

**6^{es} Journées Nationales d'Infectiologie
Nice, 8-10 Juin 2005**

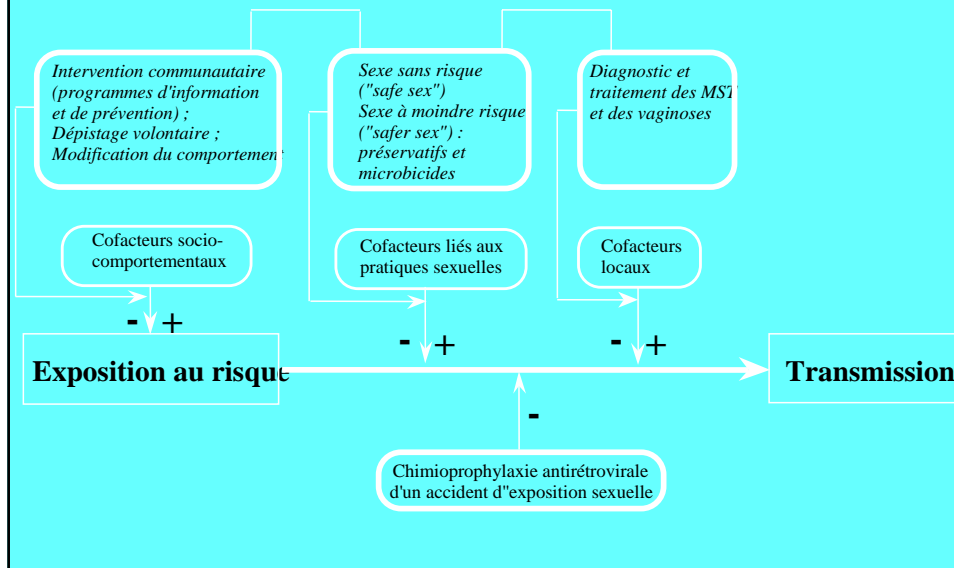
**Actualités sur le développement de
microbicides**

**Pr Laurent Bélec
& Dr Jean-Elie Malkin**
Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris
Institut Pasteur



**Développement de
molécules à visée
microbicide**

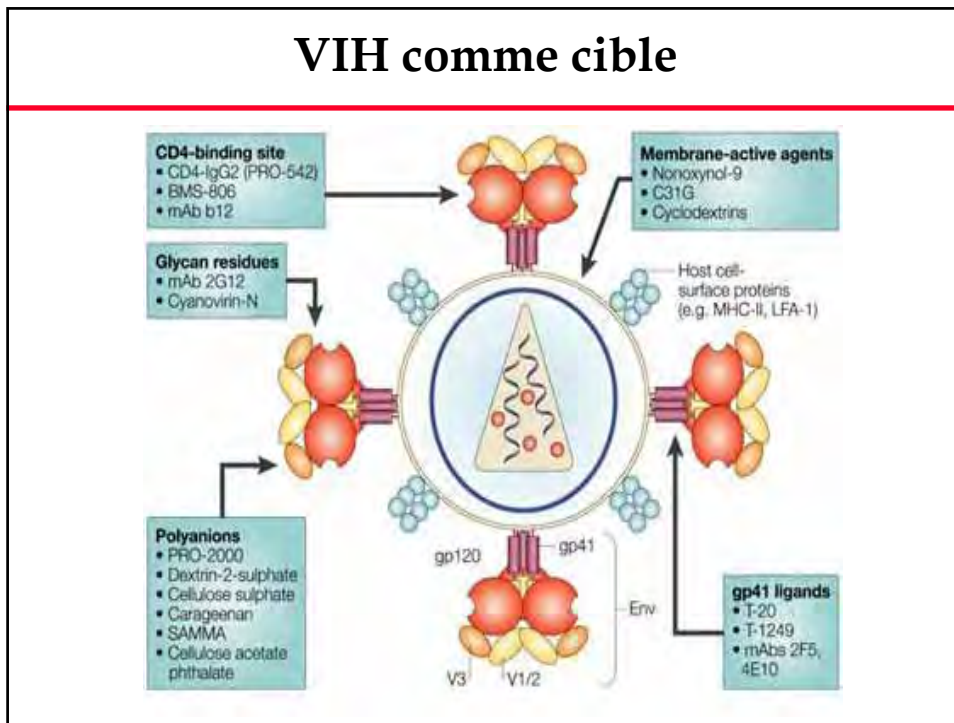
Principes de la prévention



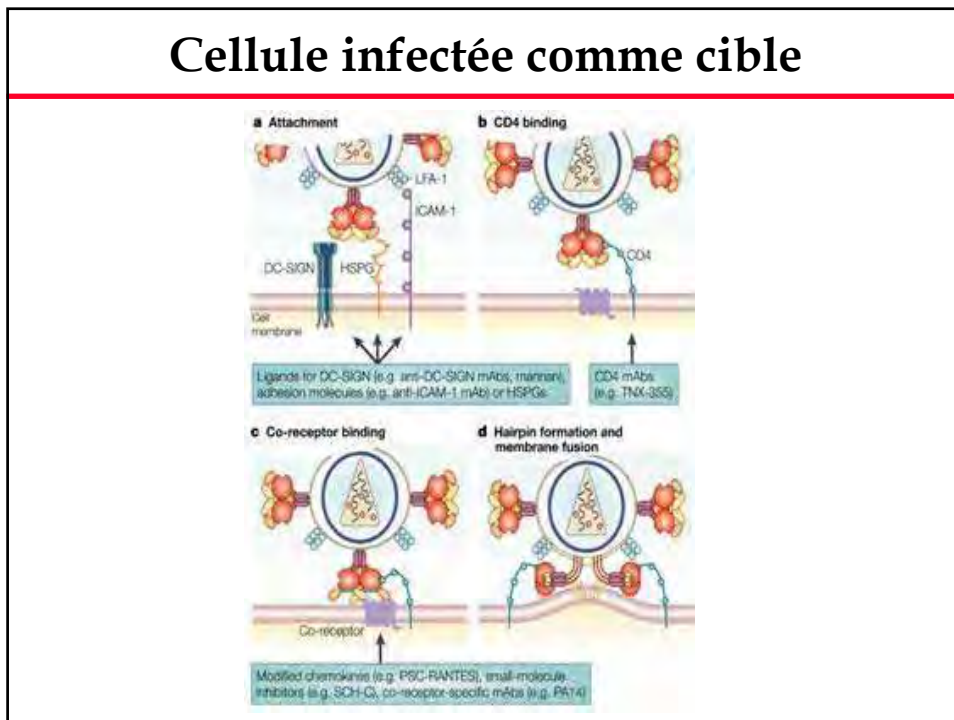
Très nombreux facteurs impliqués !!!

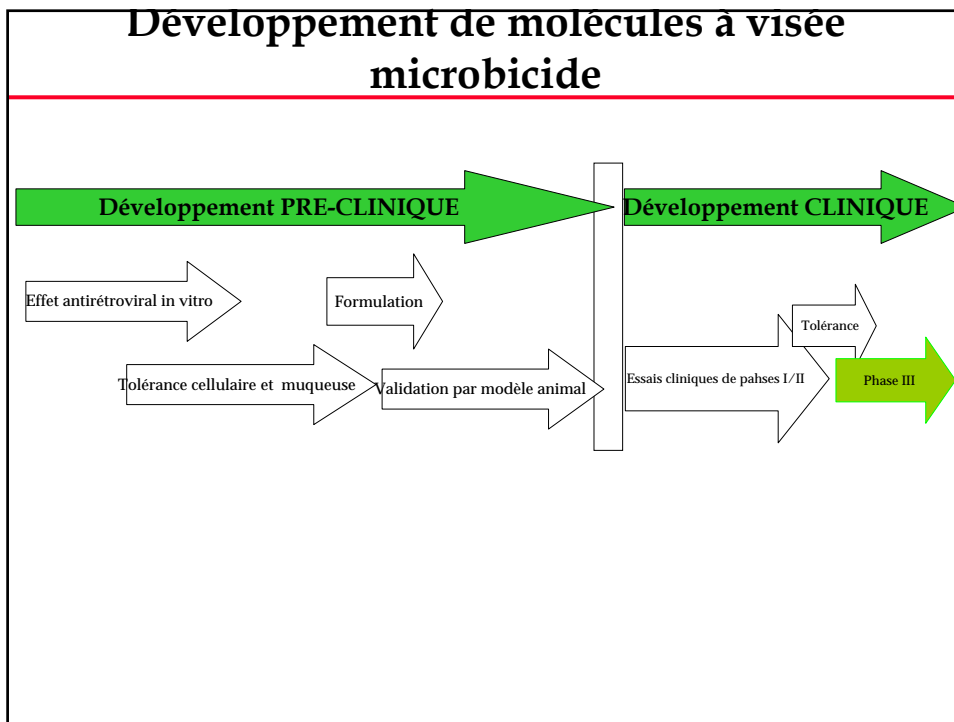
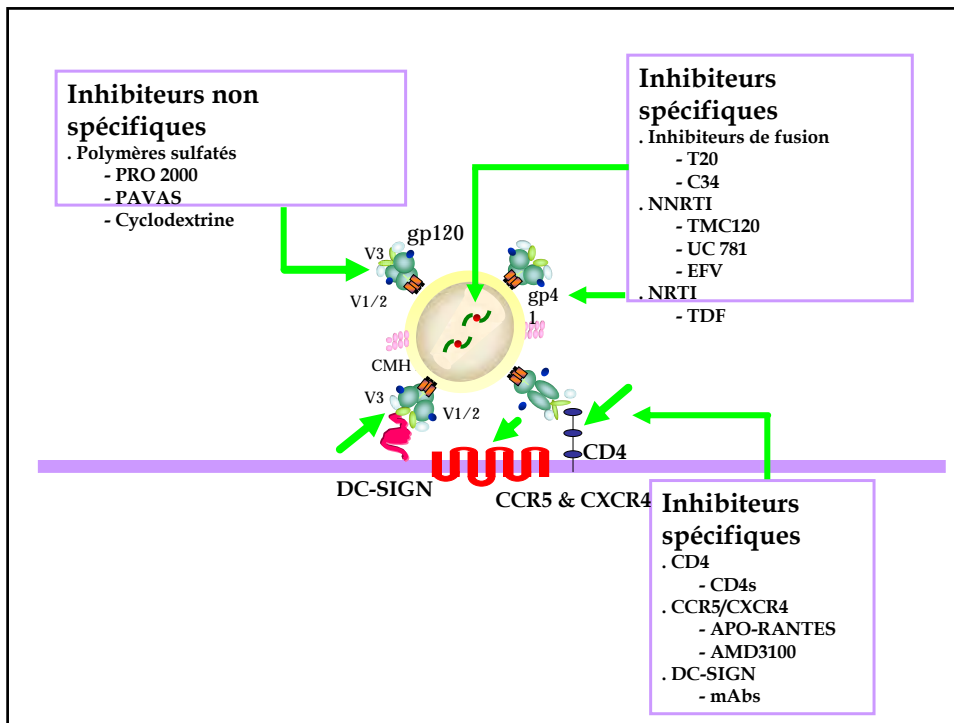
- Virus (X4-R5 tropique ; clade)
- Index thérapeutique in vitro
- Activité antivirale dans les fluides corporels (sperme, mucus, sang)
- Stabilité (conservation à +40°C pendant 6 mois)
- Formulation
- Développement
- Autorités réglementaires
- Production
- Coût
- Acceptabilité
- Efficacité/Toxicité

VIH comme cible



Cellule infectée comme cible





Développement pré-clinique de molécule microbicide

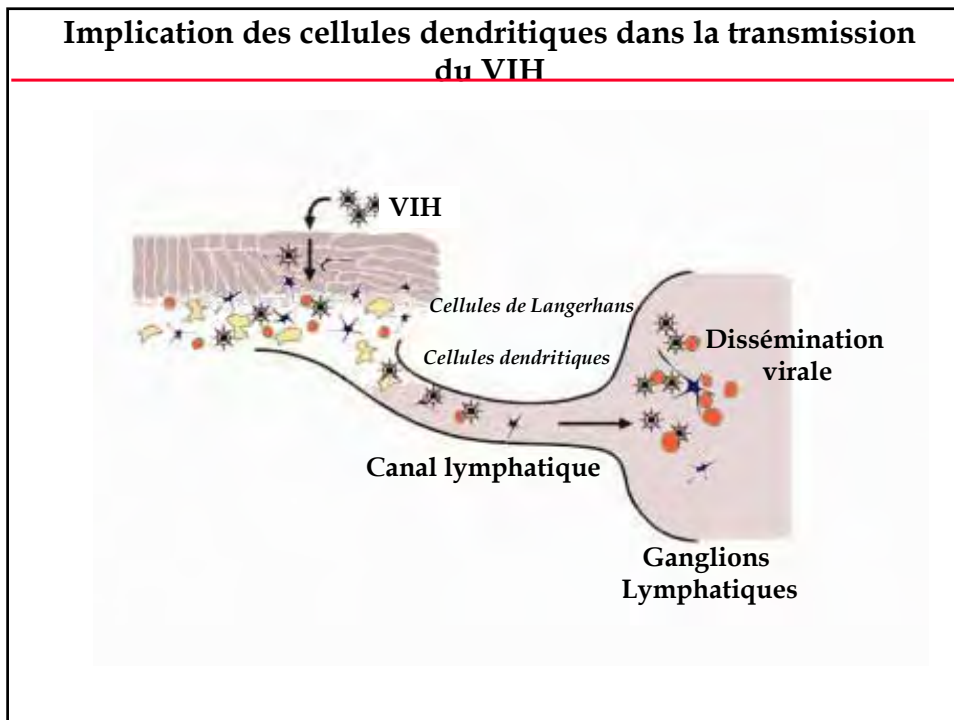
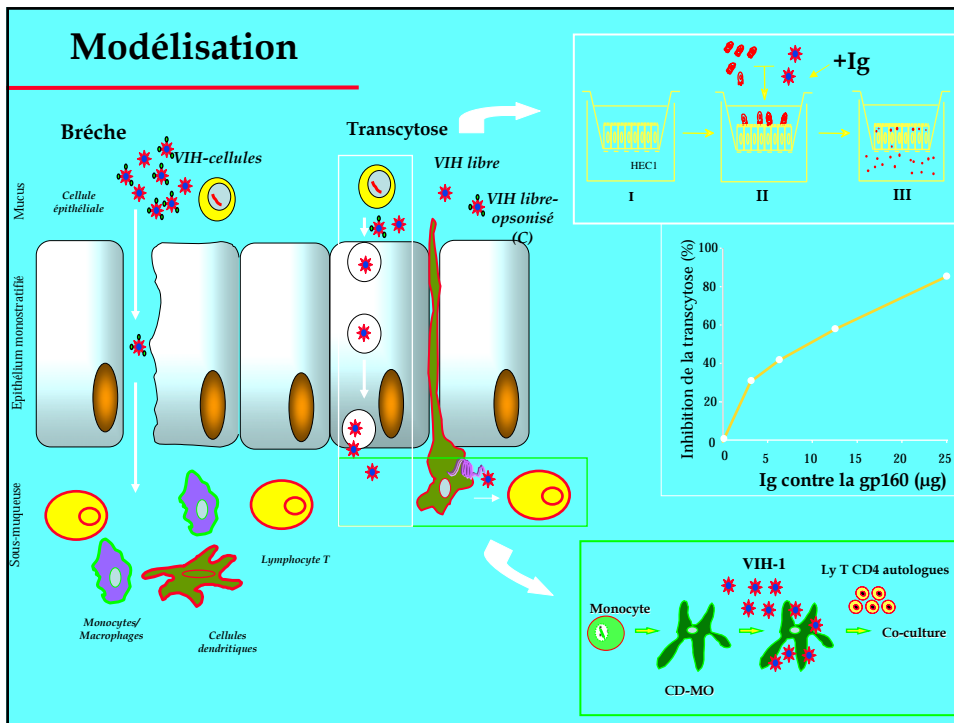
Recommandations pour tester les *composés actifs* ou les *formulations cliniques*

1. Activité *in vitro* contre le VIH :
 - A) En utilisant des lignées de laboratoire lymphocytotropiques ;
 - B) En utilisant des lignées de laboratoire issues de cellules mononucléées sanguines ;
 - C) En utilisant des isolats cliniques ;
 - D) En testant l'activité contre le virus associé aux cellules ;
 - E) En testant l'activité antivirale contre du sperme ou des sécrétions cervicovaginales infectées, ou dans un système *in vitro* approprié.
2. Activité *in vitro* contre d'autres agents pathogènes causant des MSTs :
 - A) *Neisseria gonorrhoeae* ;
 - B) *Chlamydia trachomatis* ;
 - C) *Haemophilus ducreyi* ;
 - D) *Trichomonas vaginalis* ;
 - E) Herpès simplex.
3. Activité spermicide (test de pénétration muqueuse ; mobilité du sperme).
4. Activité *in vitro* contre *Lactobacillus crispatus* et *Candida albicans*.
5. Evaluation des interactions avec le latex ou le polyuréthane, ou d'autres composés utilisés dans les barrières physiques.
6. Evaluation de l'irritation vaginale dans le modèle lapin (application 10 jours de suite du composé actif ou de la formulation pré-clinique).
7. Evaluation de l'activité de barrière chimique avec un modèle animal (pour le VIH : modèle Macaque/SIV ou modèle Chat/FIV).

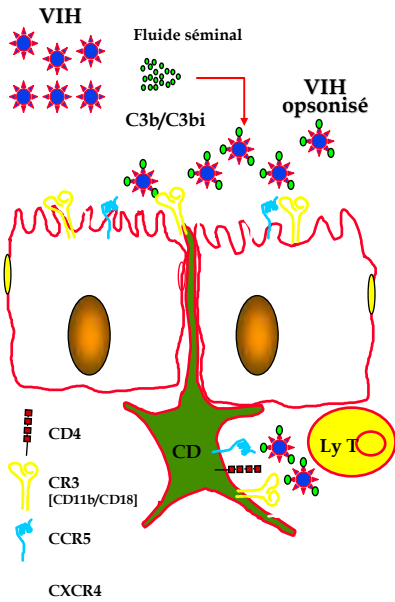
Evaluation *in vitro* de molécules à visée microbicide

Plateforme technologique de
biologie muqueuse (U743)





Modulation par le complément de l'infection par le VIH

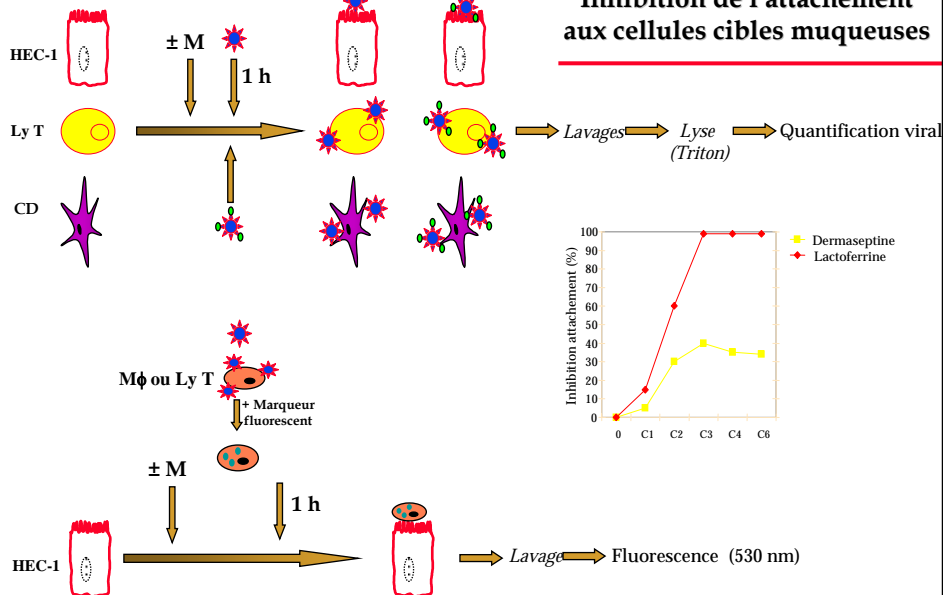


- ↑ Infection : x 2
- ◆ CR3 et co-récepteurs dépendante
- ↓ Effet inhibiteur de SDF-1
- ↑ Effet inhibiteur de RANTES
- Cellules épithéliales : L'opsonisation favorise l'utilisation de CCR5 par le VIH

- ↑ Infection : x 3-5
- ↑ Transfert CD → Ly T : x 3
- ↑ Attachement du VIH au DC-SIGN (50%)
- ◆ Infection dépendante de CR3, CCR5 et CXCR4
- ◆ Acquisition de double tropisme, CCR5 et CXCR4
- Cellules dendritiques : L'opsonisation favorise l'attachement du VIH au DC-SIGN et son transfert des CD aux lymphocytes T CD4

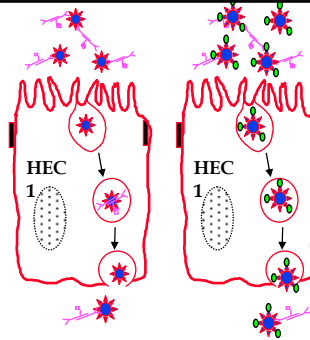
Bouhlal et al. J Immunol 2002;169:3301 ; Hocini et al, soumis 2005

Inhibition de l'attachement aux cellules cibles muqueuses

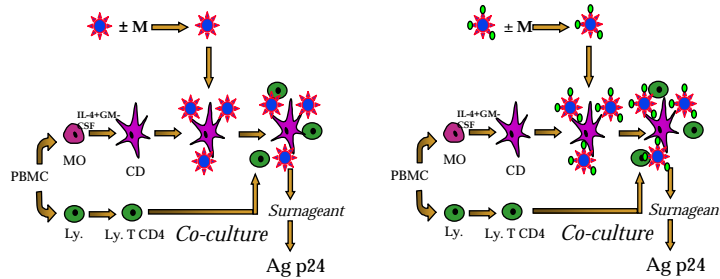


Inhibition de la transcytose du VIH

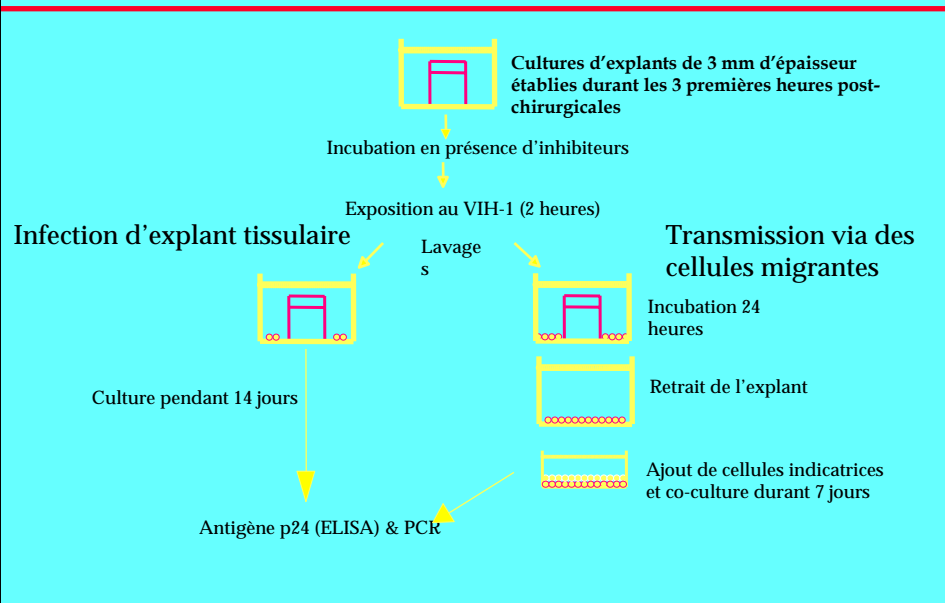
M = S-IgA ou nanobodies
 - Inhibition de la transcytose
 - Neutralisation du virus transcytosé

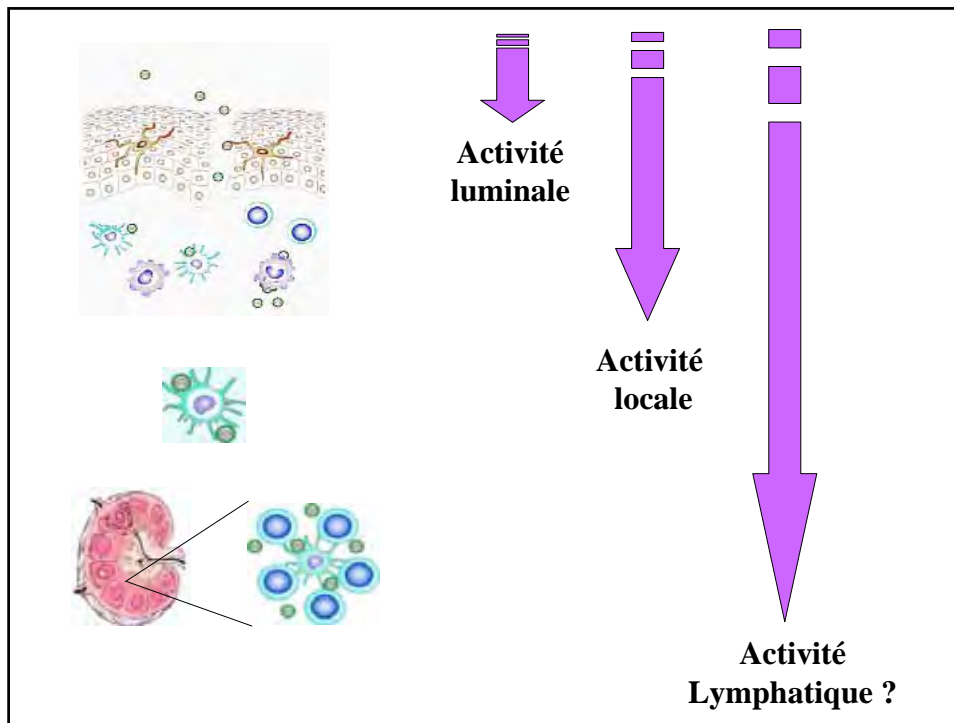


Inhibition du transfert du VIH des CD aux lymphocytes T CD4



Evaluation des inhibiteurs de fusion et/ou d'entrée du HIV-1 dans des modèles de tissus cervicaux et rectaux





Développement clinique de formulation microbicide

- Essai de phase I : Etude de tolérance du produit dans une petite population de femmes
- Essai de phase II : Etude de tolérance du produit sur une plus grande population de femmes à haut risque et premières preuves d'efficacité antivirale sur cette population
- Essai de phase III : Essai de plus grande envergure pour évaluer l'efficacité et la tolérance

Estimation de la taille de l'échantillon

(Durée de l'étude = 24 mois ; pouvoir = 90%)

Taux Contrôle	Taux Microbicide	Efficacité	Taille (n)
6%	4%	33%	12 520
7%	4,7%	33%	10 797
9%	6%	33%	8 501
6%	3%	50%	4 993
7%	3,5%	50%	4 304
9%	4,5%	50%	3 385

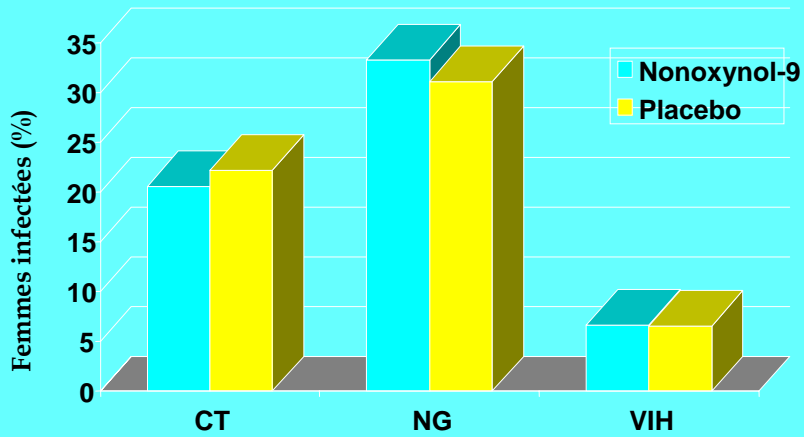
Lachin & Foulkes, Biometrics 198

Essais historiques avec le nonoxynol-9

→ Pas de corrélation entre le développement préclinique et les essais de phases I/II et le succès d'un essai de phase III ++++ !!!

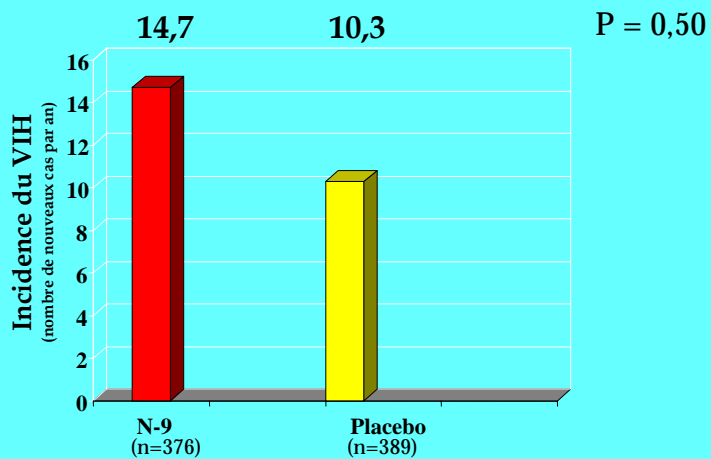
→ Tolérance muqueuse :
Tout aussi fondamentale que l'activité contre le VIH !!!

Acquisition des infections à *Chlamydia*, *N. Gonorrhoe*, et VIH dans des groupes traités par nonoxynol-9 ou placebo



Roddy et al. A Controlled Trial of Nonoxynol-9 Film to Reduce Male-to-Female Transmission of Sexually Transmitted Diseases. N Engl J Med 1998; 339:504-510

Effet d'une formulation du nonoxynol-9 sous forme de gel sur l'infection VIH (essais comprenant 765 femmes de 4 pays)



Van Damme et al. Lancet

Première génération de molécules

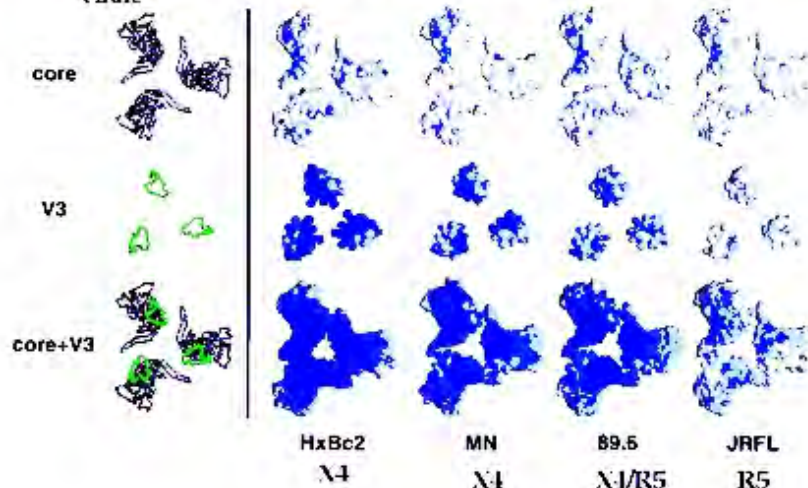
- **BufferGel**
- **Carraguard**
- **PRO-2000**
- **Dextrine-2-sulphatée**
- **Cellulose-sulphatée**
- **C31G**

Mécanismes d'action des molécules microbicides

**Les polyanions agissent au
niveau de la boucle V3**

Les virus X4 ont une enveloppe chargée plus positivement que celle des virus R5

→ La boucle V3 est la région la plus chargée de l'enveloppe virale

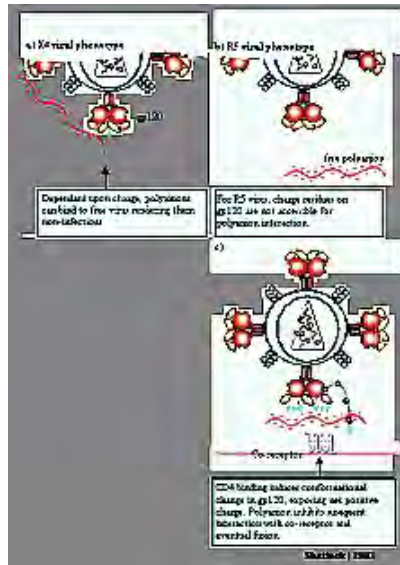


P. Kwong, Q. Sattentau (Aroniadou et al.), Virol 2000; 74:1988-1990

Les polyanions ont une activité virucide sur les virus X4 mais virustatique sur les virus R5

Polyanions	IC ₅₀			
	Activité virucide		Inhibition de fusion/attachement	
	X4	R5	X4	R5
Molécule 1	38 µg/ml	>1 mg/ml	3.6 µg/ml	20 µg/ml
Molécule 2	0.5 µg/ml	> 1mg/ml	38.7 ng/ml	ND
Molécule 3	0.5 µg/ml	> 1 mg/ml	3.14 µg/ml	5.2 µg/ml
Molécule 4	22.6 µg/ml	> 1 mg/ml	9.27 µg/ml	15.25 µg/ml
Molécule 5	0.18 µg/ml	> 100 µg/ml	14.8 ng/ml	4 µg/ml

L'interaction des polyanions avec la gp120/X4 est constitutive



L'interaction des polyanions avec la gp120/R5 nécessite la liaison à la molécule CD4 pour augmenter l'exposition aux résidus chargés positivement de la boucle V3

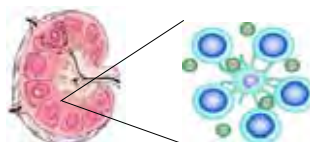
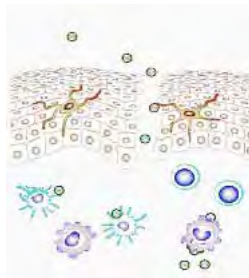
PRO 2000 (5 mg/ml) ; SIV 5/5

D2S (50 mg/ml) ; SIV 2/4

Cellulose sulphate ?

Buffer Gel ?

C31G ?



Carraguard (30 mg/ml) ; SIV 5/7

➔ Essais de phase III (5 en cours ou planifiés)

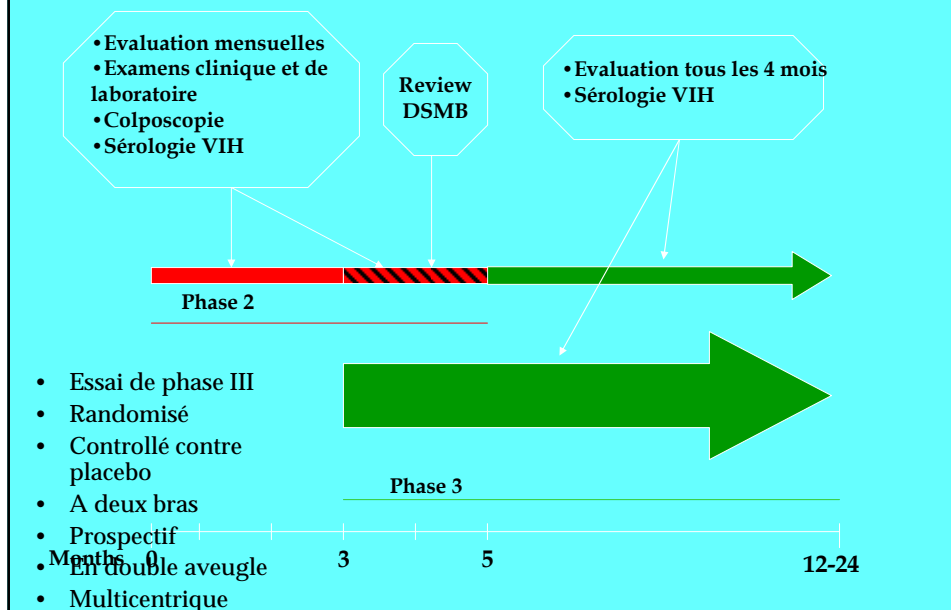
Microbicide effectiveness trials planned to begin in 2004

Network/ Sponsor	Product/s	N (design)	Countries	Sites	2004 Start
HPTN [NIAID] Indevus Reprotect	Pro2000/5 Buffergel	3,100 (4 arm)	India [Pune] Malawi [Blantyre, Llongwe] South Africa [Durban, Hlabisa] Tanzania [Moshi] Zambia [Chililabombwe, Lusaka] Zimbabwe [Chitungwiza, Harare]	10	Q2
Biosyn/ GMP/FHI	Saavy [C31g]	4,284 (2-arm phase III x 2)	Ghana [Accra, Kumasi] Nigeria [Lagos, Ibadan]	4	Q1
CONRAD/ GMP	Cellulose sulfate	2,500 (2-arm)	India [Chennai] Kenya [ACCT-Nairobi...rural?] Uganda [Kampala-Makerere] Benin [CIDA]	4	Q3
Population Council/CDC	Carraguard	2,700 (2-arm) 6,000 (3-arm)	Cameroon [Yaounde] South Africa [CapeTown, Soshanguve]	-2 3	2004 Q3
MRC [DFID] Indevus ML Labs	Pro 2000/5 Emmelle [dextrin sulfate]	12,000 (3-arm)	Cameroon, South Africa, Tanzania, Uganda Zimbabwe	7	Q1
Total		30,584		-30	

➔ Nombre de femmes = 30 584 ; Coût par essai > \$30M

Source: Alliance for Microbicide Development, Silver Spring, MD, USA

Exemple : Développement du Carraguard en Afrique du Sud



Exemple : Développement du Carraguard en Afrique du Sud

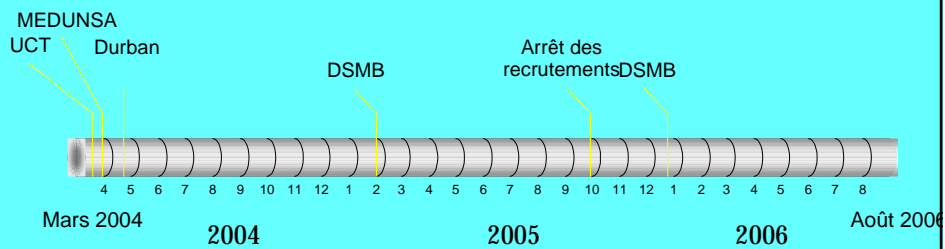


MEDUNSA
1 Site
(Soshanguve)

MRC
1-2 sites

UCT
1 Site
(Gugulethu/Nyanga)

Exemple : Développement du Carraguard en Afrique du Sud



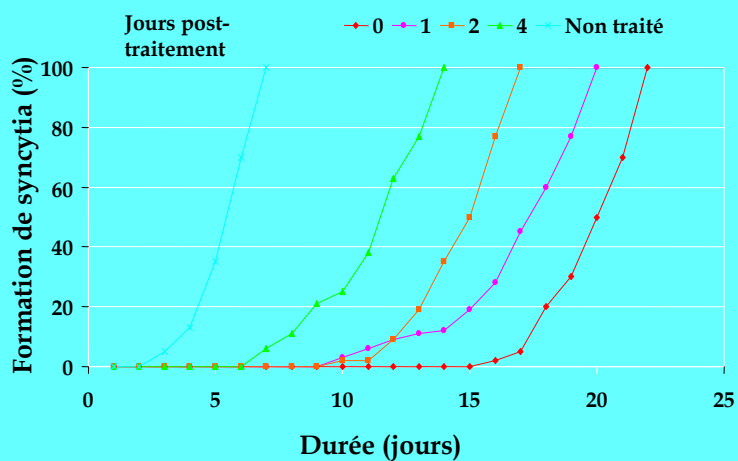
→ Premiers résultats des essais de phase III actuels : 2006 à 2007

→ Proof-of-concept de l'efficacité ????

Deuxième génération : Inhibiteurs de la transcriptase inverse comme molécules à visée microbicide

- | | |
|----------------------------|---|
| NtRTI | NNRTI |
| • Ténofovir
(TDF, PMPA) | • UC-781 |
| | • TMC-120 |
| | • Capravérine |
| | • Calanolide A |
| | • La plupart des
NNRTI de 3 ^o
génération |

Effet « mémoire » de l'UC-781(NNRTI)



Des cellules MT2 sont traitées avec 2 μ M d'UC-781 pendant 18 h, puis lavées, et infectées par du VIH-1

Borkow et al. J Virol
2009; 71: 2092

Deuxième génération de molécules

➔ Essais de phases I/II (environ 10 essais en cours)

Network/ Sponsor	Product/s	N (design)	Countries	Sites	2004 Start
Global Microbicide Project	PSS	90 (2-arms)	TBD	3	-
Starpharma	VivaGel SPL7013	24 (3- arms)	Australia	1	-
Global Microbicide Project	ACIDFORM	180	USA [Baltimore, MD; Pittsburgh, PA; Cincinnati, OH]	3	-
Gilead Sciences, Inc./ HPTN	PMPA	72	USA (New York, NY; Philadelphia, PA; Providence, RI)	3	-
CONRAD	UC-781	120	TBD	-	-
Tibotec	TMC-120	60	Belgium	1	-
MRC/DFID	Cellulose acetate phthalate	60	London, UK	1	-

Source: Alliance for Microbicide Development, Silver Spring, MD, USA

Troisième génération de molécules (2005-2009)

- Plus de 60 molécules sont en phase d'évaluation pré-clinique
- D'autres molécules, provenant de projets de grande envergure (EMPRO) ou d'études sur d'autres pathogènes arrivent en phase d'évaluation pré-clinique

➔ Ces 60 molécules/principes sont probablement insuffisants

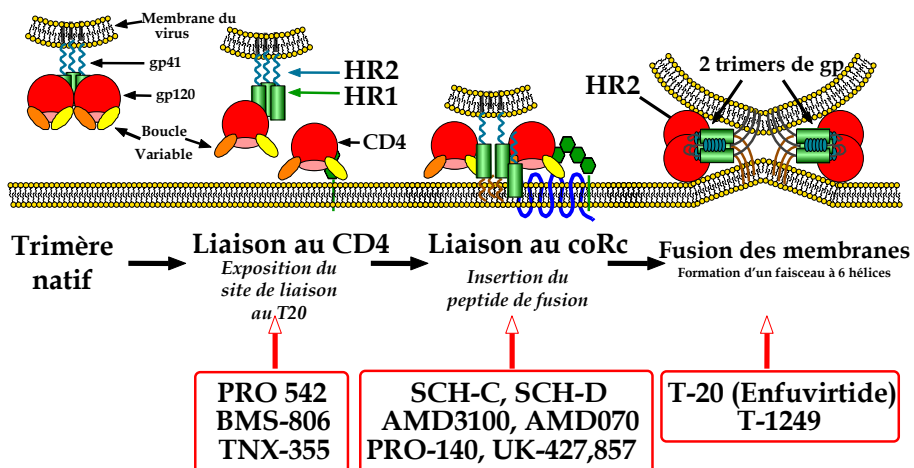
Programme Européen (VI° PCRD)

« EMPRO »

Coordinateurs
Robin Shattock & Charles Kelly



Mécanisme d'action des inhibiteurs de fusion



Moore & Doms. PNAS 2003;100:10598-10602

« European Microbicide Project - EMPRO » : WP6, WP11, WP15 & WP25

I. Nouvelles molécules

Productions de molécules (WP1)
 . CD4, CCR5, CXCR4, DC-SIGN gp120/41
 Sélection des inhibiteurs (WP2-13)

WP6
 WP11

II. Tests *in vitro*

WP14-18
 • Tests cellulaires
 • Tests d'inhibition

III. Production

Production des inhibiteurs (WP19-21)
 • Plantes transgéniques
 • Bactéries commensales
 Formulation (WP22-24)

WP15



IV. Modèle animaux V. Essais cliniques

Modèles animaux (WP25-26)
 • Macaques
 • Souris

Essais cliniques de phase I (WP27)
 Etudes toxicologiques

WP25

Workpackage 15 « Inhibition of HIV-1-mucosal target cell interactions »

RANTES analogues (P Luzzo, Italie) WP2

Caméloïdes VIH1 [nanobodies] (Ablynx NV, Belgique) WP3



Inhibiteurs peptidiques (Pepsan, Hollande) WP5

Mini-protéines CD4 (C Vila, France) WP6



Polysaccharides (S Penades, Espagne) WP7

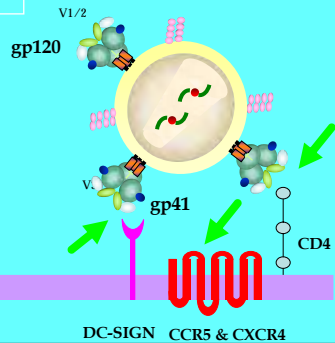


Anticorps (Pr A Skerra, Allemagne) WP4

Glycane polysulfatées (E Vicenzi, Italie) WP8

Lectines (J Balzarini, Belgique) WP10

S-IgA humanisés (M Bomsel, France) WP11



WP15 « LIM »

Conception et standardisation de tests évaluant l'inhibition de l'attachement du VIH avec les cellules cibles

VIH-1 libre

VIH-1 associé aux cellules

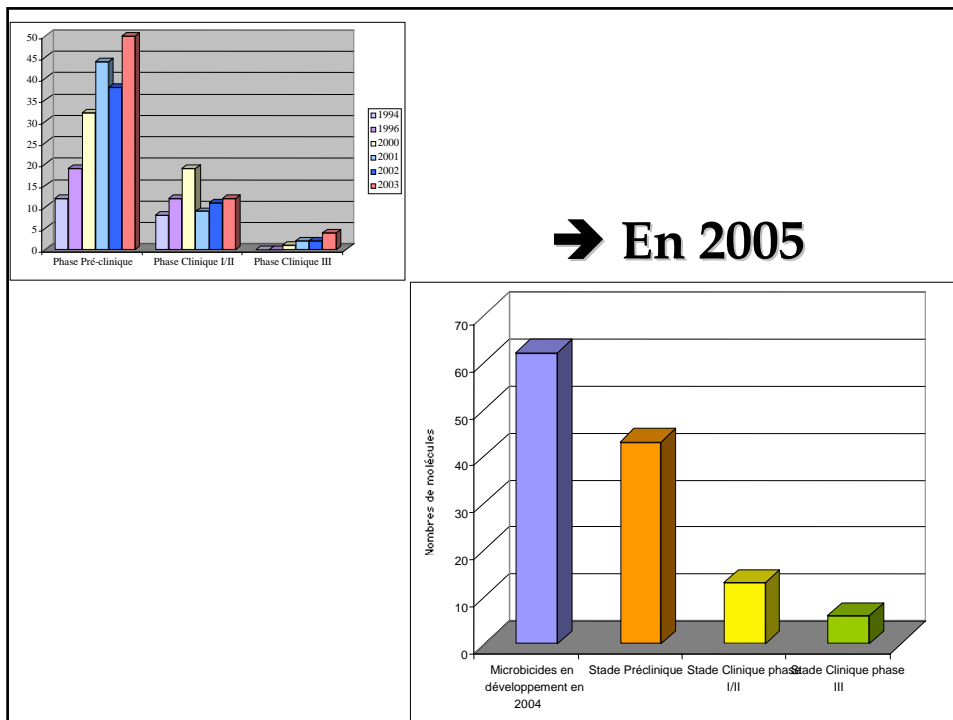
Opsonisation par le complément

Cellules cibles muqueuses

Cellules épithéliales

Cellules dendritiques

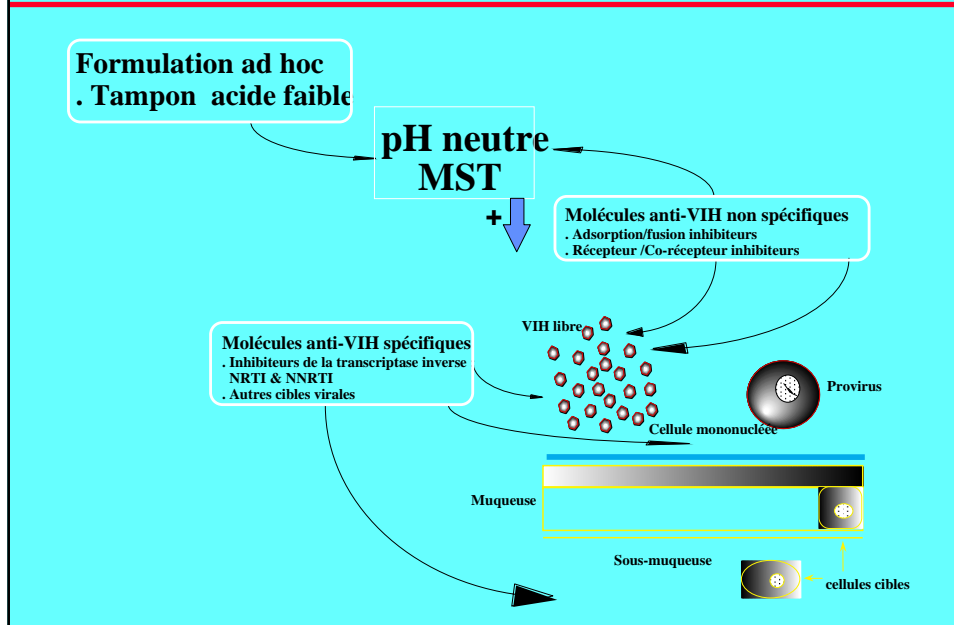
Lymphocytes T



L'efficacité d'une formulation à visée microbicide dépendra également de

Formulation
Stabilité
Acceptabilité
Production
Distribution

Développement d'association de plusieurs molécules



Problème de la production de masse de produit a

Molécule	Concentration	Infection	Virus
PRO-2000	5 mg/ml	0/7	SHIV89.6
Dextrin-2-sulphate	50 mg/ml	2/4	SHIV89.6
Carraguard	30 mg/ml	2/7	SIV
CAP	120 mg/ml	3/10	SHIV162P+SF33A
Cyanovirine	5 mg/ml	0/5	SHIV89.6
PSC-RANTES	6 mg/ml	0/5	SHIV162P
MAb b12	5mg/ml	1/5	SHIV162P

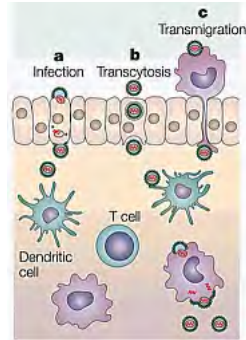
→ En utilisant une formulation à 0,5% 4 fois par semaine, 10 millions de femmes utiliseraient 31 000 kgs de principe actif par an

PRO2000 (M. Lewis, SRI), Dextrin-2-sulphate (J. Weber et al AIDS 2001, 15: 1563), CAP (C. Cheng-Meyer, Aaron Diamond), Cyanovirin (C-C Tsai, AIDS Res. Hum Retroviruses 2004; 20: 11-18), PSC-RANTES (R. Veazey), B12 MAb (R. Veazey, Nature Medicine, 2003. 9:343-346)

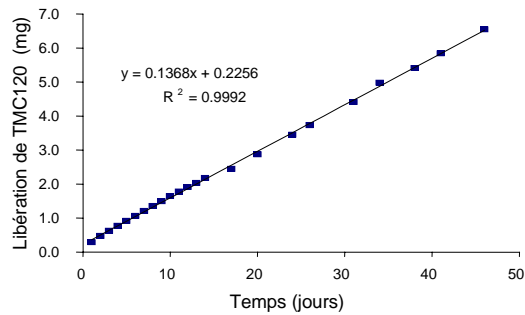
Développement de microbicides rectaux



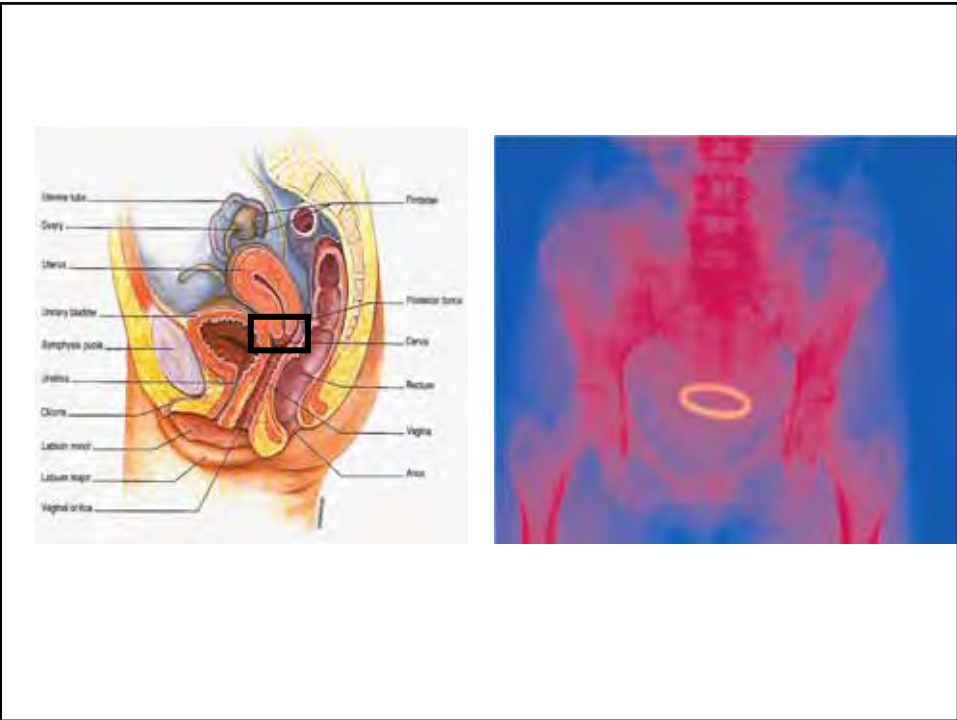
Double contrast of the normal rectum.



Anneau : Procédé normalisé de délivrance vaginale



Karl Malcolm & David Woolfson, Queens University, Belfast



Tampon : Procédé normalisé de délivrance vaginale



Possibilités

et

Challenges

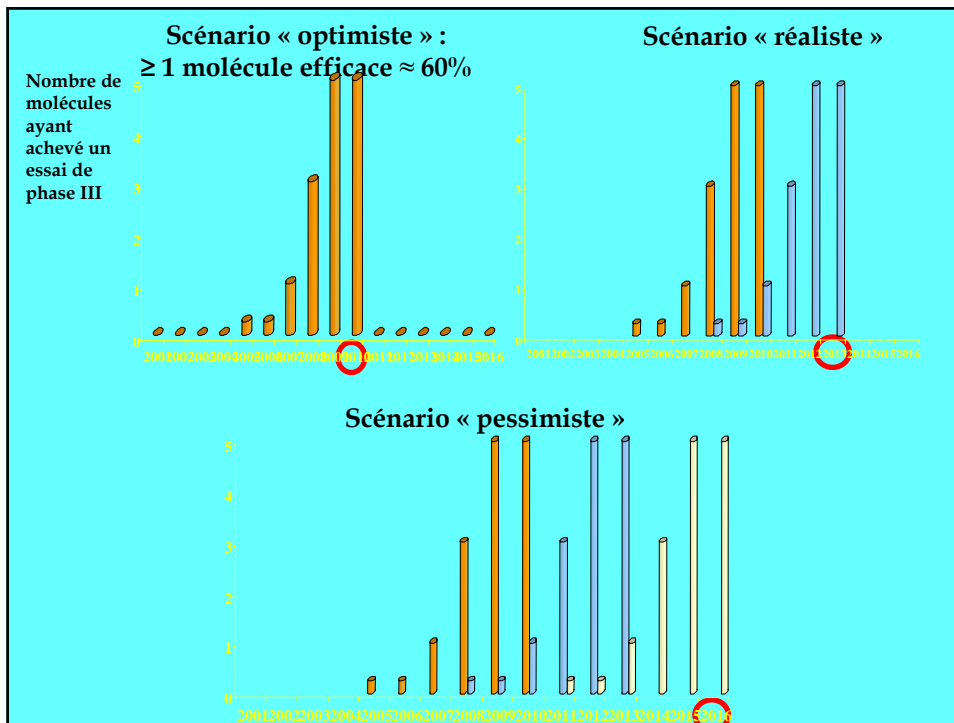
- Plusieurs mécanismes connus
- Multiples molécules disponibles
- Modèles disponibles (in vitro ; in vivo)
- Marqueurs de toxicité
- Formulations réalisables

- Rationnel pour le développement de formulation entre le développement préclinique et le développement clinique
- Premier essai de phase III démontrant l'efficacité même partielle d'une molécule++++

Impact théorique des microbicides (modélisation)

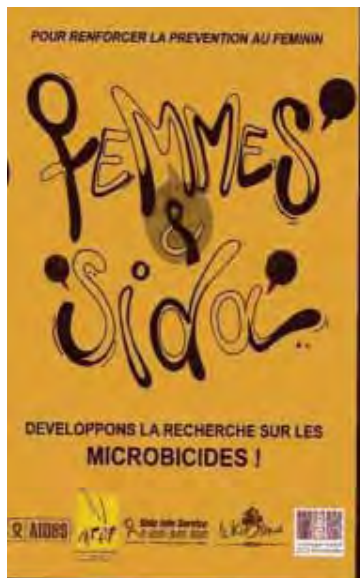
Hypothèse : Microbicide efficace à 60%

→ Plus de 2,5 millions de nouveaux cas d'infection à VIH évitées en 3 ans



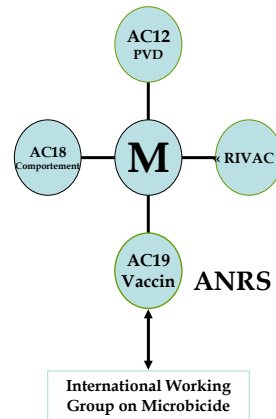
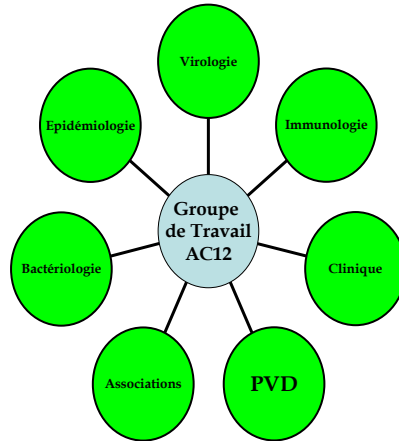
Recherche sur les microbicides à l'ANRS





Groupe de Travail « Microbicides et Prévention de la Transmission Sexuelle du VIH dans les Pays en Développement » de l'AC12 (Coordonateur : L Bélec)

➔ **Multi-disciplinaire et internationale** [France, Belgique, Italie, Pays en développement (Cameroun, Centrafrique)]



Programme ANRS

« MULTIMICRO Project » :
« Barrière chimique pour la prévention de la transmission sexuelle du VIH : Développement d'une association de molécules à visée microbicide »

Sous l'égide de l'AC12

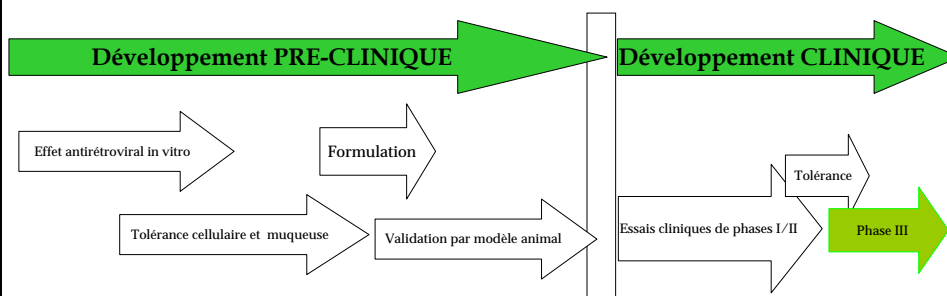
Multi-Micro Project : Partenariat Européen



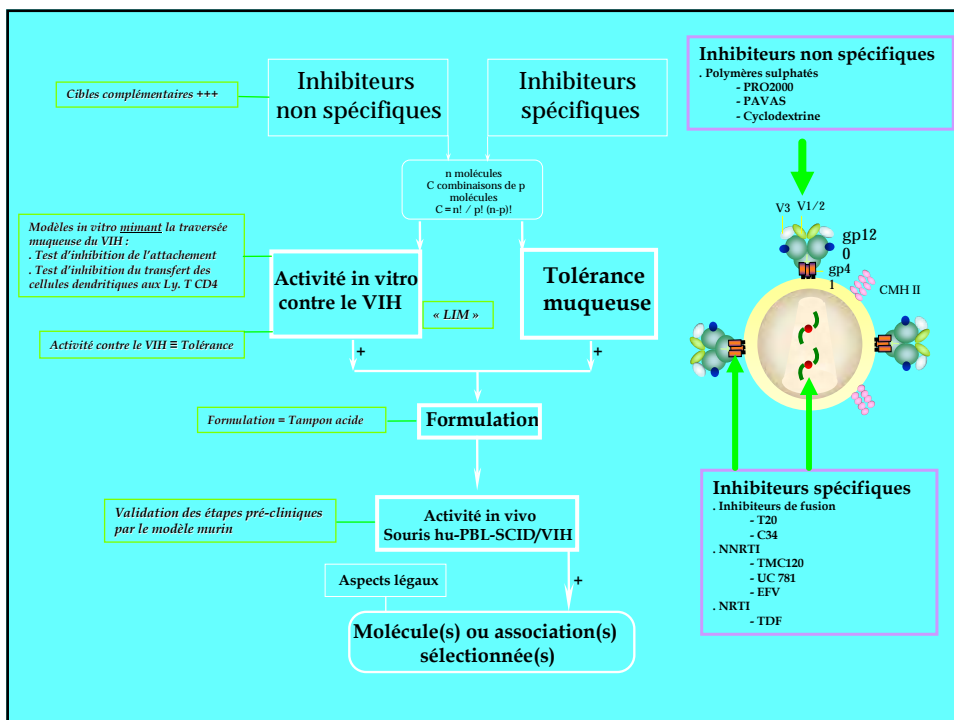
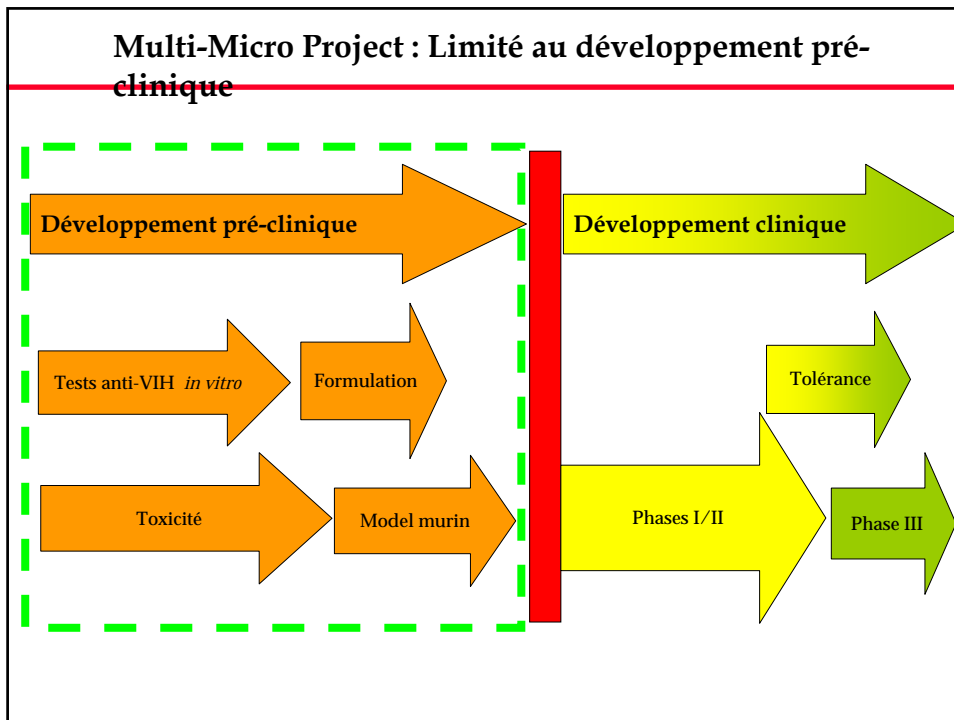
- INSERM U743 (Equipe IBM, Paris)
- CEA (Paris) --
- Institut Rega (Leuven)
- Laboratory for Pharmacology and Biopharmacy (Leuven)
- ITM (Antwerpen)

- Istituto Superiore Di Sanita (Rome)

ANRS « Multi-Micro Project » : Rationnel



Hypothèse (*proof-of-concept*)
Association >>> Molécule isolée



Multi-Micro Project : Molécules candidates

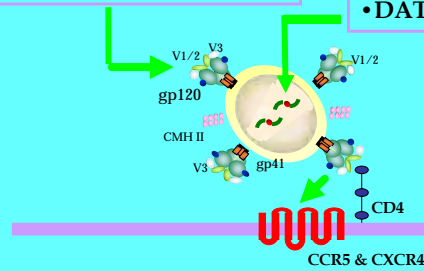
→ ≥ 10 molécules originales
→ 6 classes

Inhibiteurs non spécifiques

- Polymères sulfatés (PVAS)
- Antibiotiques (vancomycine, téicoplanine, érémomycine)

Inhibiteurs spécifiques

- Hept NNRTI
- DATA/DAPI NNRTI



Inhibiteurs spécifiques

- Lectines végétales (spécifiques du mannose et du N-acétylglucosamine)
- CADA
- Antagonistes CCR5/CXCR4

+ Contrôles « classiques » dans chaque classe

Multi-Micro Project : Algorithme de développement

→ Six classes de molécules candidates

Lectines, Antibiotiques, CADA, Antagonistes de chimiokines, Polyanions et NNRTI

Activité contre le VIH *in vitro*

- Tests classiques (Institut Rega)
- Inhibition de l'attachement VIH aux cellules épithéliales (INSERM U743)
- Inhibition du transfert du VIH des CD → Lymphocytes T CD4 autologues (U743 & IMTA)

Toxicité muqueuse

- Tests *in vitro*
- Modèles animaux
Limace
Lapine

Meilleures molécules candidates

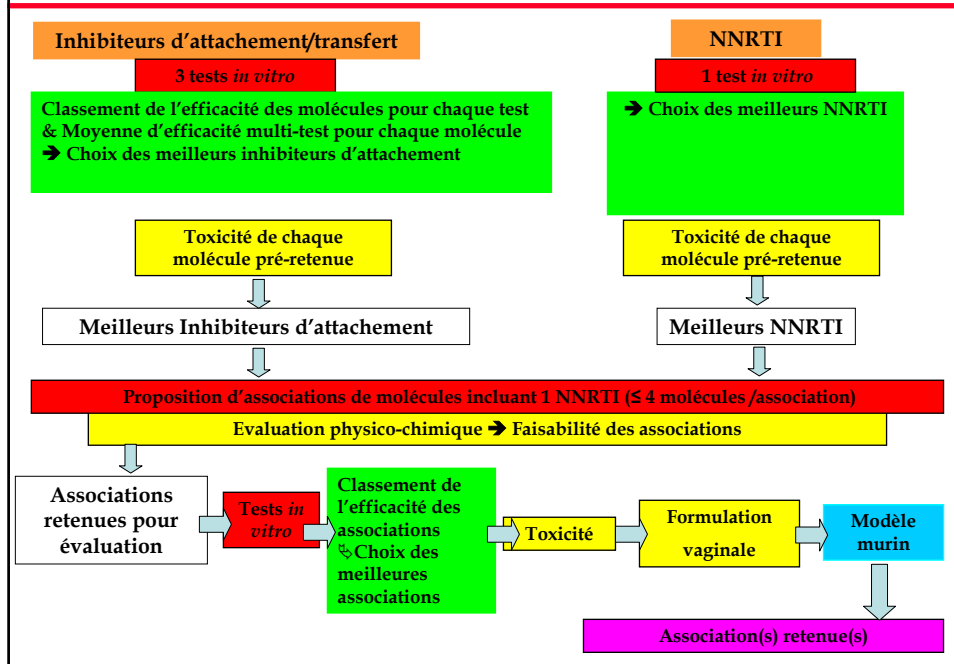
$C = n! / p! (n-p)!$
associations

Formulation & évaluation physico-chimique (Université de Louvain)

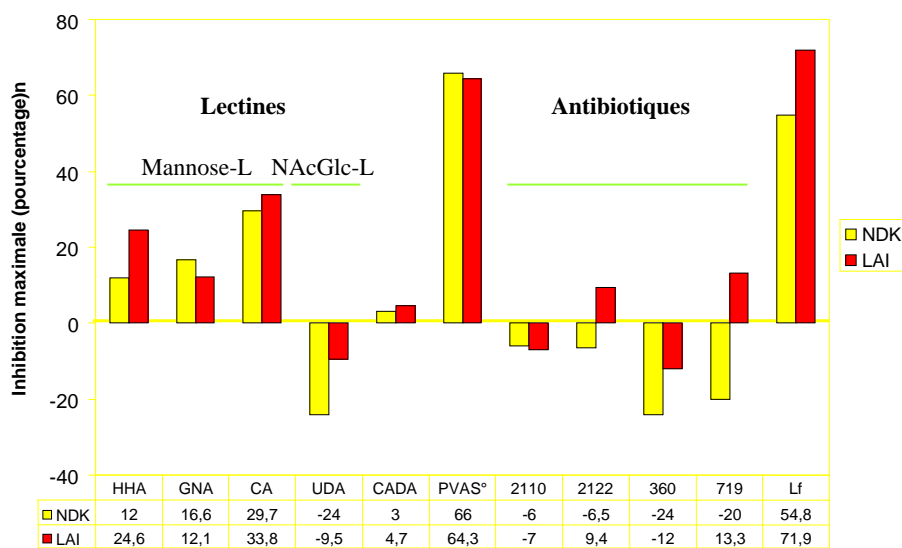
Modèle murin (Istituto Superiore Di Sanita)

Associations candidates

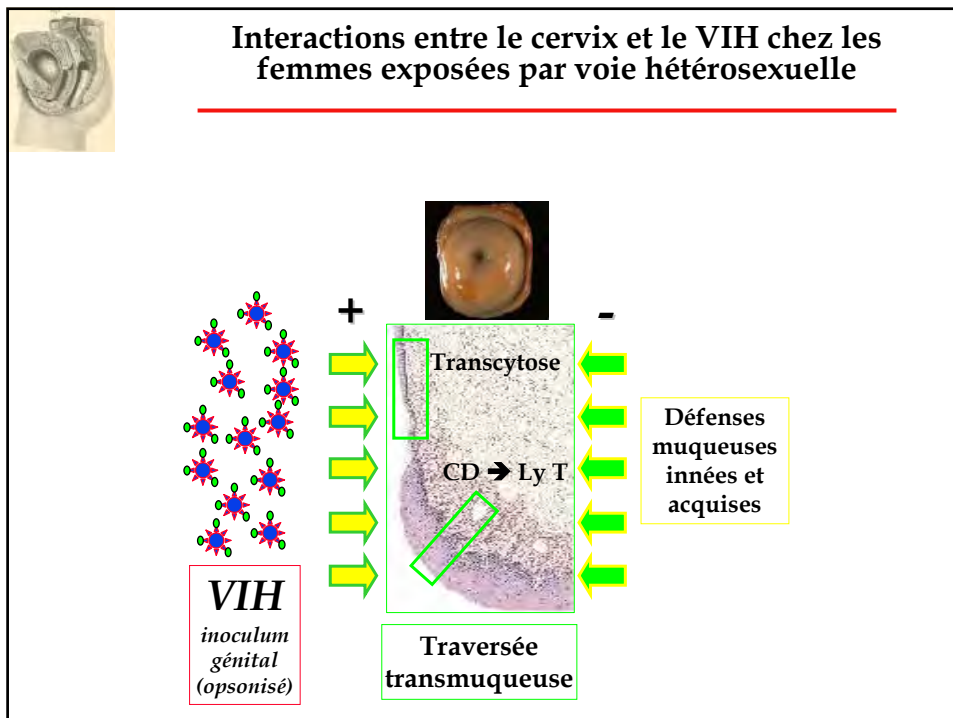
Multi-Micro Project : Algorithme décisionnel

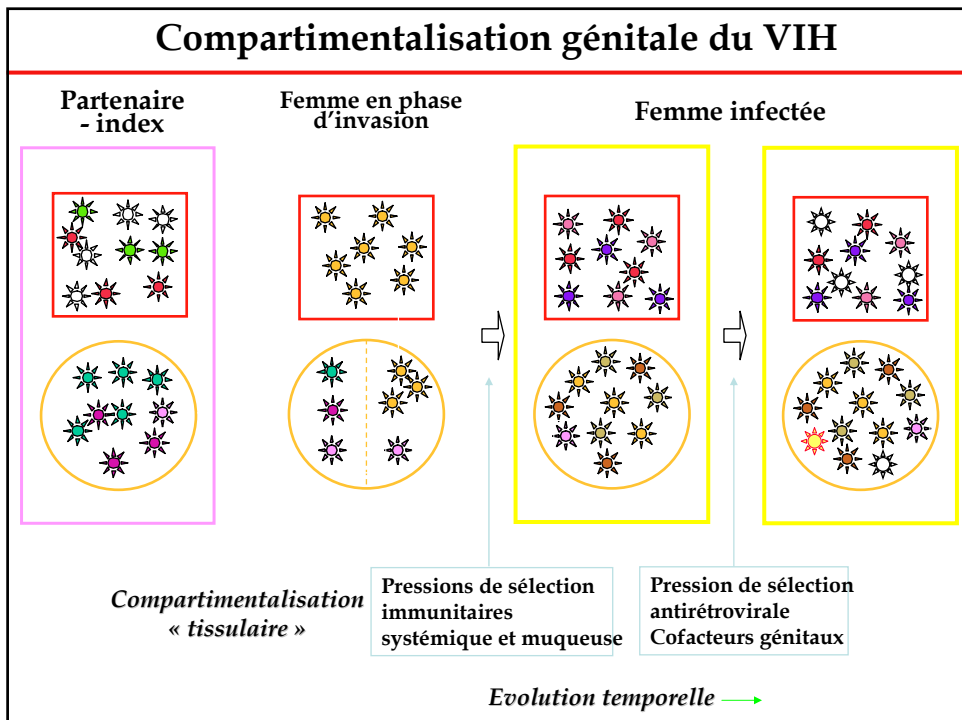
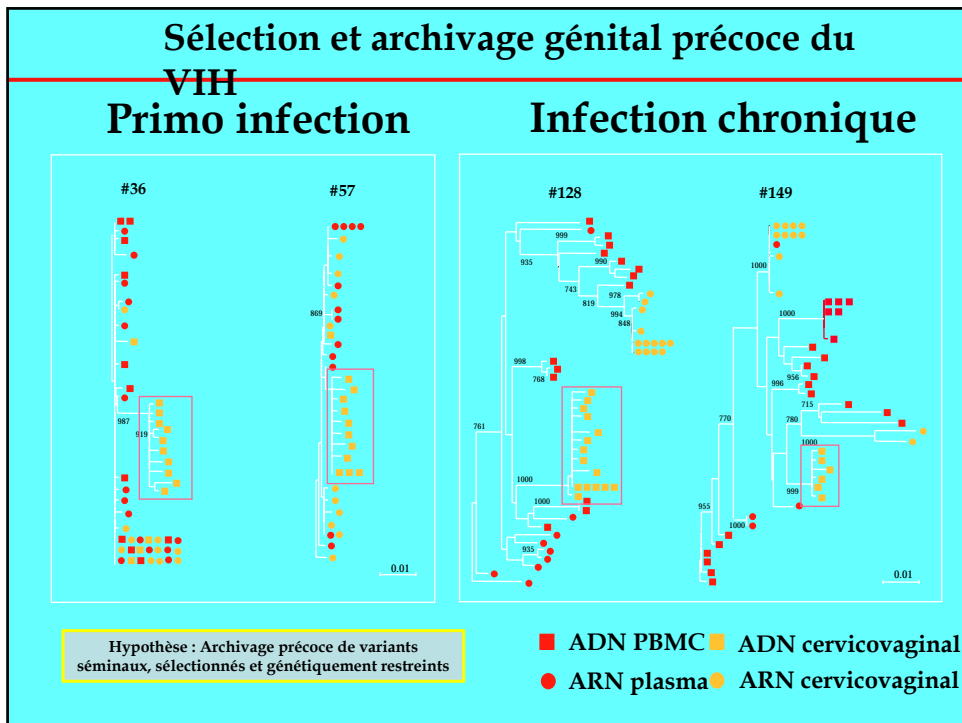


Résultats préliminaires Inhibition de l'attachement du VIH sur les cellules HEC-1

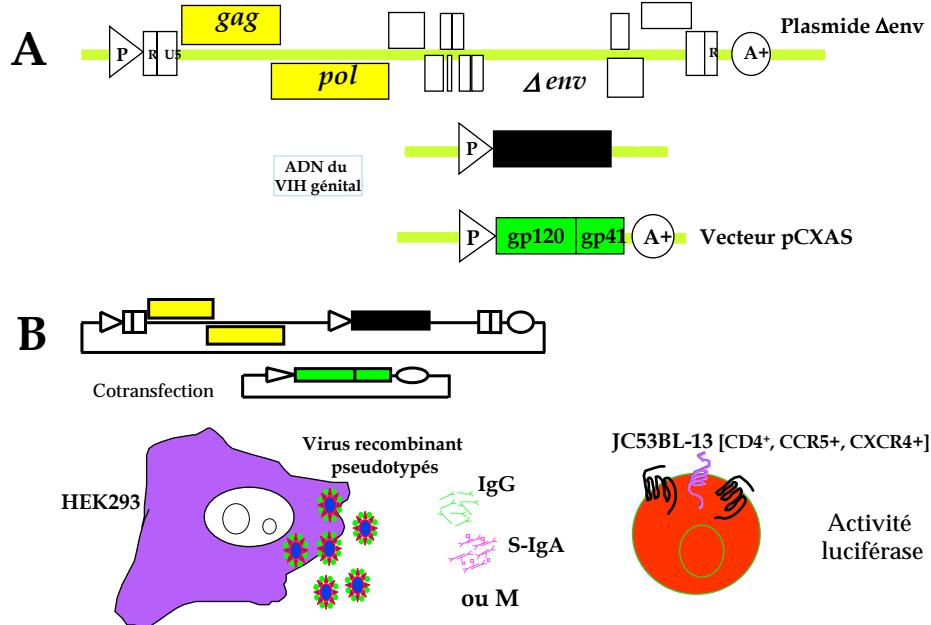


Développements

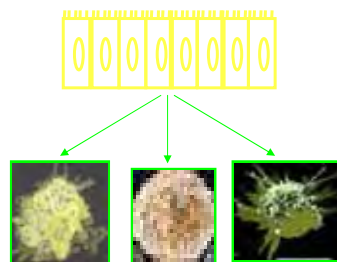




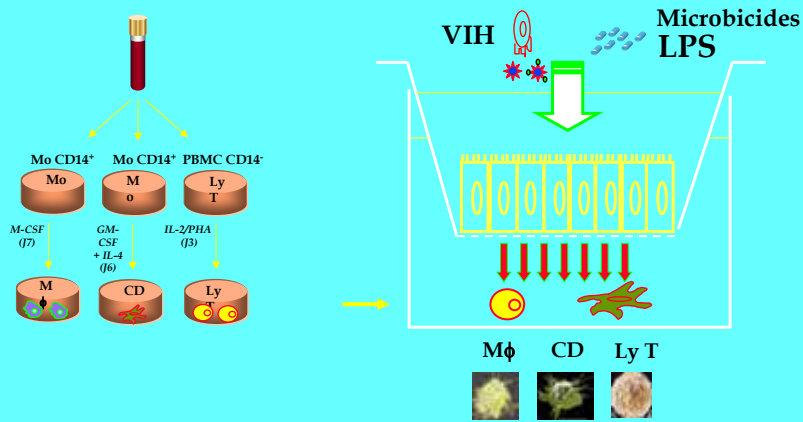
➔ Recombinant Virus Neutralization Assay



Interactions des cellules épithéliales avec les cellules cibles du VIH dans la sous-muqueuse

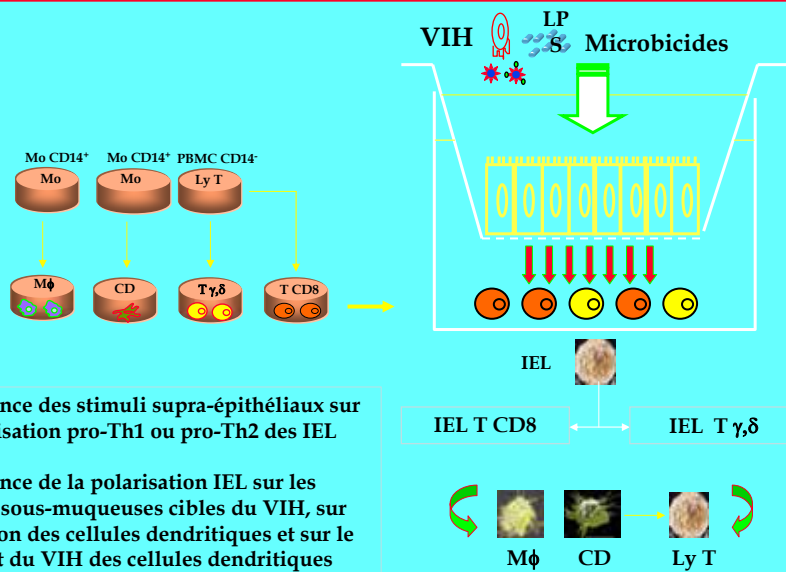


Interactions entre cellules épithéliales et cellules cibles sous-muqueuses



- Influence de facteurs cellulaires épithéliaux sur :
 - Le phénotype des cellules sous-muqueuses
 - L'infection des cellules dendritiques
 - Le transfert aux lymphocytes T CD4
- Identification des facteurs impliqués

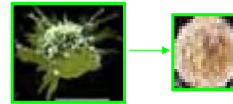
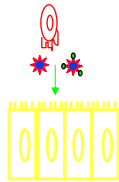
Interactions entre cellules épithéliales et des IEL



- Influence des stimuli supra-épithéliaux sur la polarisation pro-Th1 ou pro-Th2 des IEL
- Influence de la polarisation IEL sur les cellules sous-muqueuses cibles du VIH, sur l'infection des cellules dendritiques et sur le transfert du VIH des cellules dendritiques aux lymphocytes T CD4

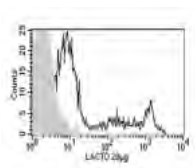
Molécules naturelles inhibitrices du passage transmuqueux

→ Molécules candidates pour le développement d'une association microbicide « naturelle » ?

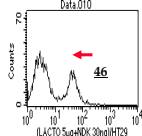
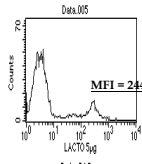


Inhibition de l'attachement du VIH par la lactoferrine

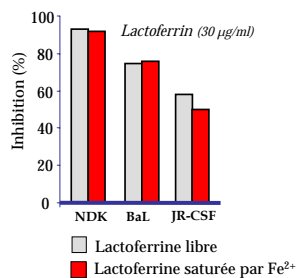
Attachement sur HT-29



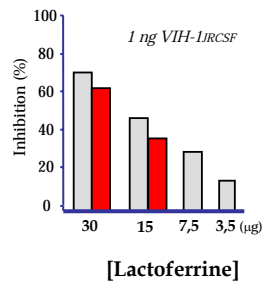
Déplacement de l'attachement sur HT-29 par



Inhibition attachement sur HT-29

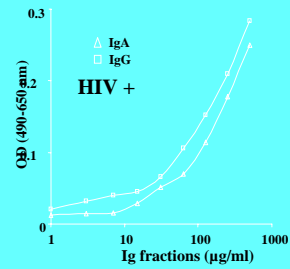
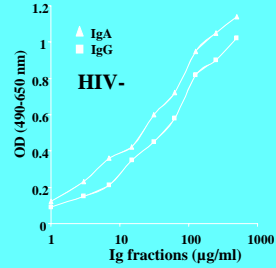
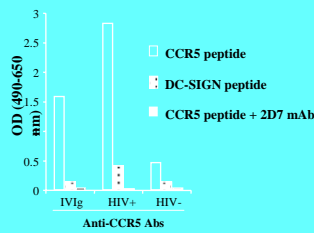
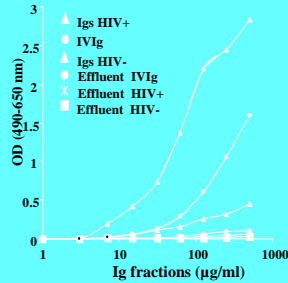
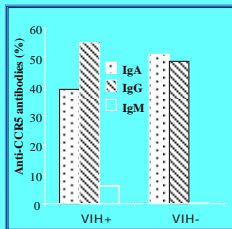
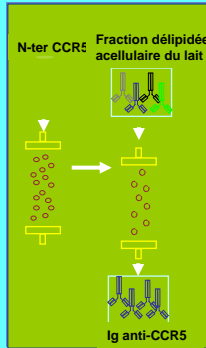


Inhibition infection HT-29



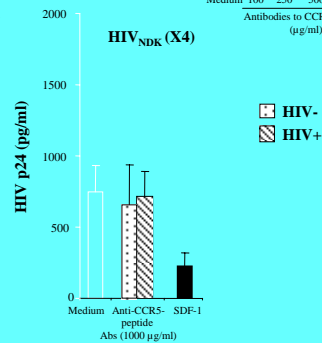
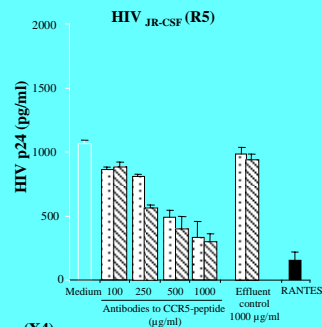
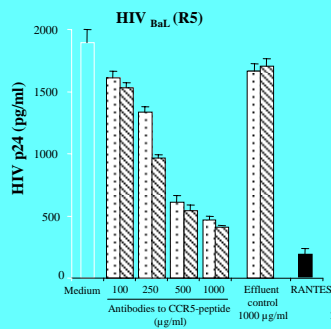
- Evaluation de l'inhibition de l'attachement sur :
 - Les cellules épithéliales HEC-1 et génitales primaires
 - Les autres cellules cibles muqueuses
- Mécanismes d'action

Immunoglobulines naturelles du lait maternel contre CCR5

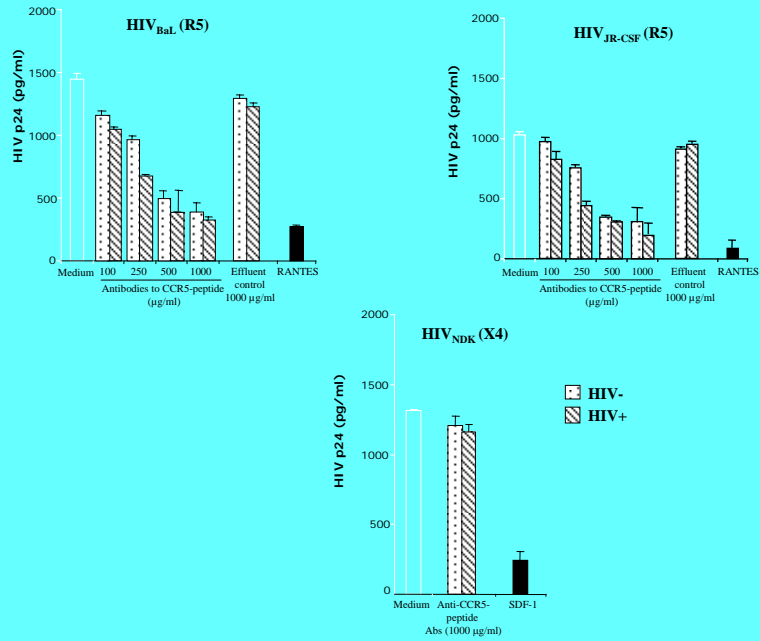


Bouhjal et al. J Immunol 2005

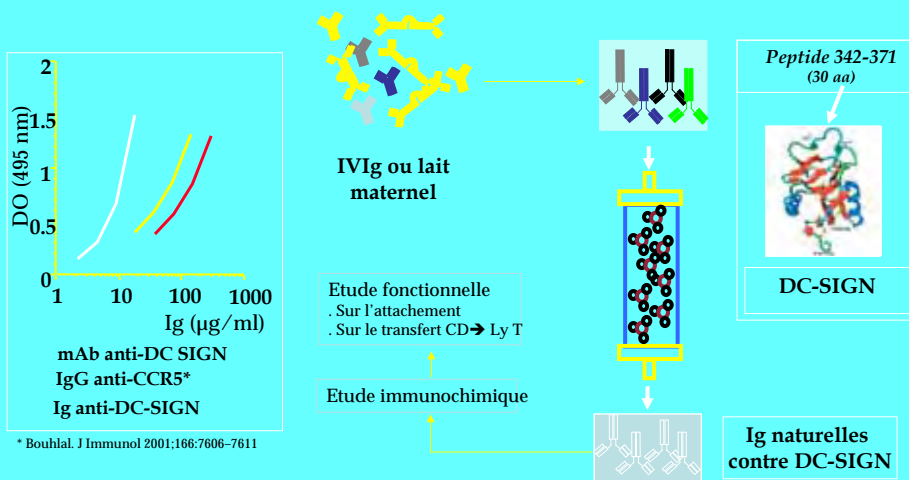
→ Inhibition de l'infection des macrophages par les Ig anti-CCR5 du lait maternel



➔ Inhibition de l'infection des cellules dendritiques par les Ig anti-CCR5 du lait

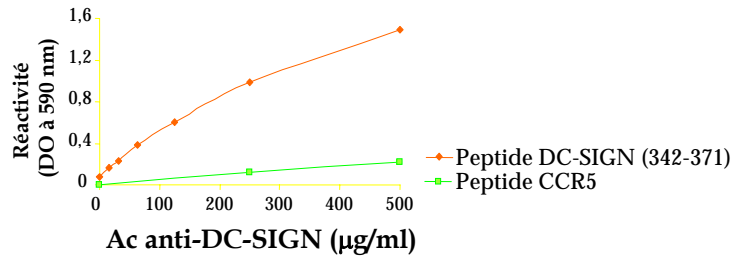


Inhibition du transfert du VIH des cellules dendritiques aux lymphocytes T par les anticorps naturels anti-DC-SIGN

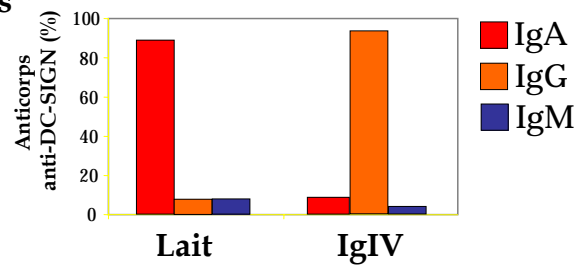


Caractérisation des immunoglobulines naturelles anti-DC-SIGN

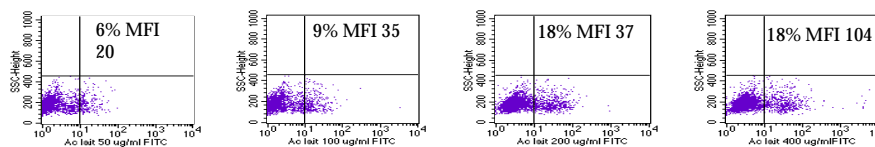
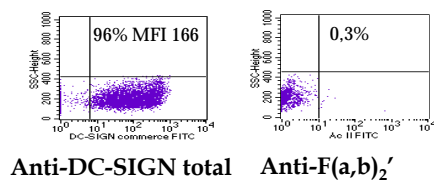
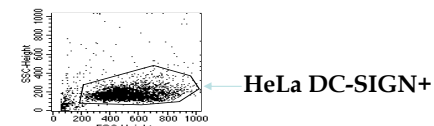
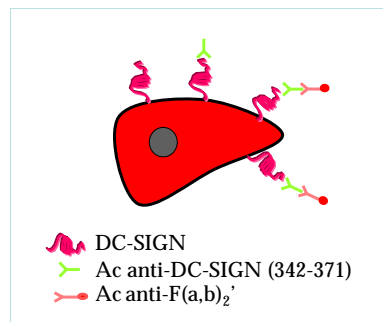
A. Spécificité des immunoglobulines anti-DC-SIGN



B. Formes moléculaires



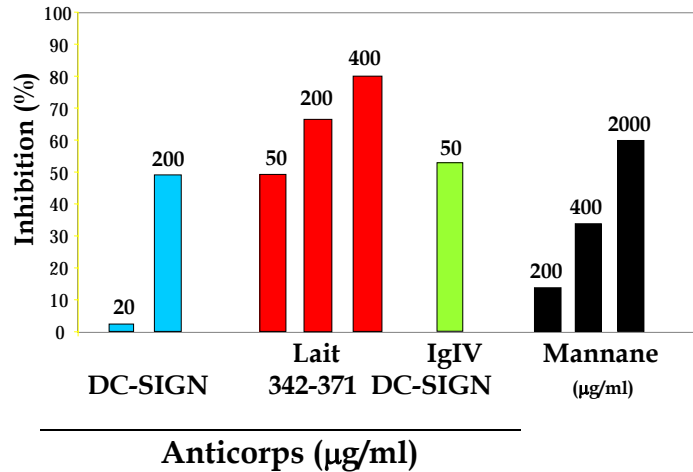
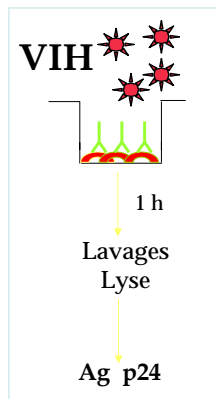
Expression du peptide DC-SIGN (342-371) sur HeLa DC-SIGN⁺



Anticorps naturels anti-DC-SIGN (342-371) purifiés du lait

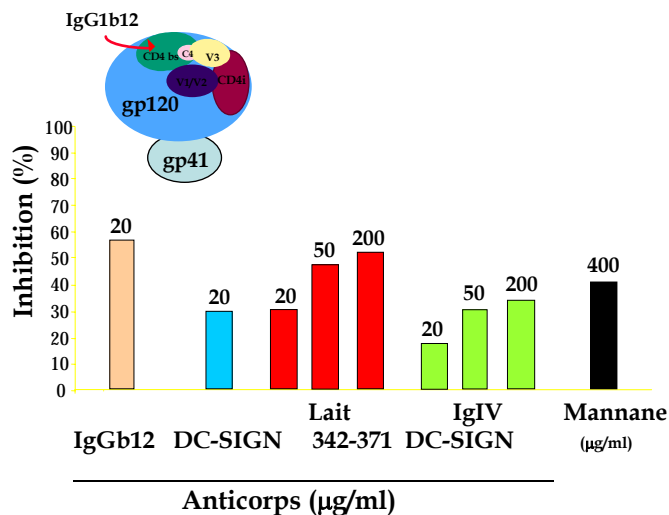
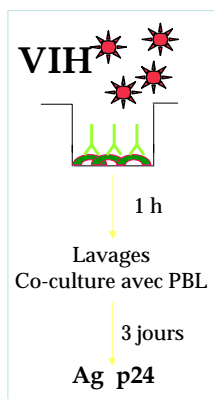
➡ Fixation dose-dépendante des anticorps naturels contre DC-SIGN (342-371)

Inhibition de l'attachement du VIH aux cellules HeLa DC-SIGN⁺



➔ Inhibition dose-dépendante de l'attachement du VIH aux HeLa DC-SIGN⁺ par les anticorps naturels anti-DC-SIGN et le mannane

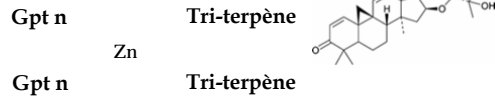
Inhibition du transfert du VIH des CD aux lymphocytes T



➔ Inhibition dose-dépendante du transfert du VIH des cellules dendritiques aux lymphocytes T CD4 par les anticorps naturels anti-DC-SIGN

Evaluation des composés tri-terpéniques naturels C14-1 et C14-2

→ Complexe métallique (Zn^{2+}) tri-terpénique végétal

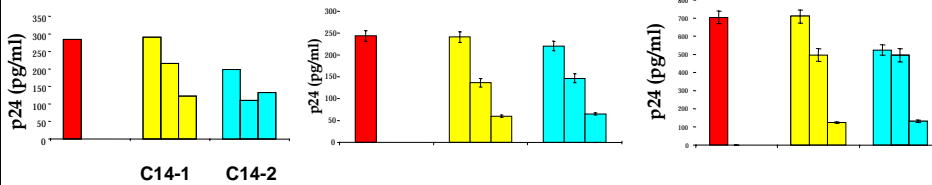


VIH_{Bal}

Infection des macrophages

Infection des dendritiques

Transfert du virus des CD
 → Lymphocytes T CD4

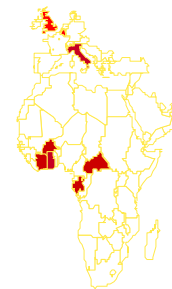


Equipe
 « Immunité et Biothérapie
 Muqueuse » - U743



Plate-forme technologique de
 biologie muqueuse (ANRS)

Centre de Recherches
 Biomédicales des
 Cordeliers



Coopérations internationales