui sera à même de la reproduire avec les méthodes à sa disposition et connues dans le domaine. La modélisation de la structure 3D de ladite nucléoprotéine peut notamment être reproduite à partir de la structure de la nucléoprotéine d'un virus Influenza telle que celle de la souche H1N1 accessible sous les références PDB ID:2IQH ou MMDB ID : 43435 (Ye Q., Krug R.M. et al, 21 décembre 2006, Nature, vol.444 (7122), pp:1078-82).

La modélisation en 3D du domaine de liaison selon l'invention consiste à concevoir à l'aide d'un logiciel de modélisation la structure tridimensionnelle dudit domaine par ajout, soustraction ou modification de ses constituants, par exemple les acides aminés, à partir de la structure cristalline de la nucléoprotéine telle que définie précédemment.

Le terme « cribler » définit la méthode qui consiste à tester plusieurs composés avec le domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine des virus Influenza de type A en trois dimensions en vue d'identifier un composé capable de se fixer audit domaine ainsi que son activité.

Selon un autre mode de réalisation, le procédé d'identification selon l'invention comprend une étape complémentaire e) consistant à tester *in vitro* la capacité d'un composé identifié selon l'étape d) à inhiber la fixation de l'ARN viral sur la nucléoprotéine ainsi que la réplication virale.

Des tests *in vitro* en vue de déterminer la capacité d'un composé à inhiber la fixation de l'ARN viral sur la nucléoprotéine ainsi que l'efficacité de traitement d'une infection virale par un virus Influenza de type A sont exemplifiés ci-après dans la présente demande et sont connus de l'Homme de l'art.

De manière préférée, le procédé d'identification selon l'invention comprend en outre une étape (f) consistant à sélectionner un tel composé comme étant un inhibiteur de la réplication virale.

Les exemples suivants détaillent l'invention en faisant référence à diverses méthodes. Aucune limitation de l'invention ne doit être considérée au regard du détail de ces exemples.

L'invention comprend tout mode de réalisation qui comprendrait des détails non mentionnés de manière explicite dans les exemples suivants, mais que l'Homme de l'art sera capable de trouver sans effort déraisonnable.

EXEMPLES

5 1) Méthode d'identification de composés capable de se lier au domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine de virus Influenza A

Le criblage selon l'invention comprend plusieurs étapes, toutes effectuées *in silico* par modélisation moléculaire et détaillées ci-dessous. Ce criblage permet d'identifier des molécules potentiellement inhibitrices de la fixation de l'ARN viral à NP. Ces molécules sont
10 extraites de chimiothèques commerciales, dans le cas présent, la chimiothèque utilisée était le catalogue Sigma.

La modélisation est basée sur la structure cristallographique de la nucléoprotéine (NP) de références PDB ID:2IQH ou MMDB ID : 43435 (Ye Q., Krug R.M. et al, 21 décembre 2006, Nature, vol.444 (7122), pp :1078-82) et à laquelle les résidus manquants ont été
15 rajoutés. Cette structure a été minimisée avant le criblage effectué à l'aide du logiciel commercial Discovery Studio accessible à l'adresse suivante : <http://accelrys.com/products/discovery-studio/structure-based-design.html>, en utilisant le catalogue Sigma (version 2008) en tant que chimiothèque. Les coordonnées 2D fournies ont été transformé en coordonnées 3D nécessaires au logiciel. La séquence de la nucléoprotéine
20 correspond à la séquence SEQ ID N°1.

La région ciblée dans NP est constituée par une sphère de rayon 12Å centrée sur le résidu Y148. Y148 permet de « docker » l'inhibiteur par des interactions d'empilement de type π - π . Cette sphère comprend de plus les résidus chargés R361 et R152 formant des liaisons électrostatiques ou des liaisons H avec l'inhibiteur, dans certains cas, les résidus
25 R150 et Q149 sont aussi engagés dans des liaisons H. Les simulations de dynamique moléculaire de NP et de deux de ses mutants R416A, R361A ont été réalisées à l'aide du logiciel NAMD (Phillips, J. C et al (2005), Journal of Computational Chemistry, vol.26, pp :1781-1802) utilisant le champ de force du programme CHARMM27 (MacKerell, A. D *et al*, Biopolymers , vol. 56, pp : 257-265) basées sur la structure publiée de la nucléoprotéine de
30 H1N1 (2IQH).

Les portions manquantes dans cette structure cristallographique ont été générées à l'aide de SWISS-MODEL. Le solvant a été traité de façon explicite par le modèle (TIP3P)

pour les molécules d'eau (Jorgensen, W. L *et al*, 1983, Journal of Chemical Physics, vol. 79, pp : 926-935). Le monomère A de NP a été centré dans un cube d'eau de 155.4 Å de côté. Les interactions électrostatiques ont été calculées sans être tronquées par l'algorithme d'Ewald et le système a été neutralisé par l'ajout de 16 ions chlorures (Darden, T., *et al*, 1993, Journal of Chemical Physics, vol. 98, pp : 10089-10092). Les interactions de van der Waals ont été annulées de façon progressive entre 10.0 Å et 12.0 Å. Les atomes d'hydrogène ont été générés par l'algorithme SHAKE (Ryckaert, J. P *et al*, 1977, Journal of Computational Chemistry, vol. 23, pp :327-341), des itérations des équations de mouvement par pas de 2 fs ont été produites par intégration Verlet des vitesses. Un algorithme de minimisation du gradient d'énergie a été utilisé et les molécules du soluté (protéine) ont été restreintes à leur position initiale par une force de 50.0 kcal/mol/Å², de sorte de générer un gradient d'énergie potentielle RMS de 0.2 kcal/mol/Å. Ces contraintes ont été annulées et l'énergie potentielle minimisée jusqu'à ce que le gradient soit inférieur à 0.1 kcal/mol/Å. Le système a été chauffé à 300 K en 60 ps. Les simulations de dynamique moléculaire ont été utilisées pour équilibrer le système pendant 1ns, puis cinq trajectoires de 10 ns chacune ont permis de générer les structures de NP WT (foncées) et son mutant R361A (claires) (Figure 1).

La modélisation moléculaire a été utilisée pour définir et analyser la structure de la forme monomérique de NP, se basant sur la structure obtenue par cristallographie. Dans cette structure, la position des parties flexibles n'est pas résolue et la modélisation a rajouté ces boucles flexibles manquantes générées à l'aide de SWISS-MODEL.

Les protéines mutées R416A et R361A ont été créées à partir de la structure de la protéine sauvage (Wild-type ou wt). La dynamique moléculaire de chacune des trois protéines, wt, R416A et R361A a été simulée lors de cinq trajectoires indépendantes pendant 10 ns (10^{-8} s) par pas de 2 fs (10^{-15} s) pour comprendre comment sont régies les interactions à longue distance dans NP et induisant des modifications de l'association à l'ARN dans les mutants R361A et R416A. La dynamique de ces protéines placées dans des boîtes de solvant explicite a été analysée en calculant les fluctuations moyennes R416A (root mean squared fluctuations (RMSF)) du squelette protéique durant l'ensemble des trajectoires durant 50 ns.

La Figure 3 montre l'existence de 3 régions flexibles possédant une grande dynamique et donc un RMSF flexible significativement plus élevé que le reste de la protéine. Il s'agit de trois boucles flexibles, les deux premières encerclant le sillon de fixation de l'ARN sur l'une des faces de NP, Glu73 to Lys90 (boucle 1) et Gly200 –Arg214 (boucle 2). La troisième boucle se trouve sur l'autre face de NP et correspond au domaine d'oligomérisation (402-

428) d'un monomère pénétrant dans le monomère voisin au sein du trimère dans la structure cristallographique. Il est intéressant de constater la baisse significative de la fluctuation moyenne de la boucle 2 des mutants R416A et R361A par rapport à celle de NP. Ces modifications de flexibilité de la boucle 2 sont corrélées avec une faible augmentation des fluctuations de la boucle 1 chez les mutants par rapport à la protéine sauvage. Des modifications de la dynamique de la boucle d'oligomérisation (boucle 3) ont été observées en parallèle, cependant cette région de R416A devient plus mobile que NP, en accord avec l'absence d'oligomérisation de ce mutant. La boucle 3 du mutant R361A devient moins mobile que NP, suggérant une meilleure capacité d'oligomérisation, ce qui corrèle bien avec une proportion accrue de ce mutant en forme dimérique par rapport à la forme monomérique sauvage.

La Figure 1 présente une structure représentative de la NP sauvage (en foncé): les acides aminés wt : the R361 et R416 se trouvent dans le sillon de fixation de l'ARN et dans la boucle 3 d'oligomérisation respectivement. Les boucles 1, 2 et 3 du mutant R361A sont superposées en clair. On voit clairement que la boucle 1 du mutant R361A est très proche de la boucle 2, cette proximité est stabilisée par un pont salin entre Glu80 et Arg208, en accord avec la baisse de RMSF de la boucle 2 de R361A. Ceci contraste avec la cavité large et ouverte observée dans la protéine sauvage, qui peut aisément accommoder un ARN. Ces observations sont également observées dans le trimère de NP (16). Les boucles 1 et 2 de NP WT pourraient donc aider à accrocher l'ARN et le guider vers son sillon de fixation. Donc, lorsque la distance entre les boucles 1 et 2 devient faible chez R461A et R361A, la pince formée par ces 2 boucles devient trop étroite pour s'adapter à la taille de l'ARN. Ceci a pour conséquence de réduire l'accessibilité de l'ARN à son sillon de fixation chez les mutants comparé à celle de NP sauvage. R416A et R361A présentent en effet une affinité plus faible pour l'ARN que celle de NP et de plus une vitesse d'association plus faible. Les changements constatés dans la structure de la boucle 3 de R361A comparée à celle de NP alors que la mutation est introduite sur l'autre face de la protéine (dans le sillon de fixation de l'ARN) sont en accord avec l'hypothèse d'interactions à longues distances dans NP. Ces données sont publiées dans l'article : Tarus B, Chevalier C, Richard C-A, Delmas B, Di Primo C, et al. (2012) Molecular Dynamics Studies of the Nucleoprotein of Influenza A Virus: Role of the Protein Flexibility in RNA Binding. PLoS ONE 7(1): e30038. doi:10.1371/journal.pone.0030038

La figure 4 montre la fixation du naproxène dans le sillon de fixation de l'ARN de la nucléoprotéine (représentation indiquant le potentiel électrostatique, les zones bleues foncées étant positivement chargées et donc permettant la fixation de l'ARN) ; le zoom dans la partie droite montre les résidus impliqués dans l'interaction, à la fois par formation de liaisons électrostatiques avec R361 (R355) ou polaire (N149) et hydrophobes avec Y148, F489.

2) Protocole démontrant la fixation du Naproxène et du triazol à la nucléoprotéine en compétition avec l'ARN viral

a) Test de résonance de plasmon de surface

Le premier test effectué pour démontrer la fixation du Naproxène en compétition avec l'ARN viral sur la nucléoprotéine de séquence SEQ ID N°2 est un test de résonance de plasmon de surface (BIAcore 3000). La manipulation a été effectuée selon les indications du fabricant (BIAcore SA).

Un fragment d'ARN viral a été fixé à une puce d'or recouverte de Dextran avec de la streptavidine qui lie de façon quasi irréversible l'extrémité biotinylée du fragment d'ARN. La fixation des fragments ARN à la puce d'or a été effectuée dans du PBS. Les mesures des signaux ont été effectuées avec 300 mM de NaCl, 20 mM de tampon Tris-HCl contenant également 0.025% de surfactant P20 à un pH de 7.4 et à une température de 25°C.

Les séquences des fragments d'ARN viral utilisés sont listées dans l'exemple 4.

Les nucléoprotéines ont été injectées à des concentrations allant de 4 à 1000 nM. Les mesures ont été effectuées à une température de 25°C. Les échantillons ont été injectés à une vitesse de 25 µl/min *flow rate*.

La liaison de la nucléoprotéine à l'ARN a provoqué un changement d'indice de réfraction proportionnel au poids moléculaire de la protéine et à la concentration de la protéine jusqu'à saturation (voir l'exemple 4 et la figure 6).

En comparant le signal obtenu en présence de NP WT seule au signal obtenu après ajout de Naproxène à la protéine sauvage, on a observé une baisse de signal lié à la présence de naproxène contrairement à l'observation d'une fixation de la nucléoprotéine à l'ARN biotinylé en seule présence de la protéine, la nucléoprotéine ne se fixe plus à l'ARN biotinylé mais a formé un complexe avec le Naproxène, indiquant de ce fait une compétition du Naproxène avec la fixation de la protéine à l'ARN viral (Figure 16A).

b) Test « molecular beacon »

Un deuxième test utilisant un oligonucléotide nommé « molecular beacon » a été mis au point pour démontrer la fixation par compétition du Naproxène à la nucléoprotéine de SEQ ID N°2 (voir schéma Figure 18).

Un beacon est un oligonucléotide de séquence quasi-palindromique formant une épingle à cheveux (hairpin) et dont les extrémités 5' et 3' sont modifiées par un fluorophore et un quencher. Le beacon utilisée ici est un beacon de séquence SEQ ID N°8 dont l'extrémité 5' est greffée par un chromophore Cy5 et l'extrémité 3' par un quencher DAPCYL.

En l'absence de protéine, la fluorescence est éteinte : le fluorophore était proche du quencher lorsque l'oligonucléotide est apparié. La nucléoprotéine se fixant préférentiellement sur des ARN simple brin, sa fixation sur le beacon a induit l'ouverture de l'épingle à cheveux, ce qui se traduit par une augmentation de fluorescence, les 2 extrémités 5' et 3' se retrouvant éloignées l'une de l'autre.

Ce test a donc permis de suivre par fluorescence la fixation de la protéine de façon quantitative.

Il a été observé qu'en présence de Naproxène, la fluorescence diminue : la nucléoprotéine se fixant au Naproxène et non à l'ARN, les extrémités en épingle à cheveux de ce dernier n'ont pas été écartées par compétition du naproxène empêchant la fixation de la nucléoprotéine à l'ARN

3) Approche de mutagenèse dirigée démontrant que la mutation des résidus de NP nécessaires à la fixation de Naproxène (N) abolit l'inhibition.

Le test de résonance de plasmon de surface tel que décrit dans l'exemple 2) a également été réalisé avec des protéines mutées au niveau des acides aminés R361A et Y148A. Il a été observé que le naproxène n'entre plus en compétition avec l'ARN, comme attendu par les interactions définies par modélisation moléculaire (Figure 4). Lorsqu'on utilise une protéine mutée, en particulier R361A et Y148A, le naproxène n'entre plus en compétition avec l'ARN. Les acides aminés R361 et Y148 sont donc essentiels pour la fixation de l'ARN ou du naproxène à la nucléoprotéine des virus Influenza A (Figure 4, Figure 16 A et B et Tableau 2 page 47).

4) Caractérisation de l'association de NP à l'ARN et corrélation avec l'oligomérisation de NP

- Cintéiques d'association de NP et des mutants R416A et R361A à des ARN simple brin

Les cinétiques d'association de la nucléoprotéine NP et des mutants R416A et R361A à des ARN simple brin ont été suivies par résonance de plasmon de surface (SPR) tels que décrits dans l'exemple 2. Les vitesses d'association et dissociation de NP à une même séquence d'ADN, ARN et ARN et 2'-O-méthyl ont été comparées. Les résultats sont

5 regroupés dans le tableau 1 avec :

- La séquence Flu1 24-mer de nature ADN correspond à SEQ ID N°5 :
- La séquence Flu1 24-mer de nature ARN correspond à SEQ ID N°6 :
- La séquence Flu1 24-mer de nature 2'O-méthyl RNA correspond à SEQ ID N°6 avec le sucre ribose modifié de telle sorte qu'il porte en position 2' un groupement méthyl
- 10 - La séquence rU25 25-mer de type ARN correspond à SEQ ID N°7

Tableau 1 vitesses d'association et dissociation de NP à une même séquence d'ADN, ARN et ARN et 2'-O-méthyl

Séquence	NP	Nature	$k_{on} M^{-1}s^{-1}$	$k_{off} \text{ calculé } s^{-1} \pm 25\%$	Kd (nM)	RU(plateau) /RU max*
Flu1 24-mer	wt	ADN	$1.1 \pm 0.2 \times 10^5$	1.1×10^{-2}	105 ± 15	0.9
Flu1 24-mer	wt	-2'Ome ARN	$9.5 \pm 1.7 \times 10^4$	1.1×10^{-2}	115 ± 10	0.74
Flu1 24-mer	wt	ARN	$1.8 \pm 0.3 \times 10^5$	0.7×10^{-2}	41 ± 7	0.65
rU25 25-mer	wt	ARN	$8.5 \pm 1.2 \times 10^4$	0.4×10^{-2}	45 ± 8	1.1
Flu1- 24-mer	R361A	ARN	$3.1 \pm 0.5 \times 10^4$	1.2×10^{-2}	400 ± 100	0.9
Flu1- 24-mer	R416A	ARN	500 ± 150	0.5×10^{-2}	$10 \pm 3 \mu M$	~0.66

Les données représentent la moyenne de 3 expériences.

**Le rapport du signal observé à hautes concentrations de protéines sur la valeur de RU maximum attendue a été calculé connaissant le poids moléculaire de NP et celui d'un oligonucléotide partiellement complémentaire à la sonde FLU1 immobilisée sur la puce.*

Les valeurs de k_{off} ont été calculées à partir des valeurs expérimentales de K_d et k_{on} .

5 Ces résultats montrent la formation de complexes ARN-protéine avec une stoechiométrie de 1/1. Ces protéines monomériques fixent donc d'abord l'ARN et l'oligomérisation a lieu ultérieurement. L'association de wt NP résulte en la formation rapide d'un complexe NP-RNA avec une stoechiométrie 1:1. Le tableau 1 montre une baisse d'un facteur 10 de l'affinité de R361A compare à celle de NP sauvage.

10 La Figure 6 compare les signaux résultant de la fixation de NP à ceux obtenus avec une même concentration (300 nM) de R416A et R361A. Le mutant R416A ne se fixe pas à Flul-RNA, mais on peut déterminer une affinité de $K_d = 10 \pm 3 \mu M$ en utilisant des concentrations de R416A 1-100 μM . Voir publication : Bogdan Tarus, Olivier Bakowicz, Sylvie Chenavas, Leandro Estrozi, Christophe Chevalier, Christiane Bourdieu, Julie Bernard,
15 Mohammed Moudjou, Bernard Delmas, Carmelo Di Primo, Rob WH Ruigrok and Anny Slama-Schwok : Multiple oligomerization paths of the nucleoprotein from Influenza A virus (2012) Biochimie: 94 776-785. doi.10.1016/j.biochi.2011.11.009)

- Corrélation entre la vitesse d'association de NP à l'ARN et la vitesse apparente d'oligomérisation de NP et de ses mutants.

20 Des techniques supplémentaires comme la diffusion de lumière (dynamic light scattering, DLS) et la microscopie électronique (EM) ont été utilisées pour suivre le processus lent d'oligomérisation et en vue d'effectuer une corrélation entre la vitesse d'association de NP à l'ARN et la vitesse apparente d'oligomérisation de NP et de ses mutants. L'effet de la longueur de l'oligonucléotide et la nature de l'acide nucléique (DNA vs RNA) sur la cinétique
25 d'oligomérisation de NP ou de son mutant R361A ont été testés. Les images de EM corroborent les échelles de temps dans lesquelles s'effectue l'oligomérisation de NP en présence d'ARN et définissent la forme des oligomères formés RNA en fonction de la longueur de l'ARN.

La vitesse de fixation de NP à l'ARN et la vitesse d'oligomérisation de NP et de ses 2
30 mutants en présence d'ARN sont bien corrélées. La vitesse de formation du complexe 1/1 de NP ou des mutants R416A et R361A est corrélée avec la vitesse apparente d'oligomérisation (Figure 7). L'association anormale de R416A à l'ARN est associée à un défaut d'oligomérisation. De même, la réduction de la vitesse d'association de R361A est aussi

associée à une vitesse d'oligomérisation faible (déterminée en ajustant par une exponentielle les points expérimentaux obtenus par diffusion de lumière d'augmentation de taille apparente de $(6.8 \pm 0.5 \text{ nm})$ à $(11 \pm 1 \text{ nm})$ en fonction du temps). Avec NP aussi, lorsque la vitesse d'association à l'ARN augmente, la vitesse d'association de NP monomère en oligomères augmente. Ceci suggère un "dialogue" (crosstalk) entre le domaine de fixation à l'ARN et la boucle d'oligomérisation.

5) Protocole d'essai *in vitro* de l'effet antiviral de N sur des cellules MDCK infectées par la souche Influenza A/33/WSN.

Des cellules MDCK ont été mises en culture à 80% de confluence à 37°C en présence de 5% de CO₂ et d'antibiotiques dans un milieu minimum (EMEM, Sigma, L-glutamine, Gibco et NAHCO₃ 7.5%) en présence de 5% de sérum de veau fœtal sur plaques à 12 puits (0.32×10^6 cellules/puits) pour 24 heures. Les cellules ont été rincées par du milieu sans sérum et l'inoculum (400µl) de virus Influenza A/WSN/33 a été mis à adsorber une heure sur les cellules à une multiplicité d'infection (MOI) de 10^{-3} (étude cinétique) ou MOI 1 ou 5 (visualisation de l'effet à 24h et comparaison avec un autre antiviral). Après rinçage de l'inoculum, les cellules ont été mises à incuber avec différentes concentrations de naproxène (1 à 500 µM). Des cellules non infectées ont également été soumises à des incubations en parallèle avec des concentrations variables de naproxène. Le virus en se répliquant a été excrété dans le surnageant de culture dont on a prélevé des échantillons à 24, 48 et 72 heures post-infection (Figure 8). Le titre viral de ces prélèvements a été mesuré par la méthode de plaque de lyse. Brièvement, des cellules MDCK ont été mises en contact avec des dilutions sériées des surnageants cellulaires et incluses dans de la carboxyméthylcellulose. Les plages de lyse générées par le virus ont été révélées par fixation des cellules au formaldéhyde et marquage au cristal violet. Le comptage du nombre de plaques selon la dilution des surnageants cellulaires a permis d'établir le titre viral.

Les résultats de la figure 8 présentent une moyenne des résultats sur 6 expériences réalisées à concentrations croissantes de naproxène. Ainsi, on observe que plus la concentration en naproxène utilisée est grande, plus les titres viraux diminuent rapidement.

Certaines expériences ont été réalisées en parallèle en présence de naproxène et de tamiflu afin de comparer leur effet antiviral. La figure 9 montre que le titre viral diminue de façon similaire avec un traitement avec du Naproxène qu'avec du tamiflu dans le cas d'une multiplicité d'infection MOI=1 et démontre l'efficacité antiviral du naproxène comparativement au tamiflu.

6) Protocole d'essai *in vitro* de l'effet antiviral sur des cellules A549 de poumon humain contre un challenge viral H1N1 souche WSN par immunofluorescence

Les cellules A549 ont été mises en culture pendant 24 heures sur des lamelles de microscope déposées au fond de puits de plaques P6. Le même protocole que ci-dessus a été
5 suivi pour les mesures d'immunofluorescence. Les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde à 3 heures ou 24 heures post-infection et l'on a procédé au marquage primaire par rajout d'un anticorps monoclonal de souris anti-NP. L'ajout d'un anticorps secondaire anti-souris marqué à la fluorescéine (FITC) a permis une lecture directe par fluorescence. Les cellules ont également été traitées au DAPI, permettant un marquage des
10 noyaux. Ce double marquage a permis de révéler la localisation nucléaire de la NP et son éventuelle modification liée à la présence d'antiviraux. Comme dans les expériences précédentes, des cinétiques ont été réalisées à différents temps post-infection, 3 heures et 24 heures et différentes MOI de 1, 5 et 10.

Les résultats ont montré que le naproxène n'a pas modifié la localisation de la
15 nucléoprotéine, qui est essentiellement nucléaire à temps $t=3$ heures alors que l'on a trouvé que la NP diffuse dans le cytoplasme et le noyau à $t=24$ heures. La présence de naproxène (50 à 100 μM) a diminué le nombre et la taille des foyers infectieux dans le tapis cellulaire et le nombre de cellules mortes. On a remarqué que de nombreux noyaux doubles étaient présents dans les cellules traitées à de hautes concentrations de naproxène, en accord avec une
20 augmentation du nombre de cellules en phase S rapportée dans la littérature.

7) Protocole du test de viabilité cellulaire MTT démontrant l'absence de cytotoxicité aux concentrations utilisées

Le test MTT (basé sur l'utilisation d'un sel de tétrazolium) est un test de viabilité cellulaire reposant sur l'activité mitochondriale. Ce sel est réduit par la succinate
25 déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en formazan, ce qui provoque un changement de couleur du jaune au bleu-violet qui peut être quantifié par un changement d'absorbance à 560 nm. Nous avons utilisé ce test pour montrer la non-toxicité de nos composés mis en présence de cellules A549 de poumon humain. 30 000 cellules par puits ont été ensemencées sur des plaques 24 heures avant le début de l'expérience. Les antiviraux ont
30 été rajoutés à des concentrations de 1 à 500 μM aux cellules pendant 24H ou 48H avant révélation. Le MTT a alors été fraîchement dissous dans du PBS (5mg/ml) puis rajouté (20 μl par puits) et incubé pendant une heure à 37°C. Les cellules ont été rincées et séchées avant

ajout de 100µl de DMSO par puits. La lecture a été faite à 560 nm en soustrayant le bruit de fond à 670 nm.

La figure 10 montre que le naproxène n'est pas toxique pour les cellules A549 après incubation de 48H, et qu'au contraire, il favorise leur croissance, en particulier après 24H.

5 8) Protocole d'essai *in vivo* de l'effet d'un traitement avec naproxène chez la souris

L'efficacité antivirale du naproxène a été testée *in vivo* sur des souris femelles Balb/C de 6 semaines (gardées à l'animalerie une semaine sans traitement particulier). Au jour j+7 de leur arrivée, les souris ont été inoculées ou non par 2000 pfu/ml de virus Influenza A/PR8/34 (10 souris par condition) par voie intranasale. D'éventuels effets cytotoxiques du naproxène ont été testés en comparant des souris non traitées (sans virus) à des souris traitées une fois par jour à des doses de 1mg ou 3 mg par souris (en l'absence de virus). Le virus a été inoculé par voie intranasale sous anesthésie (kétamine /xylazine). Le naproxène a été administré juste après par voie intrapéritonéale (1 ou 3, anciennes données) et (1, 3, 4, 8 mg, nouvelles données) dans 50µl de sérum physiologique).

La courbe de poids de chaque souris est enregistrée chaque jour, pendant 7 jours. Les courbes de poids sont représentées sur les figures 11 A et 12 et ont été rapportées au poids mesuré au jour de l'infection et correspondent à des moyennes de poids sur un échantillon de 10 à 15 souris. Dans le cas de la figure 11A, la figure est représentative de 3 expériences, réalisées avec une charge de 2000 pfu PR8 administrée en intra-nasal. La figure 12 est représentative de 2 expériences avec une charge virale d'environ 50 pfu (0.01LD50). Les souris ont été sacrifiées après une semaine sans constat de décès. Un lavage broncho-alvéolaire a été effectué avant prélèvement des poumons pour détermination du titre viral. Un échantillon des lavages broncho alvéolaires a été déposé sur lame par centrifugation à l'aide d'un cytopspin sur une lame. Les cellules fixées ont été marquées par coloration de May Grunwald, permettant de déterminer la présence ou non d'une inflammation des poumons liée à l'infection virale, en particulier reflétée par un changement du nombre total de cellules. Sur la figure 13, A3 correspond à poumons de souris infectés, F2 correspond à des poumons de souris non infectées E1 correspond à des souris traitées avec 3 mg de naproxène. Le chiffre présent sous l'indication du type de souris analysé dans la figure 13 correspond à l'indice explicitant la perte de poids. Ainsi, les souris E1 enregistrent respectivement une perte de poids de 19% (indices de 0,79) tandis que les souris A3 enregistrent une perte de poids de 31% (indice 0,69) comparativement à une souris dont les poumons ne sont pas infectées (indice 1,01 soit 101% du poids initial).

Il a également été constaté un changement de populations cellulaires, essentiellement composées de macrophages alvéolaires dans un poumon sain (F2), alors que la présence de neutrophiles et d'éosinophiles ainsi que de globules rouges est caractéristique de poumons sanguinolents infectés par le virus (figure 13).

Les poumons des souris sacrifiées ont été broyés et congelés pour la détermination des titres viraux. Les résultats montrent une baisse d'environ un facteur 100 par administration de 0.2 mg tamiflu et d'un facteur 42 en administrant 2x4 mg naproxène par voie IP du titre viral des souris infectées traitées à 1 mg de naproxène par rapport aux témoins infectés non traités (figure 11B).

9) Design de dérivés du Naproxène et docking dans la nucléoprotéine NP de virus Influenza

Une seconde génération de composés dérivés du Naproxène a été construite : Construction du dérivé A du Naproxène, présentement appelé dans la demande « dérivé du Naproxène A » ou « Naproxène A » dans le but d'augmenter l'affinité pour NP par rajout d'un groupement chargé négativement (fragment-based design).

Par la suite, un test de la stabilité du complexe NP-dérivé Naproxène A par simulations MD (10 ns) a été effectué.

Le dérivé Naproxène A a ensuite été modifié en dérivés Naproxène B, c0, c1, c2 et c3. Les trois derniers composés correspondent à un changement du groupement OCH3 (groupement méthoxy du Naproxène). Les résultats in silico des dérivés Naproxènes B, c1, c2 et c3 ne sont pas présentés ici.

La figure 14 compare les composés Naproxène, dérivé du Naproxène A et c0 à la fin des 10 ns de MD. Les résidus de NP engagés dans l'interaction avec les dérivés Naproxènes A et c0 sont : R355, R152, N149, interaction plus faible avec Y148 ou R361, en contraste avec le Naproxène.

Les formules chimiques des dérivés du Naproxène A et c0 sont représentées sur la figure 15.

10) Protocole de synthèse chimique de dérivés du Naproxène : les dérivés Naproxène A et c0

a) Synthèse du naproxène A

Le naproxène A est synthétisé en trois étapes selon le Schéma 1. Le 2-bromo-6-méthoxynaphthalène **1**, disponible commercialement, est lithié par n-BuLi et traité par du DMF pour donner le 6-méthoxy-2-naphthaldéhyde **2** avec un rendement de 90%. L'acide glutarique 3-naphthalényle-substitué **3**, ou **naproxène A**, est ensuite obtenu avec un rendement de 65% en deux étapes par réaction du naphthaldéhyde **2** avec deux équivalents d'acétoacétate d'éthyle et une quantité catalytique de pipéridine, suivie d'une hydrolyse en présence d'hydroxyde de potassium aqueuse dans l'EtOH.

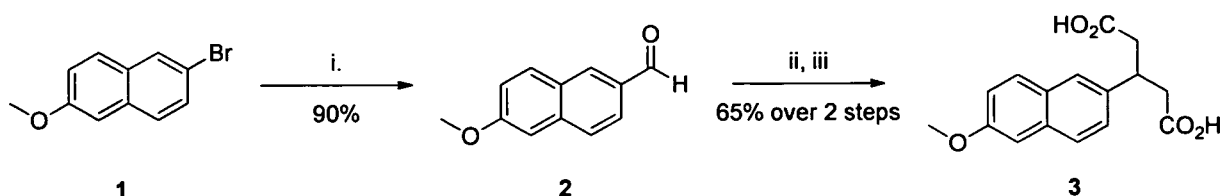


Schéma 1. Synthèse du **Naproxène A** (composé **3**). Réactifs et conditions: i/ n-BuLi (1.12 equiv.), THF anhydre, -78 °C, 30 min puis DMF (2.15 equiv.), -78 °C à température ambiante; ii/ Ethylacetoacetate (2.0 equiv.), EtOH, pipéridine (catalytique), 0 °C à température ambiante, 3 jours (rendement 70%); iii/ aq. KOH (32 equiv., 24 M), EtOH, reflux, 3.5 hrs (rendement 92%).

15

b) Synthèse du naproxène C0

Partant du bromo-*m*-xylene **4**, nous préparons l'intermédiaire 2-bromoisophthalate de diméthyle **6** par oxydation des groupements méthyles par KMnO₄ dans un mélange tBuOH/H₂O³ suivie de l'estérification du diacide carboxylique obtenu **5** dans le MeOH en présence d'H₂SO₄ concentré (Schéma 2, haut). L'ester diméthylrique **8** du **naproxène C0** est synthétisé par un couplage de Suzuki entre le 2-bromoisophthalate **6** et l'acide 6-méthoxy-2-naphthalèneboronique **7** disponible commercialement.⁴ Les conditions utilisées, qui fournissent le composé **8** avec un rendement modeste de 45%, doivent être optimisées. Le **Naproxène C0** (composé **9**) est finalement obtenu après hydrolyse des fonctions esters dans LiOH aqueux et THF avec un bon rendement (91%) et une pureté élevée (Schéma 2, bas).

20

25

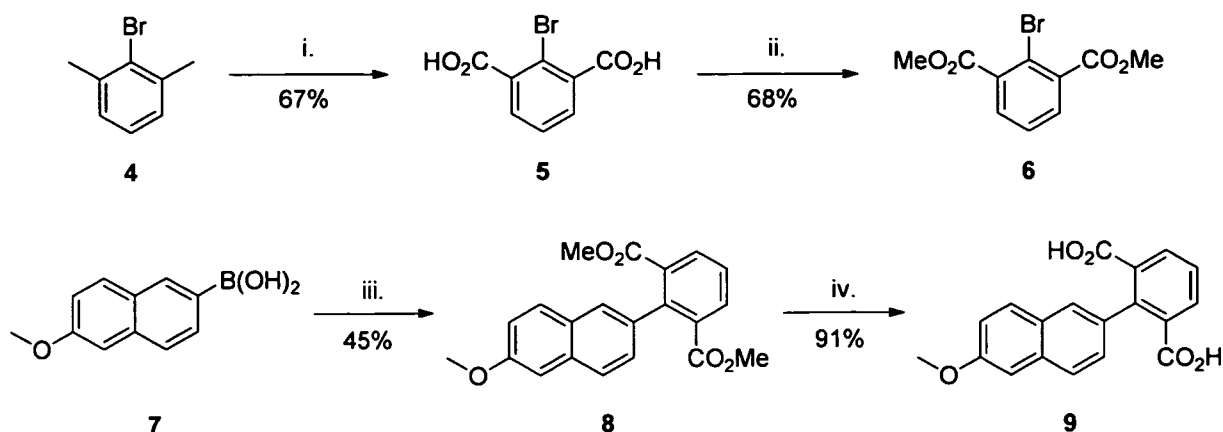


Schéma 2. Synthèse du **Naproxène C0** (composé 9). Réactifs et conditions: i/ KMnO_4 (2.0 equiv.), $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1), reflux, 4 hrs, puis KMnO_4 (2.0 equiv.), reflux, 16 hrs; ii/ MeOH, conc. H_2SO_4 , reflux, 16 hrs; iii/ 2-bromoisophthalate de diméthyle 6 (0.92 equiv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.03 equiv.), aq. Na_2CO_3 (4.2 equiv., 2 M), DME/EtOH, reflux, 16 hrs; iv/ aq. LiOH (7.2 equiv., 1 M), THF, reflux, 4 hrs.

11) Test réalisés *in vitro* avec des nucléoprotéines NP de souches sauvages ou des mutants purifiés et le composé Naproxène ainsi que ses dérivés Naproxène A et Naproxène c0

Méthodes : test de résonance par plasmon de surface (SPR) (voir protocole ci-dessus pour la méthode indirecte avec ARN immobilisé sur une puce streptavidine et injection de NP +/- antiviral).

L'association directe du naproxène à NP a été réalisée à l'aide d'une puce CM5 et NP y a été immobilisée par couplage par les amines comme indiqué par BiaCore. Les protéines mutées R361A ou Y148A ou R355A ou R152A ont été attachées de la même façon sur une autre piste de la même puce à une unité de résonance comparable à celle de NP, gardant une piste témoin pour soustraire les effets non spécifiques. Afin de vérifier que des protéines ne sont pas dénaturées par immobilisation sur la surface, de l'ARN a été injecté dans chaque cas, attestant que ces protéines demeurent au moins en partie actives (Figure 16C)).

Les résultats sont décrits sur les figures 16 et 17 ainsi que dans le tableau 2 ci-dessous.

Le Naproxène entre en compétition avec l'association de l'ARN à NP, cette compétition est mise en évidence par la baisse du signal du complexe NP-ARN, Panel A. Ceci n'est pas observé en présence de protéines mutées dans des résidus impliqués dans

l'interaction NP – naproxène, R361A (ou Y148A), car l'interaction du Naproxène avec R361A est abolie par la mutation (Panel B), en accord avec la modélisation.

Les résultats sont quantifiés, Panel D et tableau 2.

Le Panel C montre la fixation directe du Naproxène à NP liée à la surface mais pas à R361A, les 2 protéines immobilisées demeurant actives et capables de lier l'ARN. Cependant, les signaux sont trop faibles pour une détermination quantitative des Kd.

Les résultats de SPR montrent l'amélioration du Naproxène c0 (par rapport au Naproxène) à entrer en compétition avec l'association de l'ARN à NP (Ki plus bas d'environ un ordre de magnitude) (Fig 17 et Tableau 2). Le Naproxène A a un effet biphasique, introduisant une difficulté dans la caractérisation quantitative du Ki.

Comme attendu par la modélisation, la mutation R152A n'a pas d'effet sur le Naproxène tandis qu'elle réduit l'affinité des dérivés Naproxène A et c0 (Tableau 2). R361A abolit la fixation des tous les dérivés, ce qui est anticipé pour le Naproxène. Le Naproxène ne se fixe pas au mutant R416A, connu pour être un monomère inactif.

Tableau 2 : Inhibition *in vitro* de la liaison de l'ARN viral avec la NP par le Naproxène et ses dérivés (test SPR)

Composé	Protéine	Gamme de concentration du ligand	IC50
Naproxen	NP WT	50nM -50µM	3.3 ± 1.0 µM
Naproxen c0	NP WT	50nM -50µM	0.32± 0.09 µM
Naproxen A	NP WT		0.2 ± 0.1 µM et ~2µM
Naproxen	R152A		2.5 µM
Naproxen c0	R152A		1.2 ± 0.1µM
Naproxen A	R152A		~ 0.4µM
Naproxen	R361A		Pas de liaison
Naproxen c0	R361A		Pas de liaison
Naproxen A	R361A		Pas de liaison
Naproxen	R416A		Pas de liaison

Naproxen	Y148A		Pas de liaison
----------	-------	--	----------------

12) Test de toxicité et effet antiviral du Naproxène et de ses dérivés Naproxène A et Naproxène c0 réalisés par des tests MTT, mesures du titre viral

Le protocole suivi correspond au protocole de test de toxicité tel que décrit ci-dessus.

5 Tableau 3. Tests effectués sur des cellules MDCK non infectées, mesure de la concentration et de la toxicité des composés Naproxène et de ses dérivés Naproxène A et c0

Composé	Test effectué sur des cellules MDCK non infectées	Concentration	
naproxen	MTT 24 ou 48H	2-500 μ M	Pas de toxicité
Naproxen c0	MTT	1-200 μ M	Pas de toxicité
Naproxen A	MTT	1-200 μ M	Pas de toxicité

10 Tableau 4. Tests effectués sur des cellules MDCK infectées, 48h post-infection à faible multiplicité d'infection (MOI) de virus H1N1 (wsn/33), par le test MTT : mesure de l'effet des composés Naproxène et de ses dérivés Naproxène A et Naproxène c0 aux concentrations indiquées sur la viabilité cellulaire et calcul de la protection

Composé	Test effectué sur des cellules MDCK infectées	MOI	Concentration du composé	Protection %
naproxen	MTT 48h	A/wsn / 10^{-3}	10 μ M	25 $\pm$ 2 %
		H1N1	25 μ M	48 $\pm$ 2 %
			50 μ M	47 $\pm$ 2 %
Naproxen A	MTT 48h	A/wsn / 10^{-3}	5 μ M	8 $\pm$ 1 %
			25 μ M	54 $\pm$ 4 %
Naproxen c0	MTT 48h	A/wsn / 10^{-3}	5 μ M	30 $\pm$ 3 %
			25 μ M	77 $\pm$ 5%

15 Tableau 5. Tests effectués sur des cellules MDCK infectées, 24h post-infection à différents titres viraux (MOI) de virus H3N2 : mesure de la viabilité cellulaire aux concentrations du composé Naproxène indiquées et calcul de la protection

Composé	Test effectué sur des cellules MDCK infectées	MOI	Concentration du composé	Protection %
naproxen	MTT 24h	A/Udorn / 1	100µM	19± 2 %
		H3N2	500µM	45 ± 2 %
Naproxen	MTT 24h	A/Udorn / 10 ⁻¹	100µM	85± 2 %

Les résultats montrent que le Naproxène a un effet antiviral sur la souche H1N1 wsn et H3N2 udorn d'après les tests MTT. Les résultats des déterminations des titres viraux en cellules (wsn, Figure 8) et in vivo (Figures 11 et 12) sont déjà résumés sous forme de figure.

5

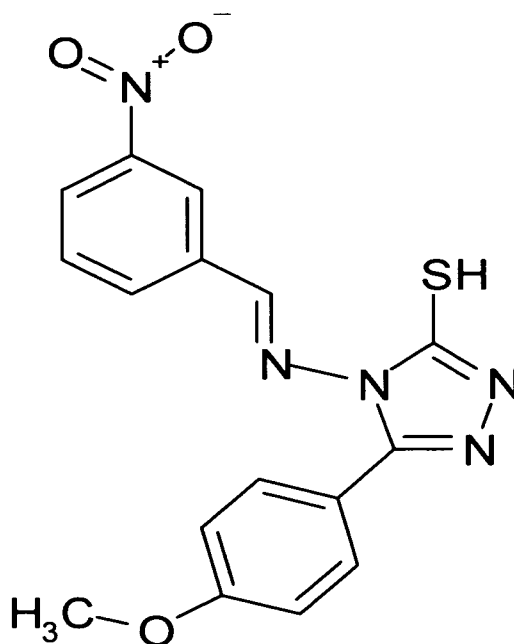
13) Docking d'un dérivé du triazole, le composé L410, dans NP

Un docking du composé L410 a été réalisé au niveau de la nucléoprotéine selon le protocole tel que décrit ci-dessus.

10

La formule du composé L410 dérivé du triazole est la suivante :

Composé L410



15

Suite à ce docking, il s'avère que les résidus de NP de virus Influenza A impliqués dans l'interaction avec le composé L410 sont les suivants : R150, Y148, R361, Gln149 .

14) Tests in vitro de l'efficacité du composé dérivé du triazole L410 sur des NP WT purifiées

a) Fluorescence:

5 Les mesures de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un fluorimètre Jasco équipé d'un porte-échantillon thermostaté à 20°C. Une séquence formant une tige-boucle a été utilisée : 5' AUA UAU AUC GAC AUA GAU AUA UAU 3' (SEQ ID N°9), les bases soulignées étant engagées dans un appariement et formant la tige. Cette tige boucle possède un fluorophore R= Cy3 en 5' et un quencher Q (dabcyl) en 3' (voir figure 18). La fixation de
10 NP induit l'ouverture de la tige-boucle, éloignant R de Q, se traduisant par une exaltation de fluorescence. R est excité à 525 nm, la fluorescence est recueillie entre 535 et 650 nm. Les spectres d'excitation correspondants ont été obtenus à $\lambda_{em} = 580$ nm, λ_{exc} variant entre 440-570nm. Les échantillons ont été préparés à une concentration de tige-boucle de 100 nM avec et sans NP (50 nM – 3µM) dans 20 mM Tris à pH=7.4 contenant 50 mM NaCl.

15 b) Expériences de résonance de plasmon de surface

Les cinétiques d'association des complexes NT-ARN avec et sans antiviral ont été obtenues à l'aide d'un appareil Biacore 3000 en utilisant des puces recouvertes de streptavidin (SA, Biacore) et conditionnées comme recommandé par BiaCore. L'immobilisation des oligonucléotides ARN biotinylés sur la puce streptavidine a été réalisée dans du tampon PBS.
20 Les cinétiques ont été obtenues dans un tampon 20 mM Tris-HCl buffer, pH=7.4 contenant 300 mM NaCl et 0.025% de surfactant P20 (BiaCore) à 20 °C. Avant leur immobilisation, les oligonucléotides ont été dénaturés à 80°C and renaturés à température ambiante pendant une heure. Les protéines NP sauvage ou ses mutants ont été injectés à des concentrations de 100 to 500 nM en présence ou absence de 50 nM and 20 µM antiviral, jusqu'à 300µM dans
25 certains cas. Les échantillons ont été injectés à une vitesse de flux de 25µl/min.

c) Résultats:

L'interaction NP- L410 a été évaluée par deux méthodes de compétition indirectes où le complexe L410-NP est formé en compétition avec le complexe NP-ARN.

Par SPR, on suit la protéine, alors que par fluorescence on suit l'ARN marqué. Ces
30 deux méthodes permettent d'évaluer une concentration à laquelle il y a 50% d'inhibition (50% du complexe NP-ARN est détruit) IC50 = 0.2-0.3 µM.

15) Toxicité cellulaire et effet antiviral de composés dérivés du triazole par test MTT

a) Viabilité cellulaire selon le test MTT:

Des cellules A549 ou MDCK (3×10^4 cells/puits) ont été mises en culture dans des plaques P-12 à 37 °C pendant un jour dans du milieu MEM. Des dilutions sériées d'antiviral (0.5-50 ou 1-550 μ M) ont été rajoutées aux cellules qui ont été incubées à nouveau 0 37°C pendant 24 ou 48 heures. A la fin de la cinétique, 20 μ l du réactif MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, 7.5 mg/ml, Sigma) est ajouté aux
5 cellules et incubé à 37 °C pendant 1 h. Après rinçage des cellules, 100 μ l de DMSO est rajouté dans chaque puits. L'absorbance est mesurée à 550 nm après soustraction du blanc à 650 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (PerkinElmer).

b) Effet antiviral des composés.

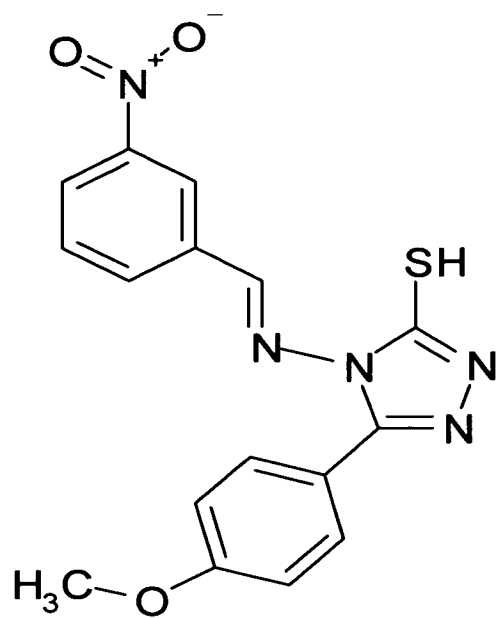
Des cellules MDCK (0.32×10^6 cellules/puis) sont mises en culture dans 5% CO₂ pendant 24 heures jusqu'à environ 80% confluence en milieu minimal (MEM, Sigma) contenant 0.2% NaHCO₃ (Sigma), amino acides MEM (Gibco), vitamines MEM (Gibco), PSG, en l'absence de sérum de veau foetal. Les cellules sont alors infectées avec le virus A/WSN/33 virus à une multiplicité d'infection MOI= 10^{-3} (multi cycle growth assay) et
15 l'antiviral ((5 - 500 μ M) ou Tamiflu (25 μ M) or le milieu) sont ajoutés aux cellules juste après l'infection. Certaines expériences ont été réalisées à plus forte MOI = 5.

Les titres viraux des surnageants cellulaires clarifiés sont déterminés sur plaques colorées au crystal violet aux temps 24, 48 et 72 heures post-infection. Les expériences sont faites en triplicate et répétées au moins deux fois.

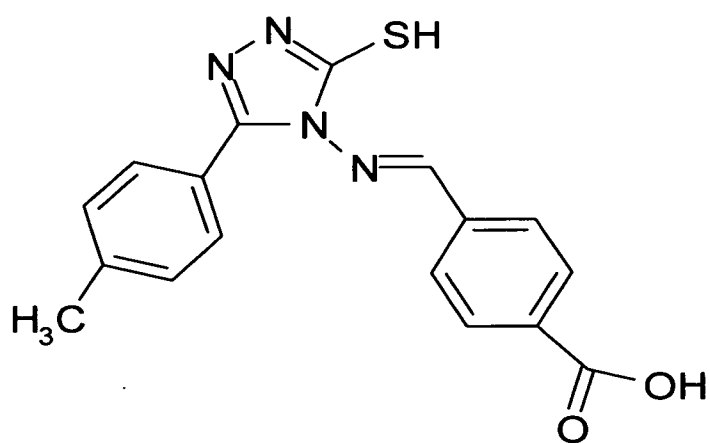
c) Résultats de toxicité :

Afin de réduire les problèmes de solubilité du L410, des composés dérivés ont été sélectionnés de façon à ce que le groupement nitro du L410 soit remplacé par un groupement carboxylate soluble (sous forme de sel de l'acide).

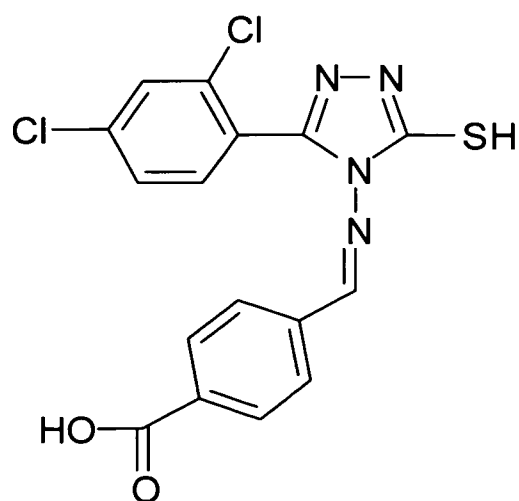
Lesdits composés sélectionnés sont les suivants :



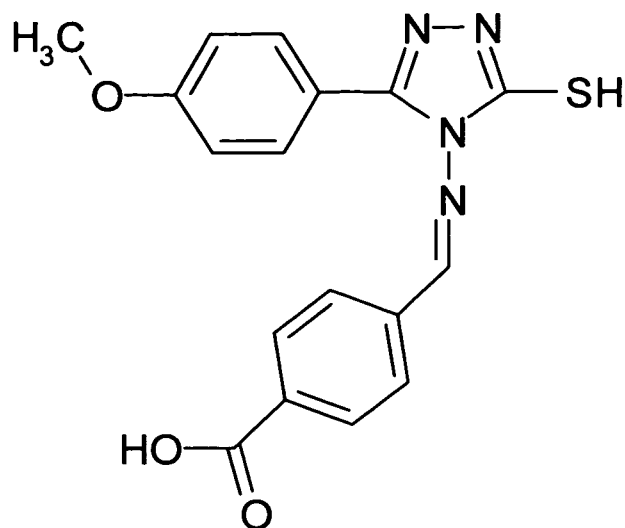
L410 - Formule (H)



C72 - Formule (J)



C59 - Formule (I)



C88 – Formule (K)

Ces composés ont été testés sur cellules MDCK infectées à MOI 10^{-3} par titrage du
 5 titre viral 24H, 48H et 72H post-infection.

Tableau 6. Mesure de la toxicité cellulaire des composés dérivés du triazole et du
 Naproxène

Composé	Test cellules A549	Gamme concentration	
naproxen	MTT 48H	2-500 μ M	Pas de toxicité
59	MTT	1-50 μ M	Pas de toxicité
72	MTT	1-50 μ M	Pas de toxicité
88	MTT	1-50 μ M	Toxic >10 μ M
L410	MTT	0.6-20 μ M	Pas de toxicité

Les résultats présentés dans le tableau 6 démontrent que comme dans le cas du
 10 Naproxène, les composés dérivés du triazole testés, sauf le composé 88, ne présentent pas de
 toxicité cellulaire.

Tableau 7. Tests effectués sur des cellules MDCK infectées, mesures 24h et 48h post-
 infection du titre viral (MOI), de la concentration des composés Naproxène et dérivés du
 triazole ainsi que des IC10 et IC50 correspondantes pour chacun de ces composés.

Composé	Temps post-infection	Titre viral Pfu/ml cellules MDCK	Concentration μM	Gamme conc μM	IC10 baisse x10 titre viral / témoin (n=2)	IC50 Baisse x 2 Titre viral/ témoin (n=2)
témoin	24H	$1.3 \pm 0.5 \times 10^7$	0			
naproxen		$4.2 \pm 0.3 \times 10^5$	100	50-500	$\sim 50 \mu\text{M}$	
59		$5.5 \pm 2.5 \times 10^3$	50	5-50	$\sim 30 \mu\text{M}$	$\sim 5 \mu\text{M}$
72		$7.6 \pm 4.0 \times 10^3$	50	5-50	$\sim 20 \mu\text{M}$	$\sim 5 \mu\text{M}$
88		1.4×10^7	5	1-5	Pas d'effet	
témoin	48H	$2.6 \pm 1.8 \times 10^8$	0			
naproxen		$1.9 \pm 0.3 \times 10^7$	100	50-500	$\sim 50 \mu\text{M}$	$\sim 10 \mu\text{M}$
L410/ 59		$2.0 \pm 0.9 \times 10^6$	50	5-50	$\sim 20 \mu\text{M}$	$\sim 3 \mu\text{M}$
72		$3.9 \pm 1.6 \times 10^6$	50	5-50	$\sim 35 \mu\text{M}$	
88		1.4×10^7	5	1-5	Pas d'effet	

Les résultats présentés dans le tableau 7 démontrent une diminution du titre viral pour les composés Naproxène ainsi que 59 et 72 par rapport au témoin.

Conclusion : les composés dérivés du triazole L410, 59 et 72 sont des antiviraux environ 2 à 4 fois plus efficaces que le Naproxène, sans toxicité cellulaire.

REVENDICATIONS

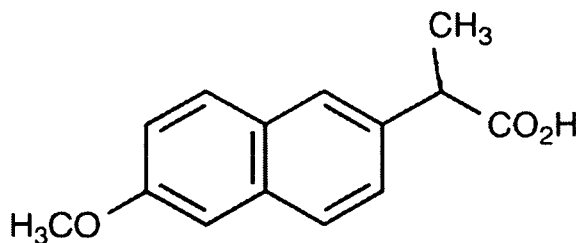
1. Une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un virus Influenza de type A chez un sujet, laquelle composition comprend un composé ayant la propriété d'agir en tant qu'inhibiteur de la fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine des virus Influenza de type A, ledit composé ayant la propriété de se lier dans un site formant une sphère d'au moins 12 ångströms (Å) de diamètre centrée sur le résidu Tyr 148, appartenant au domaine de liaison de l'ARN viral sur ladite nucléoprotéine, ledit domaine :

- comprenant les acides aminés Arg65, Gln149, Tyr148, Arg150, Arg152, Arg156, Arg174, Arg175, Arg195, Arg199, Arg213, Arg214, Arg221, Arg236, Pro354, Arg355, Lys357, Arg361, Arg391, Lys184, Lys198, Gly212, Ile217, Ala218, Lys227, Lys229, Lys273 et Val353 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1, de préférence tout acide aminé situé à une distance de moins de 5 ångströms desdits acides aminés, et
- étant délimité de deux boucles, la première boucle comprenant les résidus acides aminés Glu73 à Lys90 et la deuxième boucle comprenant les résidus acides aminés Gly200 à Arg214 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1.

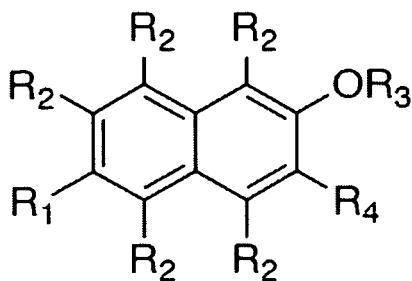
et caractérisée en ce que ledit composé est choisi parmi :

- un composé Naproxène de formule (A) ou un de ses dérivés de formule (B) avec :

Formule (A)



Formule (B)



Avec :

- R1 = $-\text{Ph}(\text{COOH})_2$ ou $-\text{Ph}(\text{COOH})_2\text{-X-Ar}$ avec X = CH₂ ou O et Ar = Ph ou PhOH
ou PhOMe ou PhNH₂ ou imidazole ou pyrrole

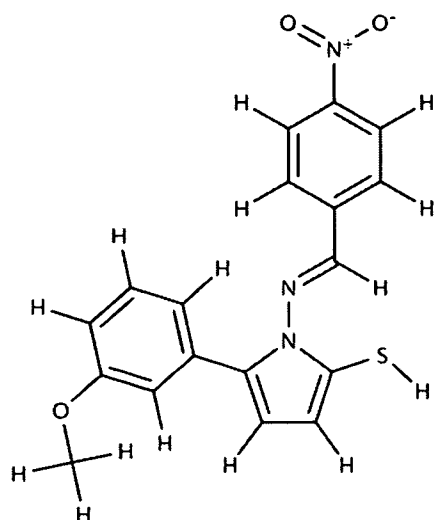
Ou R1 = $-\text{CHR}_5\text{R}_6$ avec :

R5 = $-(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ou $-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$ avec n = 0-3 ou $-(\text{CH}_2)_n\text{PhCOOH}$ ou
 $-\text{Ph}(\text{COOH})_2$ ou $-(\text{CH}_2)_n\text{PhSO}_3\text{H}$

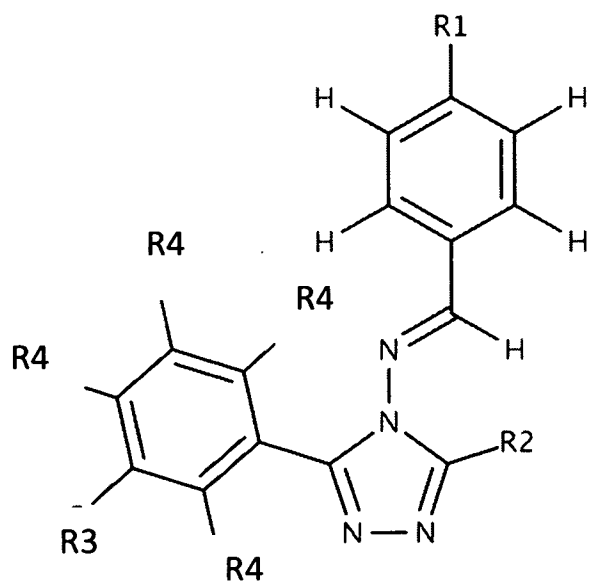
Et R6 = H, $-\text{CH}_3$ ou tout groupement aliphatique linéaire ou $-(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ avec n = 1-3
ou CONH₂ ou Cl ou F ou R6 = R5

- R2 = F, Cl ou R2 = R3
- R3 = H, $-\text{CH}_3$ ou tout groupement aliphatique linéaire ou équivalents ramifiés ou $-(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ avec n = 0-4 ou $-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ avec n = 0-4 ou $-(\text{CH}_2)_n\text{CONH}_2$ avec n = 0-3
- R4 = OH ou OR3 ou H
- le triazole de formule (C) ou un de ses dérivés de formule (D) ou (E) avec :

Formule (C)

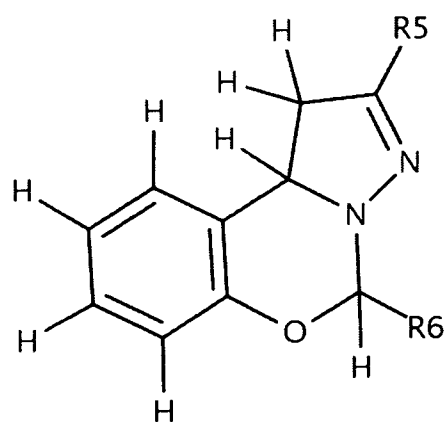


Formule (D)



5

Formule (E)



Avec :

- R1 = $(\text{CH}_2)_n(\text{COOH})_m$ ou $(\text{CH}_2)_n(\text{SO}_3\text{H})_m$ avec $n=0-3$, $m=1$, ou NO_2
- R2 = H, F, Cl, ou SH
- R3 = CH_3 ou tout groupement aliphatique ou $-(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$ $n=0-4$ ou $-(\text{CH}_2)_n\text{-NH}_2$
ou OCH_3 ou $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ou $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$
- R4 = H, F, Cl

avec pour la formule E :

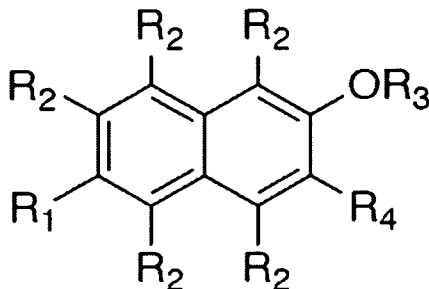
- R5 = un phenyl carboxylate ou sulfate ou sulfonate $-\text{Ph}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ou $\text{Ph}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$ ou R5 = H, F, Cl et
- R6 = R5 ou R6 = $-\text{Ph}(\text{OH})_m$ ($m = 0-4$) ou $-\text{Ph}(\text{OCH}_3)$ ou R6 = H, F, Cl

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1 correspondant à la séquence SEQ ID N°2.
3. Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit domaine de liaison comprenant plus de 10% de résidus acides aminés arginines, préférentiellement plus de 20% de résidus acides aminés arginine.
4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit composé n'est pas un dérivé nitré du Naproxène tel que décrit dans la demande internationale PCT WO 2005/030224 A1 de ligne 1, page 2 à la ligne 14, page 17.
5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le sujet est un mammifère, de préférence un humain, infecté par un virus Influenza de type A.
6. Une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale par un Orthomyxovirus chez un sujet, laquelle composition comprend un composé tel que défini dans la revendication 1.
7. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit composé n'est pas un dérivé nitré du Naproxène tel que décrit dans la demande PCT WO 2005/030224 A1 (NICOX) de la ligne 1, page 2 à la ligne 14, page 17.
8. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit composé n'est pas un dérivé du triazole tel que décrit dans la demande internationale PCT WO 2007134678 A2 (MERCK) de la ligne 4, page 19 à la ligne 20, page 39 et de la ligne 19, page 45 à la ligne 31, page 50.

9. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit composé est le composé Naproxène de formule (A) ou un de ses dérivés de formule (B) tels que définis dans la revendication 1.

10. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit composé est un dérivé du Naproxène de Formule (L)

Formule (L)



Avec :

- R1 = $-\text{Ph}(\text{COOH})_2$ ou $-\text{Ph}(\text{COOH})_2\text{-X-Ar}$ avec X = CH₂ ou O et Ar = Ph ou PhOH ou PhOMe ou PhNH₂ ou imidazole ou pyrrole

Ou R1 = $-\text{CHR}_5\text{R}_6$ avec :

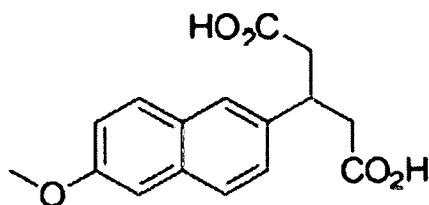
R5 = $-(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ou $-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$ avec n = 0-3 ou $-(\text{CH}_2)_n\text{PhCOOH}$ ou $-\text{Ph}(\text{COOH})_2$ ou $-(\text{CH}_2)_n\text{PhSO}_3\text{H}$

Et R6 = H, $-\text{CH}_3$ ou tout groupement aliphatique linéaire ou $-(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ avec n = 1-3 ou CONH₂ ou Cl ou F ou R6 = R5

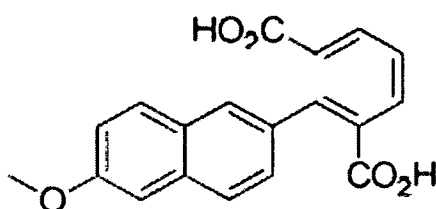
- R2 = R3
- R3 = H
- R4 = H

11. Composition selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisée en ce que ledit composé est choisi parmi le composé dérivé du Naproxène de formule (F) ou le composé dérivé du Naproxène de formule (G) :

Formule (F)



Formule (G)



5

12. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit composé est un triazole de formule (C) ou un de ses dérivés de formules (D) ou (E) tels que définis dans la revendication 1.

10 13. Composition selon l'une des revendications 6 à 12, caractérisée en ce que le sujet est un mammifère, plus préférentiellement un humain, infecté par un Orthomyxovirus.

14. Composition selon l'une des revendications 6 à 12, caractérisée en ce que ladite composition est destinée au traitement d'une infection virale par un virus Influenza chez un sujet.

15 15. Composition selon la revendication 14, caractérisée en ce que le sujet est un mammifère, plus préférentiellement un humain, infecté par un virus Influenza.

16. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisée en ce qu'elle peut comprendre un support pharmaceutiquement acceptable.

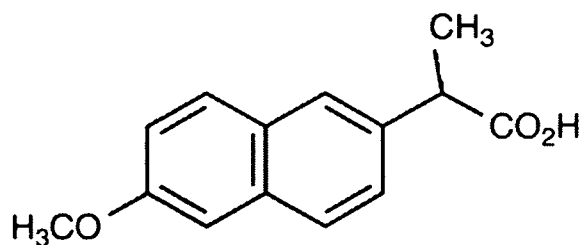
20 17. Un composé ayant la propriété d'agir en tant qu'inhibiteur de la fixation de l'ARN viral à la nucléoprotéine des virus Influenza de type A, ledit composé ayant la propriété de se lier dans un site formant une sphère d'au moins 12 ångströms (Å) de diamètre centrée sur le résidu Tyr 148, appartenant au domaine de liaison de l'ARN viral sur ladite nucléoprotéine, ledit domaine :

- comprenant les acides aminés Arg65, Gln149, Tyr148, Arg150, Arg152, Arg156, Arg174, Arg175, Arg195, Arg199, Arg213, Arg214, Arg221, Arg236, Pro354, Arg355, Lys357, Arg361, Arg391, Lys184, Lys198, Gly212, Ile217, Ala218, Lys227, Lys229, Lys273 et Val353 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1, de préférence tout acide aminé situé à une distance de moins de 5 ångströms desdits acides aminés, et
- étant délimité de deux boucles, la première boucle comprenant les résidus acides aminés Glu73 à Lys90 et la deuxième boucle comprenant les résidus acides aminés Gly200 à Arg214 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1.

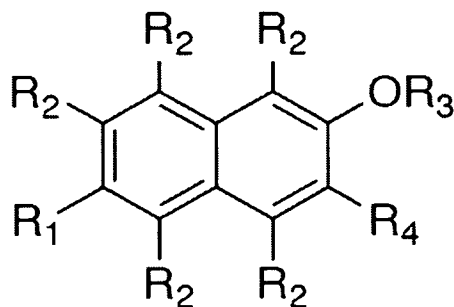
et caractérisée en ce que ledit composé est choisi parmi :

- un composé Naproxène de formule (A) ou un de ses dérivés de formule (B) avec :

Formule (A)



Formule (B)



Avec :

- R1 = -Ph(COOH)2 ou -Ph(COOH)2-X-Ar avec X = CH2 ou O et Ar = Ph ou PhOH ou PhOMe ou PhNH2 ou imidazole ou pyrrole

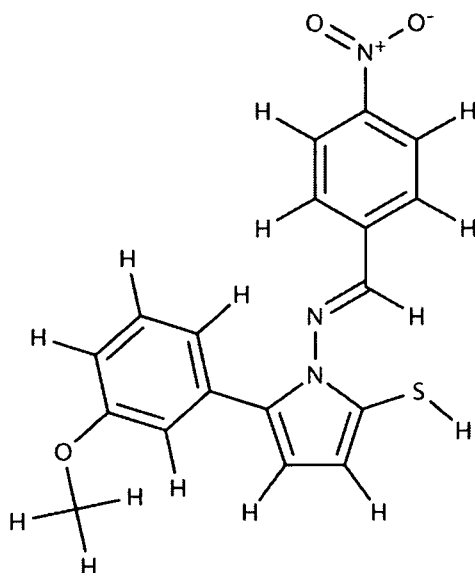
Ou R1 = -CHR5R6 avec :

R5 = -(CH2)nCOOH ou -(CH2)nSO3H avec n = 0-3 ou -(CH2)nPhCOOH ou -Ph(COOH)2 ou -(CH2)nPhSO3H

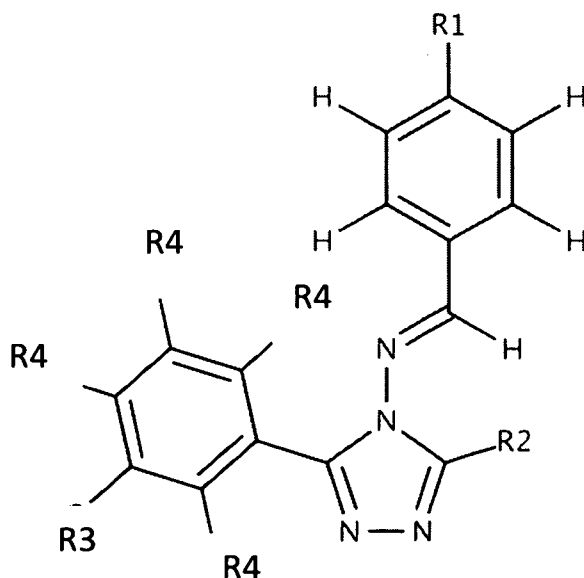
Et R6 = H, -CH3 ou tout groupement aliphatique linéaire ou -(CH2)nOH avec n = 1-3 ou CONH2 ou Cl ou F ou R6 = R5

- R2 = F, Cl ou R2 = R3
- R3 = H, -CH3 ou tout groupement aliphatique linéaire ou équivalents ramifiés ou -(CH2)nOH avec n = 0-4 ou -(CH2)nNH2 avec n = 0-4 ou -(CH2)nCONH2 avec n = 0-3
- R4 = OH ou OR3 ou H
- le triazole de formule (C) ou un de ses dérivés de formule (D) ou (E) avec :

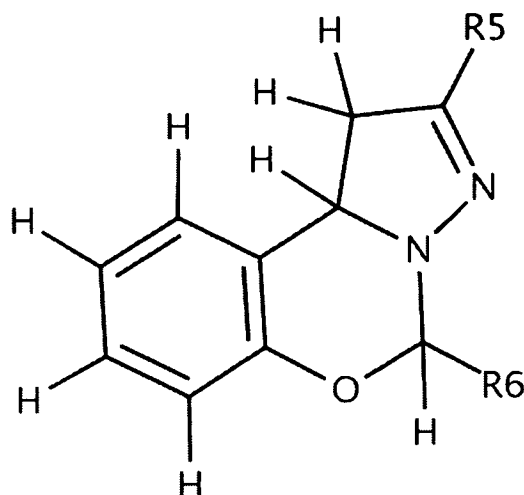
Formule (C)



Formule (D)



Formule (E)



Avec :

- R1 = (CH₂)_n(COOH)_m ou (CH₂)_n(SO₃H)_m avec n=0-3, m=1 ou NO₂,
- R2 = H, F, Cl, ou SH
- R3 = CH₃ ou tout groupement aliphatique ou -(CH₂)_n-OH n=0-4 ou -(CH₂)_n-NH₂ ou OCH₃ ou O(CH₂)_n CH₃ ou O(CH₂)_nNH₂
- R4 = H, F, Cl

avec pour la formule E :

- R5 par un phenyl carboxylate ou sulfate ou sulfonate Ph(CH₂)_nCOOH ou Ph(CH₂)_nSO₃H ou R5 = H, F, Cl et
- R6 = R5 ou R6 = Ph-(OH)_m (m = 0 -4) ou Ph-(OCH₃) ou R6 = H, F, Cl

et caractérisé en ce qu'il n'est ni un dérivé du triazole tel que décrit dans la demande internationale PCT WO 2007134678 A2 (MERCK) de la ligne 4, page 19 à la ligne 20, page 39 et de la ligne 19, page 45 à la ligne 31, page 50, ni un dérivé nitré du Naproxène tel que décrit dans la demande PCT WO 2005/030224 A1 (NICOX) de la ligne 1, page 2 à la ligne 14, page 17.

18. Un composé selon la revendication 17, caractérisé en ce que ledit composé est choisie parmi les composés de formules (L), (F) et (G).

19. Un procédé d'identification d'un composé ayant la propriété de se lier au niveau du domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine des virus Influenza de type A, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

a) Modéliser la structure en trois dimensions (3D) de la nucléoprotéine d'un virus Influenza de type A ;

b) Générer un modèle en 3 dimensions (3D) du domaine de liaison de l'ARN viral sur ladite nucléoprotéine à partir de la structure obtenue en a):

5 - Ledit domaine comprenant les acides aminés Arg65, Gln149, Tyr148, Arg150, Arg152, Arg156, Arg174, Arg175, Arg195, Arg199, Arg213, Arg214, Arg221, Arg236, Pro354, Arg355, Lys357, Arg361, Arg391, Lys184, Lys198, Gly212, Ile217, Ala218, Lys227, Lys229, Lys273 et Val353 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1, de préférence tout acide aminé situé à une distance de moins de 5
10 ångströms desdits acides aminés, et

- Ledit domaine étant délimité par deux boucles, la première boucle comprenant les résidus acides aminés Glu 73 à Lys 90 et la deuxième boucle comprenant les résidus acides aminés Gly 200 à Arg 214 d'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1.

15 c) Cribler un ou plusieurs composés sur le modèle en 3D du domaine de liaison selon b) ;

d) Identifier un composé capable de se lier dans un site formant une sphère d'au moins 12 ångströms (Å) de diamètre centrée sur le résidu Tyr 148, appartenant audit domaine de liaison de l'ARN viral sur la nucléoprotéine, ledit composé étant
20 susceptible d'inhiber la fixation de l'ARN à la nucléoprotéine des virus Influenza de type A et pouvant donc potentiellement être utilisé comme un inhibiteur de la réplication virale.

20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'une séquence comprenant la séquence SEQ ID N°1 est la séquence SEQ ID N°2.

25 21. Procédé selon l'une des revendications 19 ou 20, caractérisé en ce qu'il comprend une étape complémentaire e) consistant à tester *in vitro* la capacité d'un composé identifié selon l'étape d) à inhiber la fixation de l'ARN viral sur la nucléoprotéine ainsi que la réplication virale.

22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il comprend une étape (f)
30 consistant à sélectionner un tel composé comme étant un inhibiteur de la réplication virale.

1/18

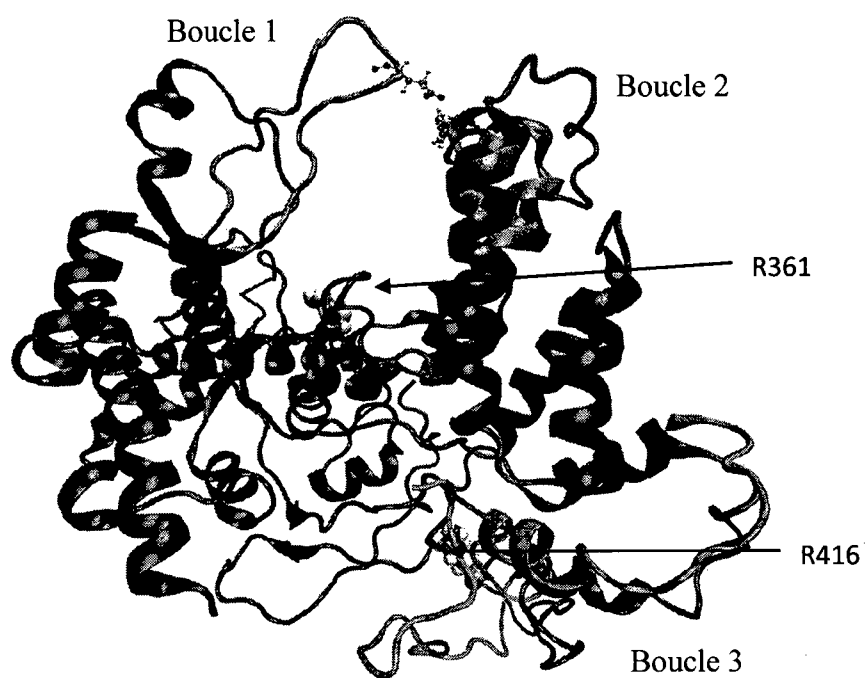


Figure 1

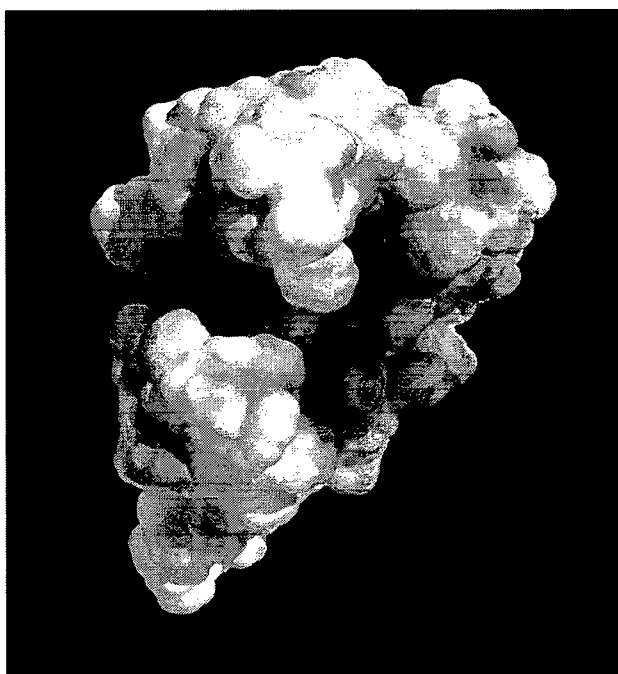


Figure 2

2/18

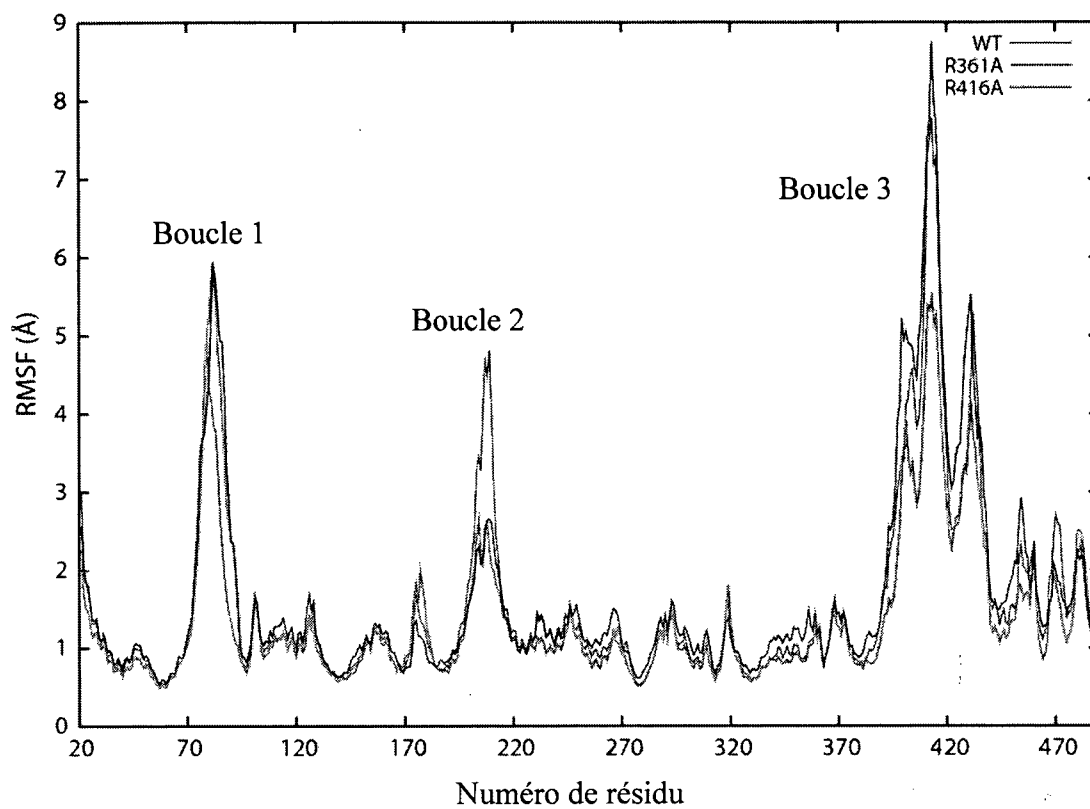


Figure 3

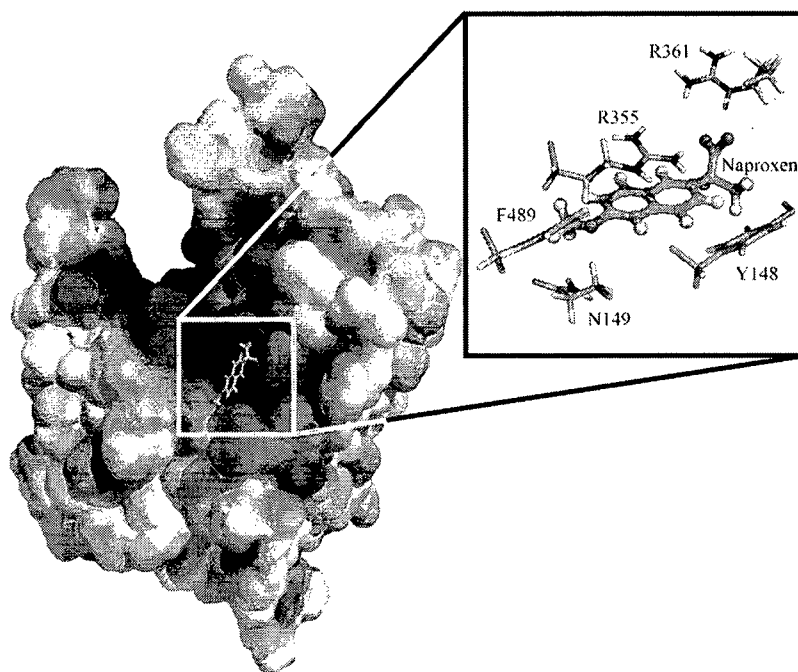


Figure 4

3/18

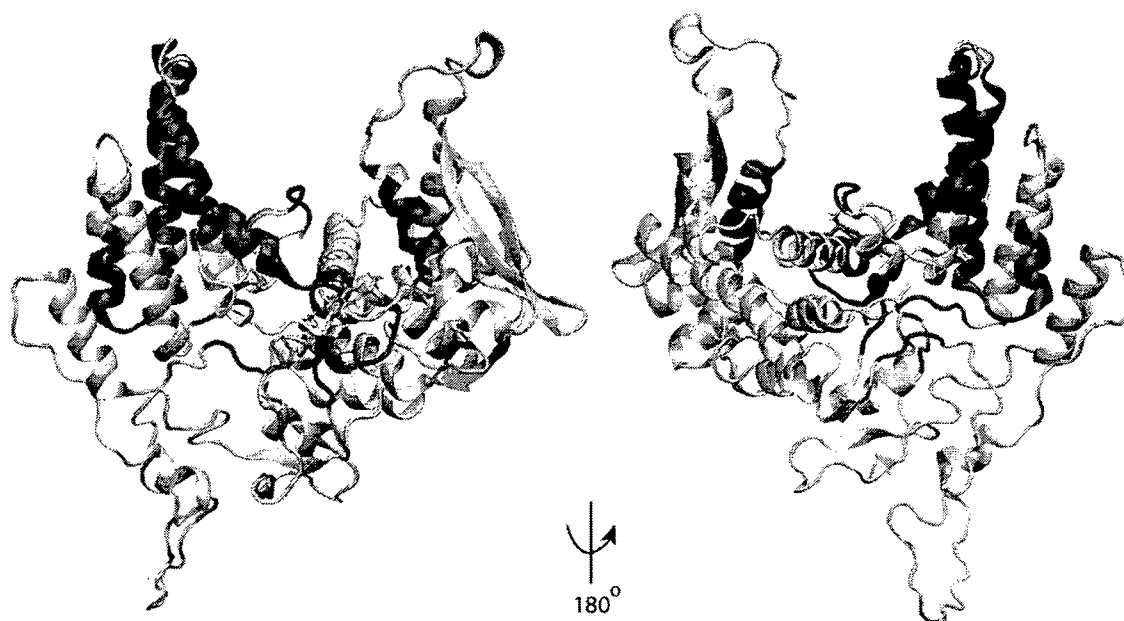


Figure 5

4/18

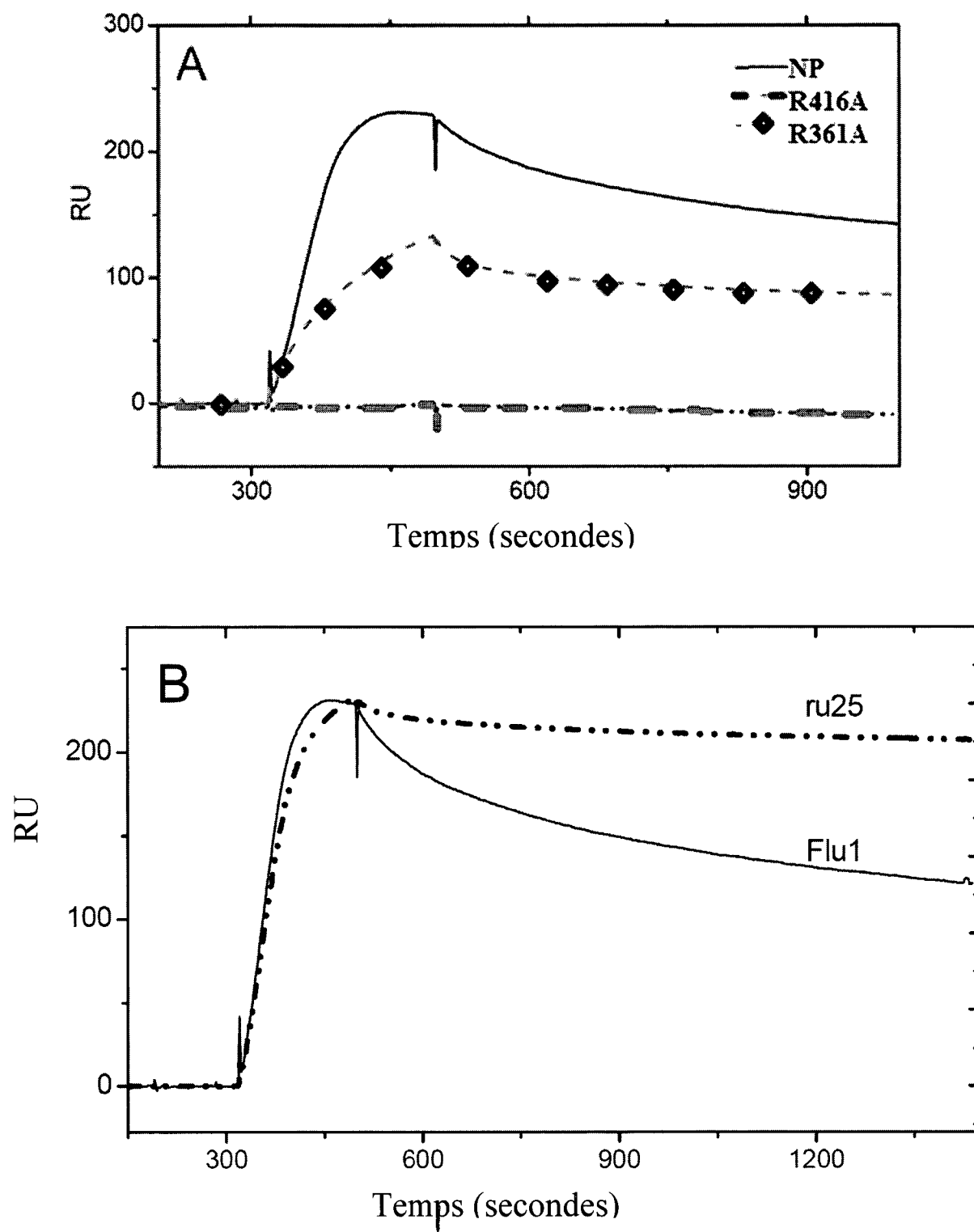


Figure 6 (1/2)

5/18

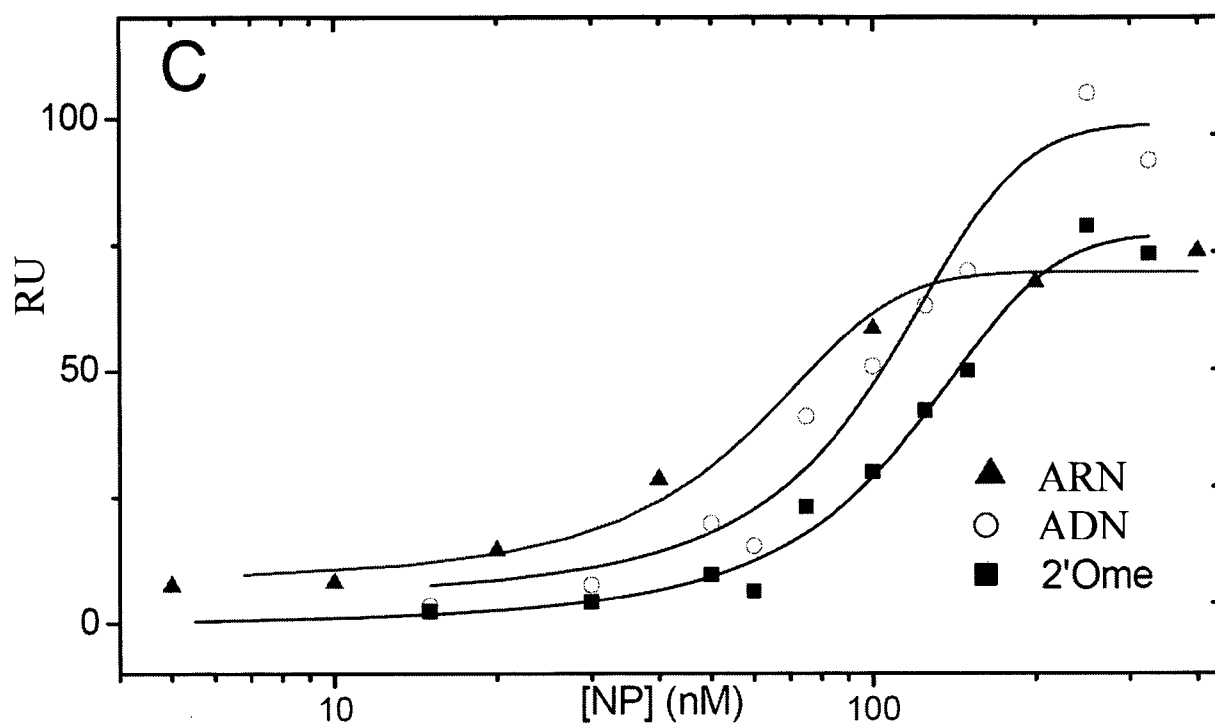


Figure 6 (2/2)

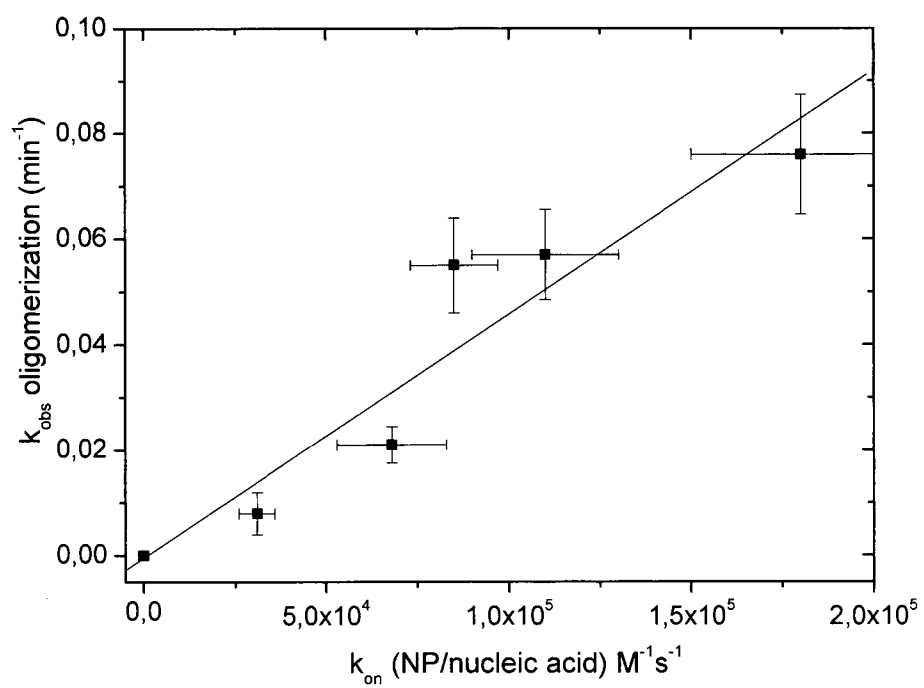


Figure 7

6/18

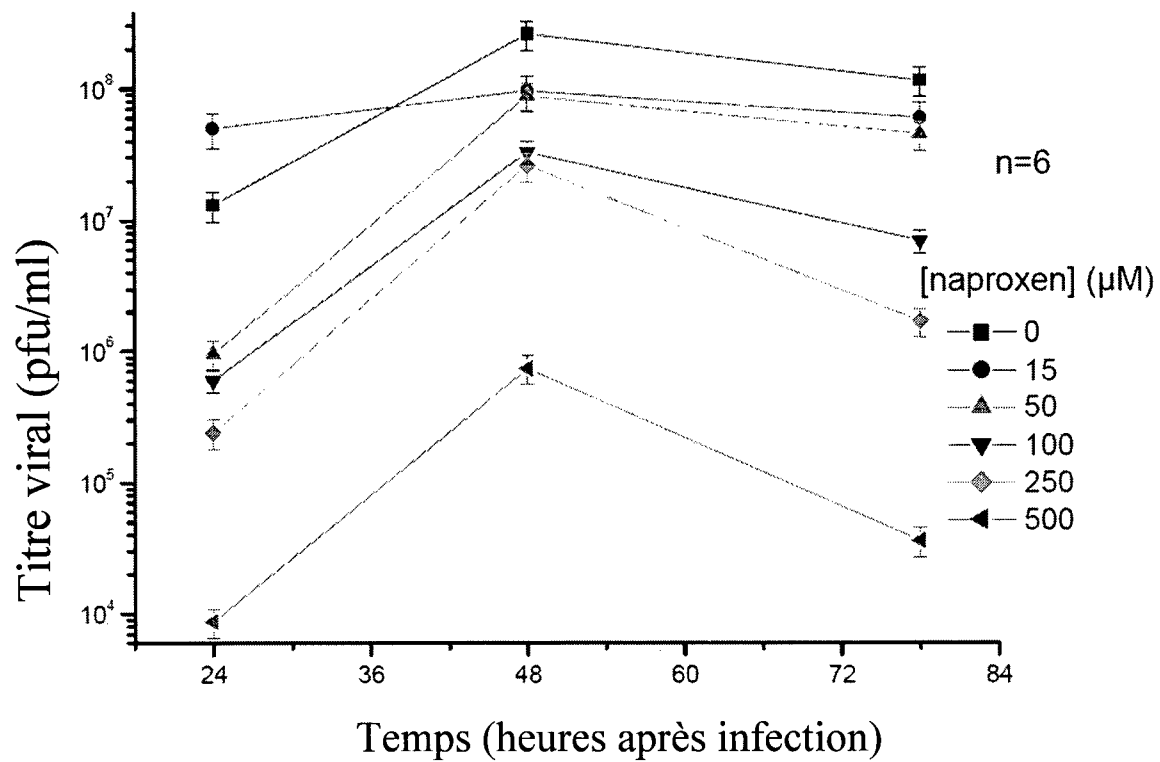


Figure 8

7/18

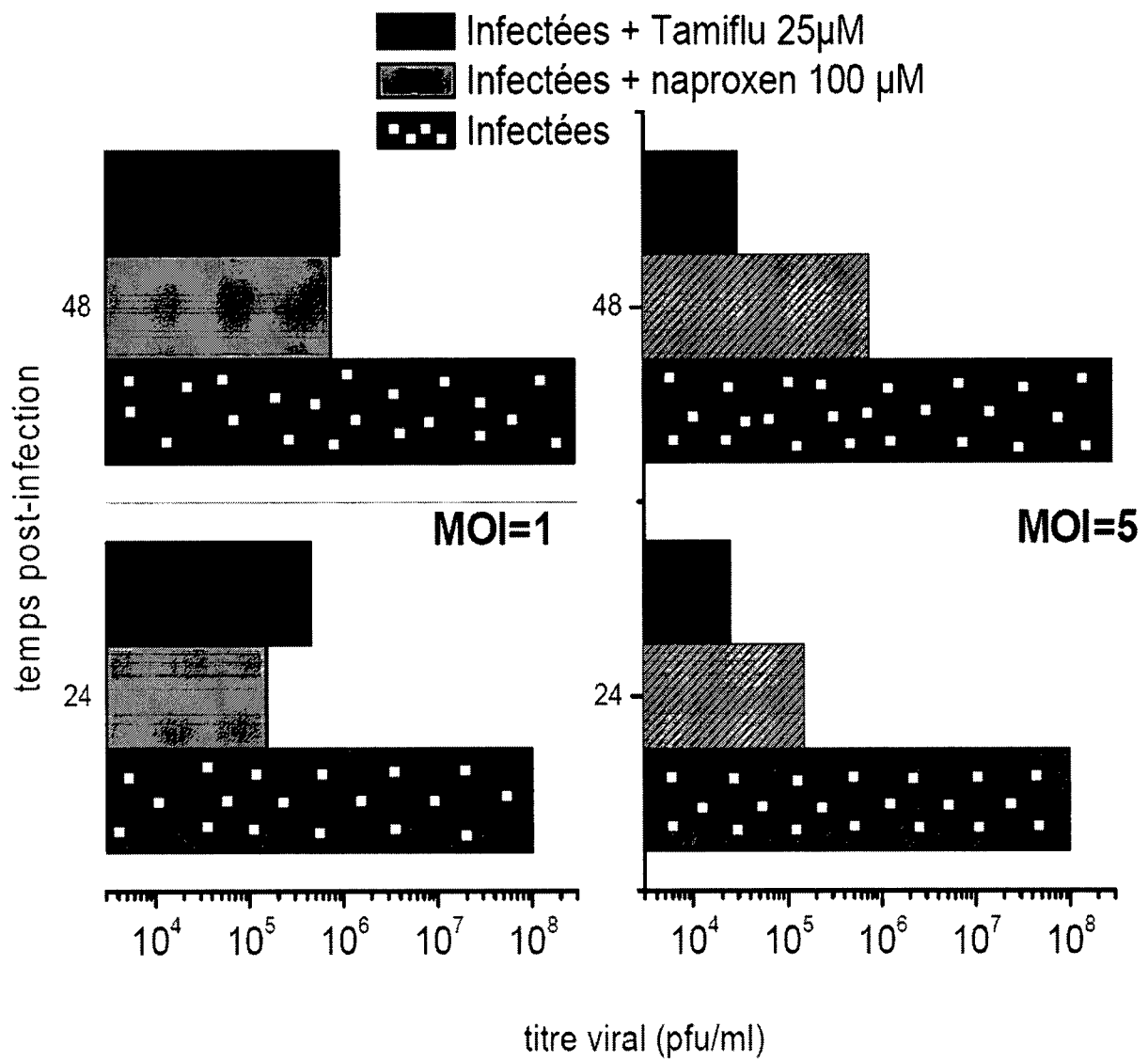


Figure 9

8/18

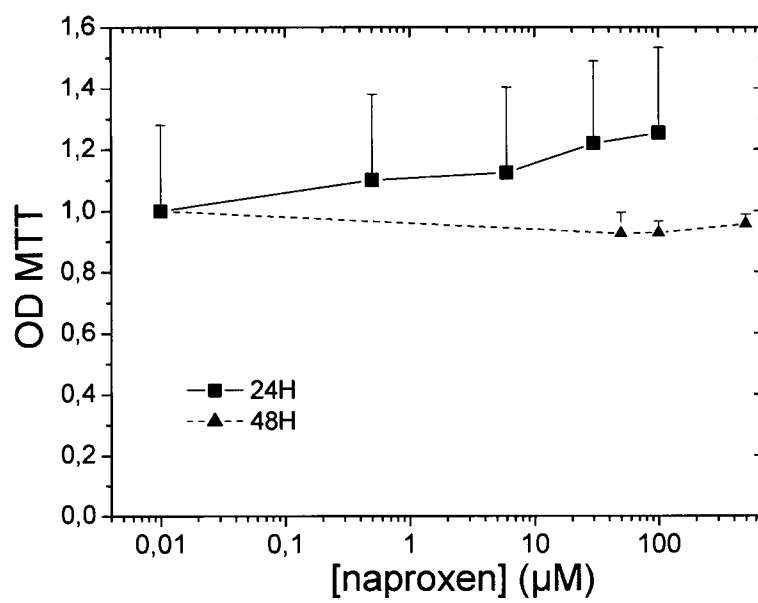


Figure 10

9/18

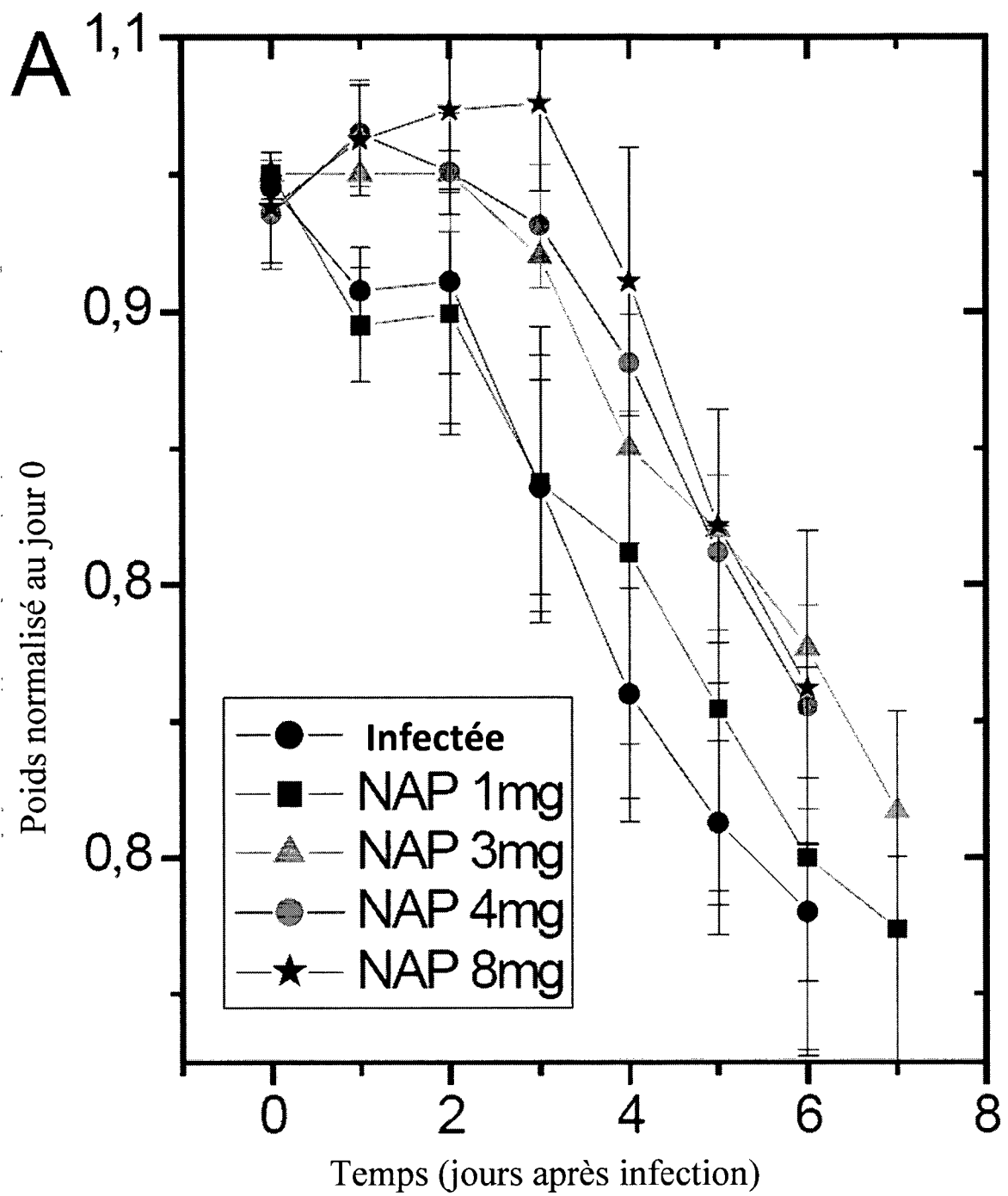


Figure 11A

10/18

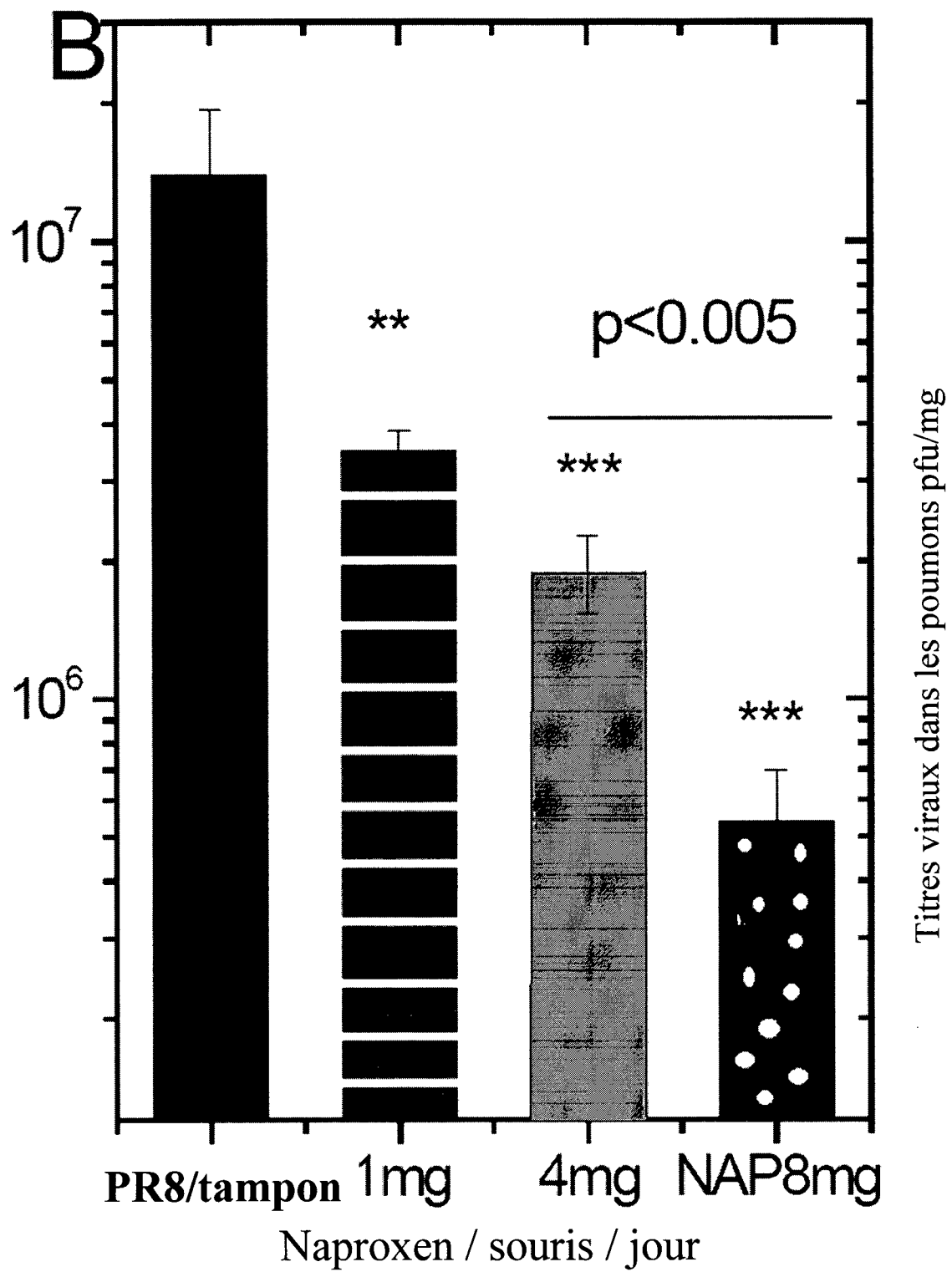


Figure 11B

11/18

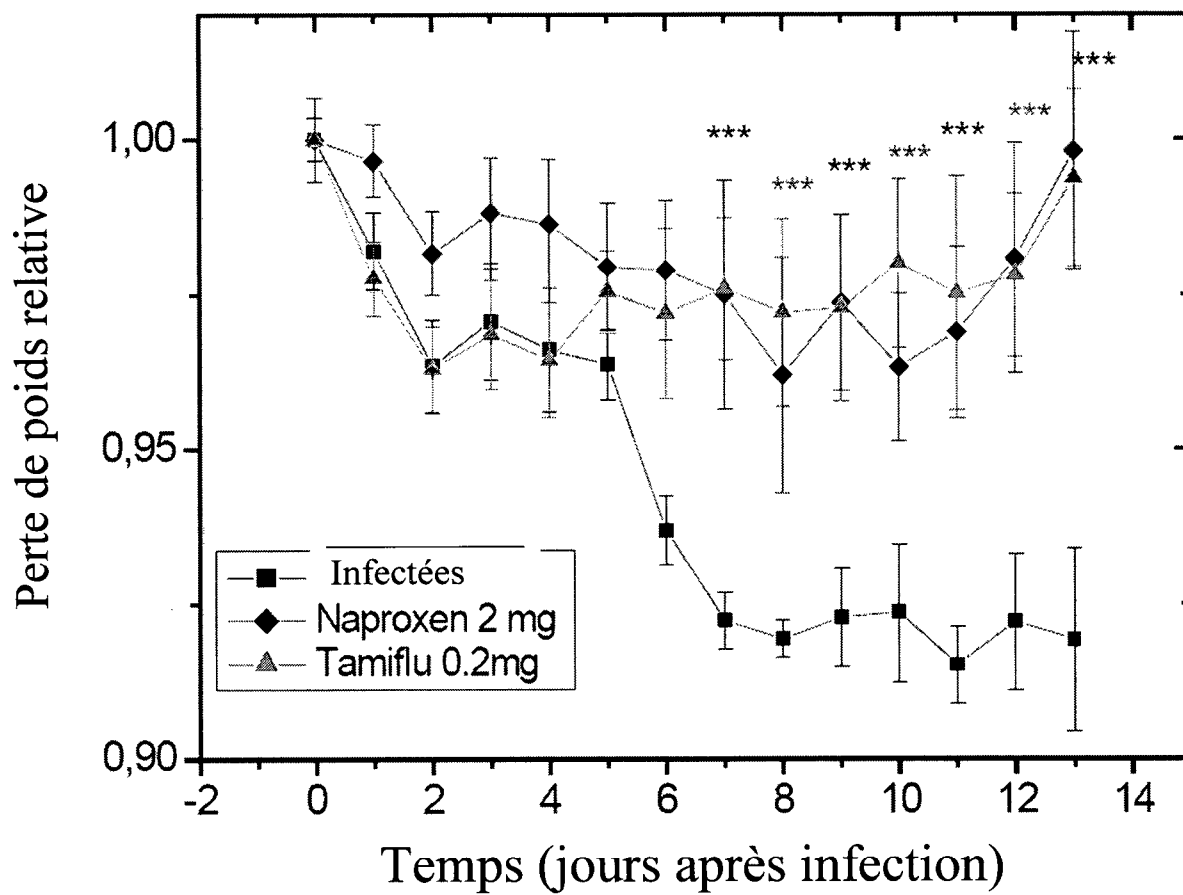


Figure 12

A : infecté

B: infecté + 3mg naproxen

C: non infecté

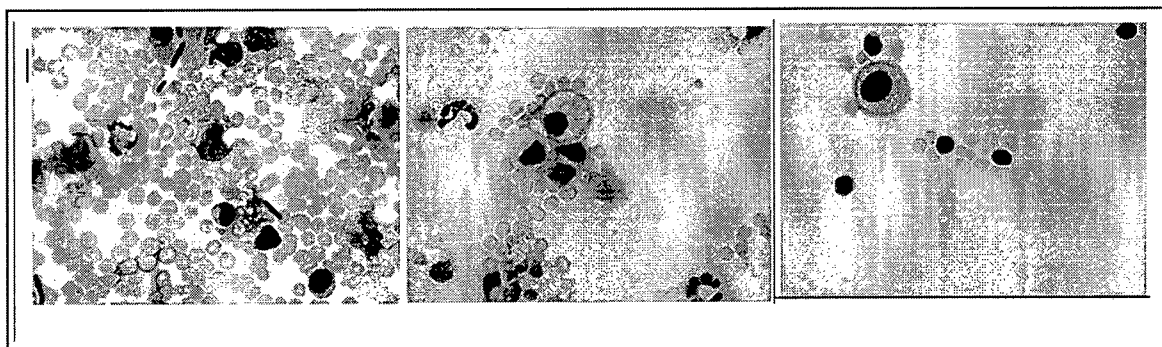


Figure 13

12/18

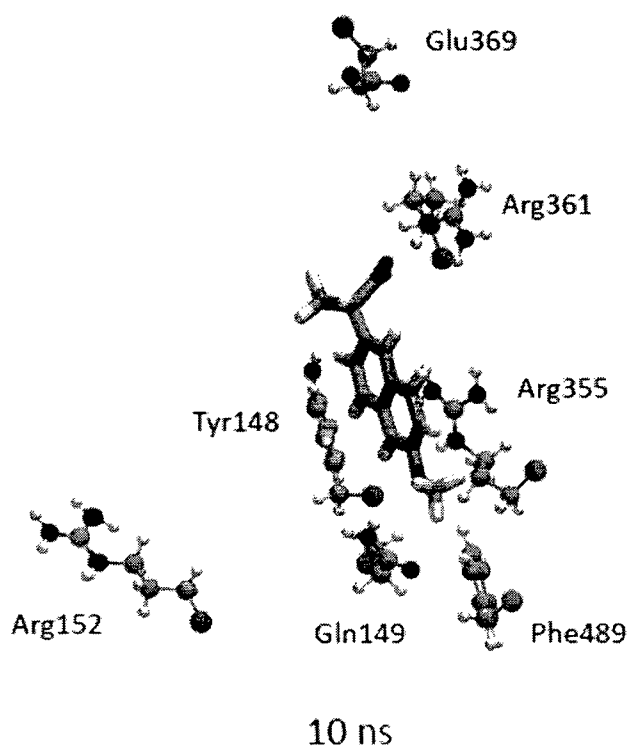
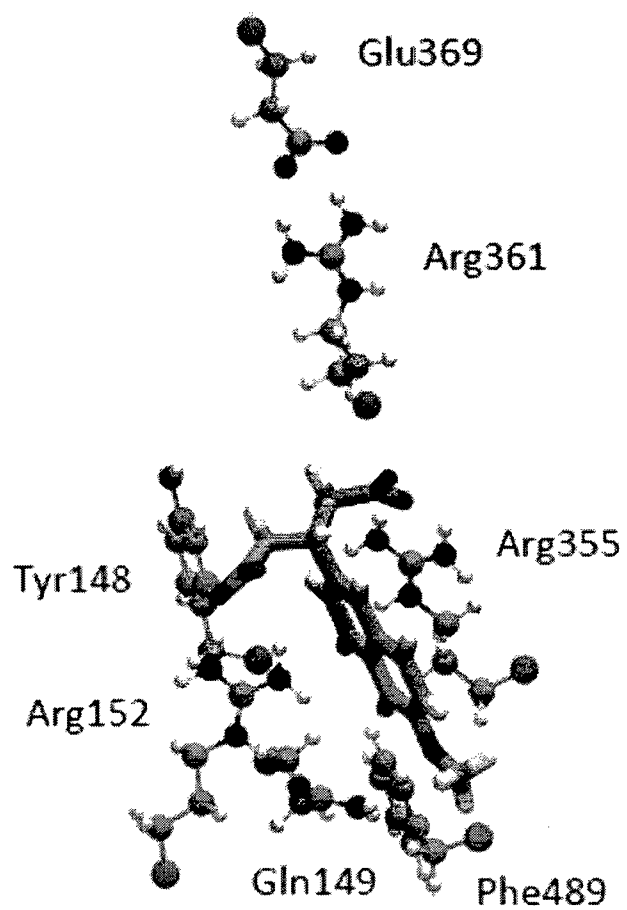
**Naproxène**

Figure 14 (1/3)

13/18

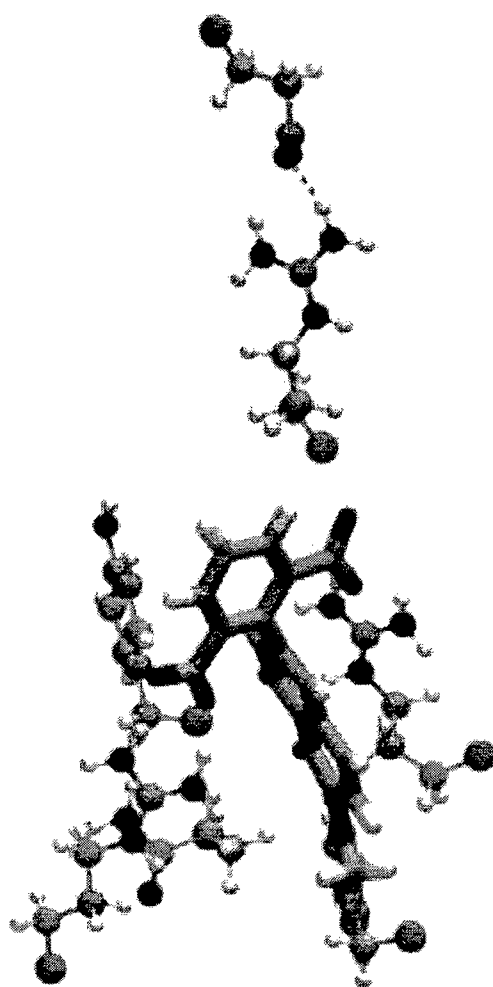


10 ns

Naproxène A

Figure 14 (2/3)

14/18

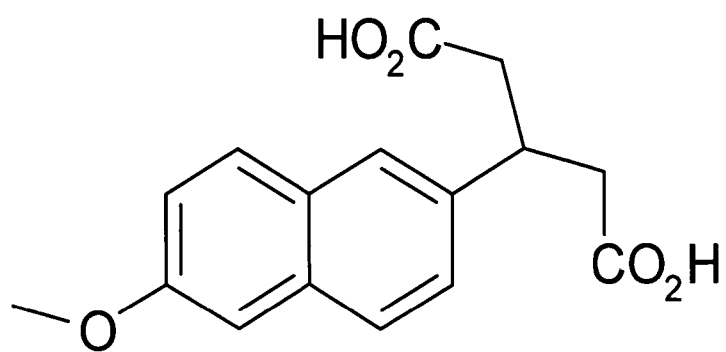


10 ns

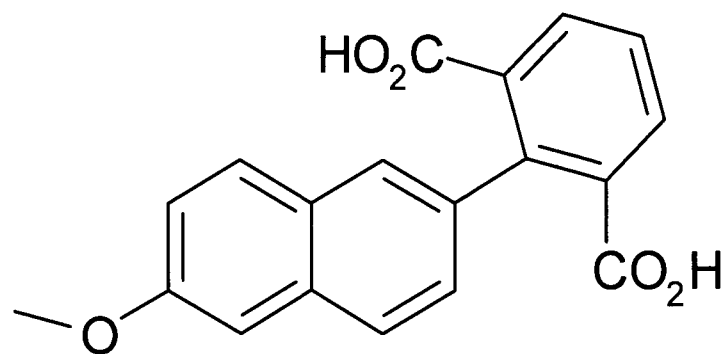
Naproxène c0

Figure 14 (3/3)

15/18



Naproxène A



Naproxène C0

Figure 15

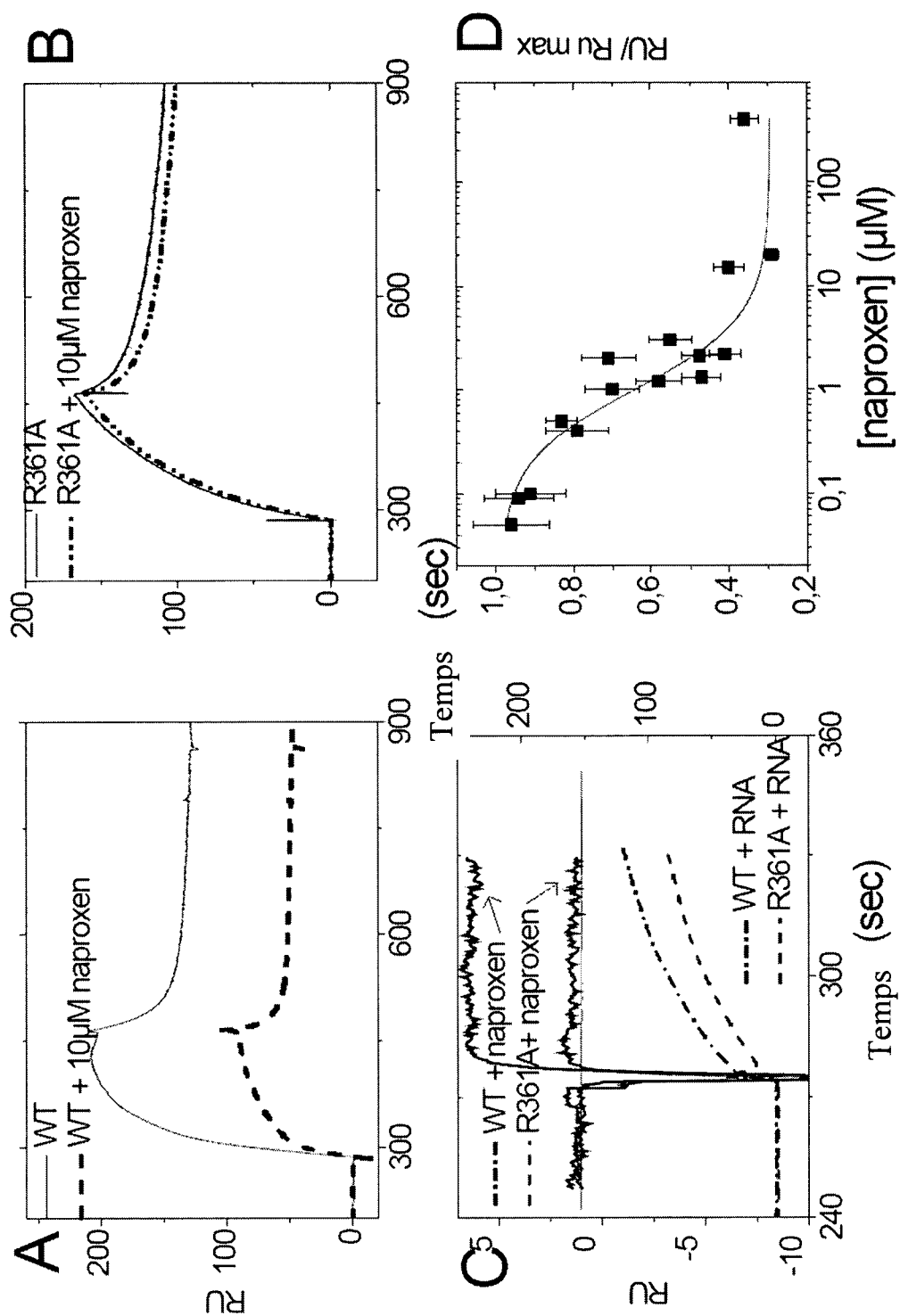


Figure 16

17/18

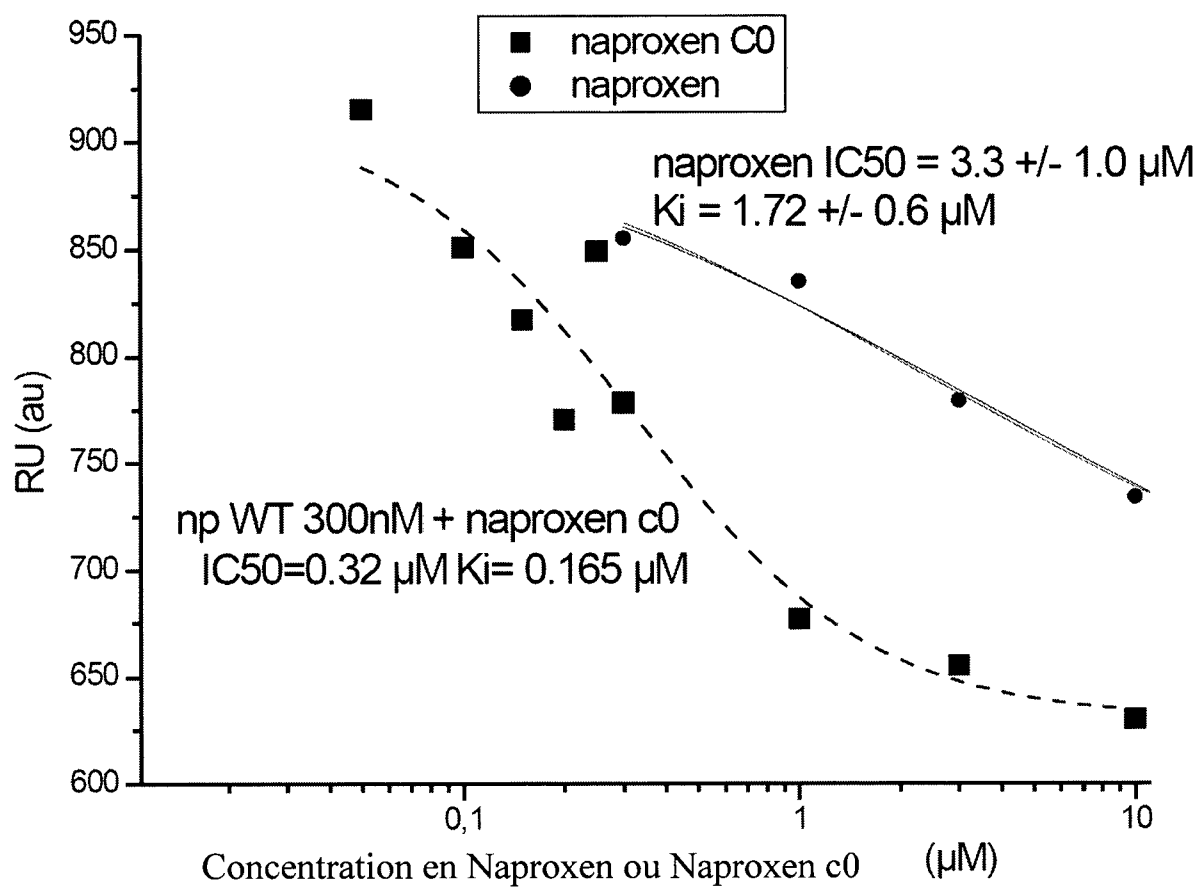


Figure 17

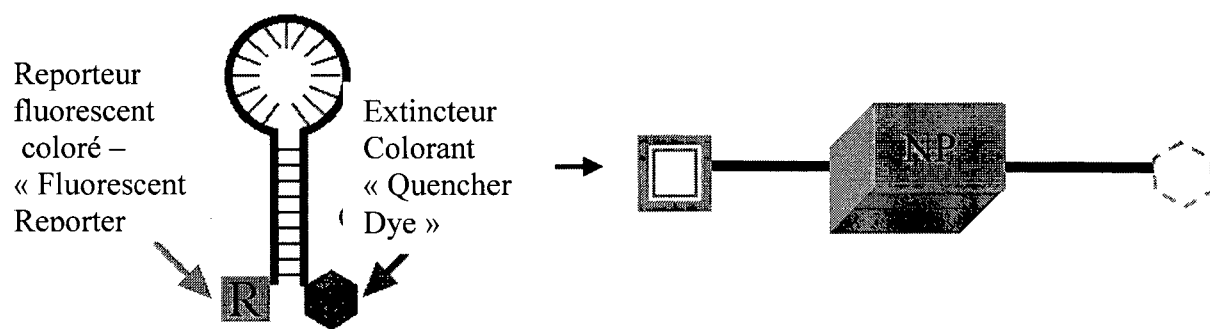


Figure 18

18/18

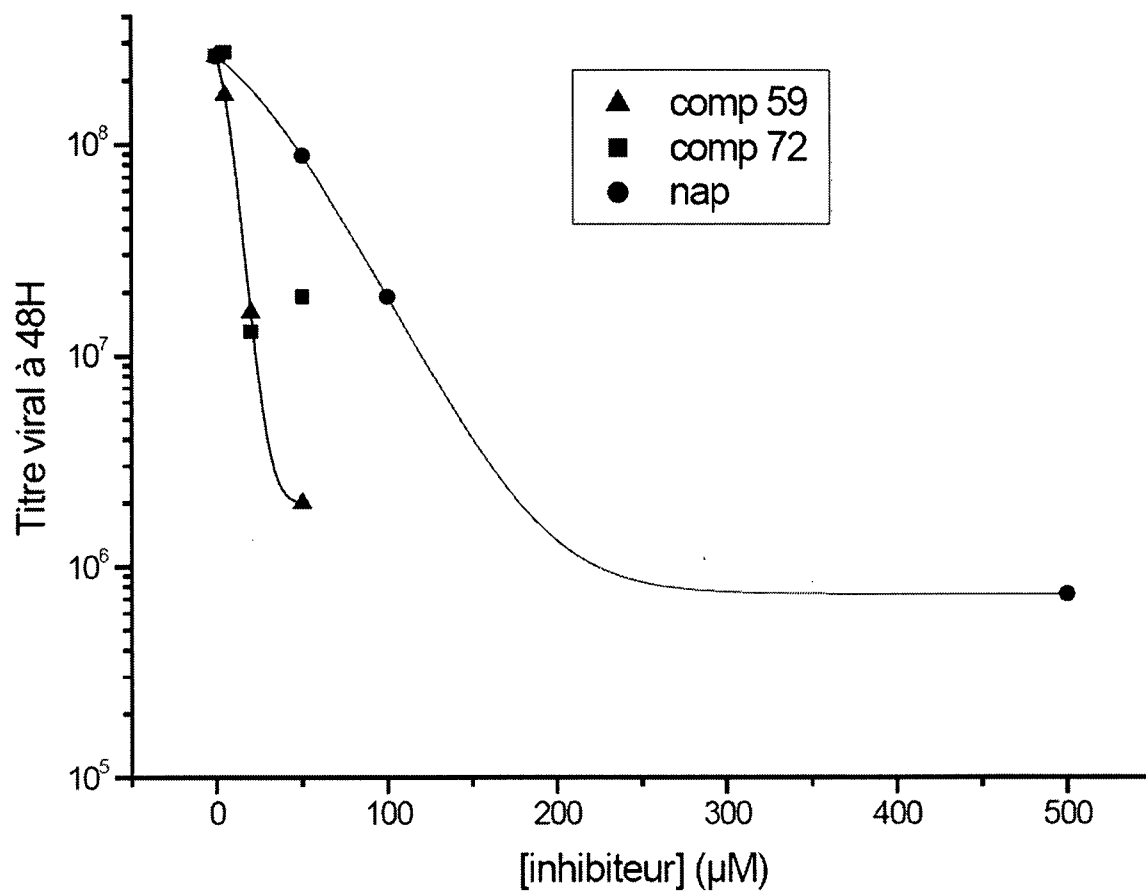


Figure 19