

WO 2013/060980 A1

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale

WO 2013/060980 A1

(43) Date de la publication internationale
2 mai 2013 (02.05.2013)

(51) Classification internationale des brevets :
C07D 487/04 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2012/052433

(22) Date de dépôt international :
23 octobre 2012 (23.10.2012)

(25) Langue de dépôt :
français

(26) Langue de publication :
français

(30) Données relatives à la priorité :
1159622 24 octobre 2011 (24.10.2011) FR

(71) Déposant : UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6) [FR/FR]; 4, Place Jussieu, F-75005 Paris (FR).

(72) Inventeurs : CALVEZ, Vincent; 33 rue gay Lussac, F-75005 Paris (FR). MARCELIN, Anne-Geneviève; 15 rue des Feuillantines, F-75005 Paris (FR). SOULIE, Cathia; 108 avenue du Général Bizot, F-75012 Paris (FR). ETHE-VE-QUELQUEJEU, Mélanie; 18, avenue Marcel David, F-94600 Choisy-Le-Roi (FR). SOLLOGOUB, Matthieu; 2, square de Clignancourt, F-75018 Paris (FR).

(74) Mandataires : CHAJMOWICZ, Marion et al.; Becker & Associes, 25 rue Louis Le Grand, F-75 002 Paris (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, BN, 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, PA, 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, 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).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

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

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : NUCLEOSIDE ANALOGUES FOR TREATING A VIRAL INFECTION, AND METHOD FOR EVALUATING THE SENSITIVITY TO SAID TREATMENT

(54) Titre : ANALOGUES DE NUCLEOSIDES POUR LE TRAITEMENT D'UNE INFECTION VIRALE, ET METHODE D'EVALUATION DE LA SENSIBILITE AUDIT TRAITEMENT

(57) Abstract : The present invention describes the use of nucleoside analogues for treating viral infections, in particular an HIV infection, and also compositions comprising at least one of these analogues, and a method for evaluating the sensitivity to said treatment.

(57) Abrégé : La présente invention décrit l'utilisation d'analogues de nucléosides pour le traitement d'infections virales, notamment d'une infection par le VIH, ainsi que des compositions comprenant au moins un de ces analogues, et une méthode d'évaluation de la sensibilité audit traitement.

**Analogues de nucléosides pour le traitement d'une infection virale, et méthode d'évaluation
de la sensibilité audit traitement**

La présente invention décrit des analogues de nucléosides et leur utilisation pour le traitement
5 d'une infection virale, en particulier une infection par le Virus de l'Immunodéficience acquise
Humaine (VIH).

Arrière-plan de l'invention

10 Les médicaments proposés dans le traitement du VIH peuvent être répartis en six classes : les inhibiteurs de la transcriptase inverse nucléosidiques (nucléotidiques) [N(t)RTIs], les inhibiteurs de la transcriptase inverse non nucléosidiques [NNRTIs], les inhibiteurs de protéase [PIs], les inhibiteurs d'intégrase [INIs], les antagonistes de CCR5, et les inhibiteurs de fusion.

15 L'introduction d'une thérapie antirétrovirale hautement active comme traitement du VIH a permis de réduire de façon significative la mortalité et la morbidité pour les patients atteints du VIH dans le monde. Les traitements initiaux recommandés pour l'infection par le VIH incluent au moins deux médicaments connus pour appartenir à la classe des inhibiteurs de transcriptase inverse nucléosidiques.

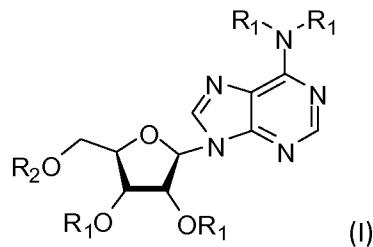
20 Cependant, la plupart des composés utilisés posent des problèmes de toxicité, et tous rencontrent des problèmes de résistance. C'est pourquoi on recherche une diminution des effets secondaires et une amélioration des dosages (par exemple administration, une fois par jour, de pilules de combinaison à dose fixe), lesquelles permettraient une compliance plus élevée des patients, limiteraient l'émergence de variants résistants, et ainsi amélioreraient la longévité et la qualité de vie des patients.

25 Il existe donc un besoin de nouvelles molécules antivirales qui soient à la fois bien tolérées et efficaces et aussi ayant de nouveaux mécanismes d'action.

Dans ce cadre, les inventeurs ont démontré qu'une sous-famille d'analogues benzoylés de nucléosides présente de façon surprenante une activité antivirale intéressante à la fois sur le
30 virus VIH natif et sur les variants résistants, tout en étant très peu toxique.

Résumé de l'invention

La présente invention concerne des composés de formule (I) pour leur utilisation dans le traitement d'une infection virale, en particulier une infection par un virus VIH.



5

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant au moins un composé de formule (I) et un support pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention fournit en outre une méthode *in vitro* pour évaluer si un patient infecté par un virus VIH, notamment VIH-1, serait sensible à une thérapie avec un composé tel que 10 défini ici, ladite méthode comprenant la recherche d'une mutation dans le codon 215 de la transcriptase inverse du virus, une substitution de la thréonine sauvage, en tyrosine, étant indicatrice d'une plus grande sensibilité audit composé, par rapport au virus sauvage.

Description des figures

15

La Figure 1 est un graphe montrant la mesure de l'IC50 (concentration inhibitrice à 50%) de l'adénosine tétrabenzoylée, comparée avec celle du TDF (Ténofovir). Les carrés correspondent au Ténofovir et les losanges à la tétrabenzoyladénosine ($N^6,N^6,O^{2'},O^{3'}$ -tétrabenzoyladénosine de formule A telle que décrite ci-dessous).

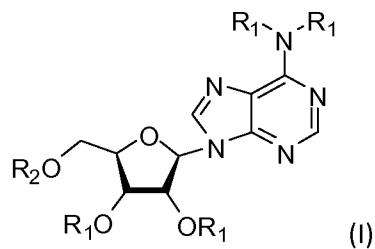
20 La Figure 2 est un graphe montrant le nombre de copies d'ADN viral pour 150 000 cellules MT2 infectées, en fonction du temps (T= témoin, AZT= zidovudine).

La Figure 3 est un graphe montrant le nombre de copies d'ARN viral par ml de cellules MT2 infectées, en fonction du temps (T= témoin, AZT= zidovudine).

25

Description détaillée de l'invention

La présente invention concerne un composé de formule (I)



dans laquelle

5 chaque R1 est indépendamment choisi parmi un groupement benzyle et un groupement benzoyle (Bz), éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants choisis parmi un groupement nitro (NO_2), un groupement alkyle, et un atome d'halogène ;

R2 est choisi parmi un atome d'hydrogène, un groupement acyle, un monophosphate, diphosphate ou triphosphate, ou un dérivé phosphate stabilisé,

10 un isomère, tautomère ou énantiomère de celui-ci, une prodrogue ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ou un mélange de ceux-ci, pour son utilisation dans le traitement d'une infection virale.

15 Le virus peut être par exemple le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), le virus de l'hépatite C (HCV), le virus de l'hépatite B ou le virus de l'herpès.

Les composés sont particulièrement utiles pour traiter une infection virale chez des patients infectés par une souche virale porteuse d'une mutation leur conférant une résistance aux traitements actuels, par exemple une résistance aux inhibiteurs de transcriptase inverse

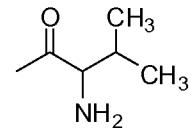
20 nucléosidiques ou non-nucléosidiques, ou aux inhibiteurs de l'intégrase ou de la protéase, en particulier en ce qui concerne le VIH.

En particulier, l'infection virale est le VIH.

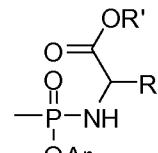
Tous les génotypes sont compris, notamment les groupes VIH-1, VIH-2, VIH-O.

25 Les composés sont utiles pour traiter une infection chez n'importe quel patient. Les composés sont plus particulièrement efficaces pour lutter contre une infection par un virus VIH, notamment VIH-1, porteur de la mutation T215Y.

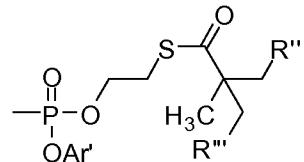
De préférence un, de préférence deux, de préférence trois et encore préférentiellement les quatre groupements R1 sont des groupements benzoyles.



De préférence, R2 est choisi parmi un atome d'hydrogène, un groupe



5 dérivé phosphate stabilisé choisi parmi un groupe et un groupe



, dans lesquels Ar et Ar' sont des groupements phényles ou naphtyles éventuellement substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène, et R, R', R'' et R''' sont indépendamment choisis parmi un atome d'hydrogène, un groupement hydroxy (OH), un alkyle, un phényle et un groupement amine NRaRb où Ra et Rb sont choisis parmi les atomes

10 d'hydrogènes, les alkyles et les halogénoalkyles.

De façon hautement préférée, R2 est un atome d'hydrogène.

Par « groupement alkyle », on désigne dans la présente invention un groupement hydrocarboné, linéaire, ramifié ou cyclique, comprenant 1 à 8 atomes de carbone, éventuellement substitué par au moins un substituant choisi parmi les atomes d'halogène, les groupes hydroxy (OH) et amino (NH₂). A titre d'exemples, on peut citer les groupements méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, n-butyle, sec-butyle, pentyle, hexyle, cyclohexyle, heptyle, et octyle.

20 Par « groupement acyle », on désigne dans la présente invention un groupe alkyle relié au reste de la molécule par l'intermédiaire d'un C=O.

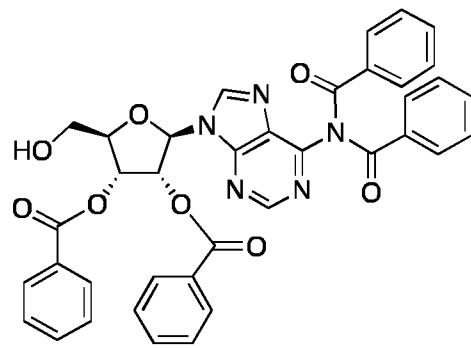
Par « dérivé phosphate stabilisé », on désigne dans la présente invention un groupement dérivé d'un groupement phosphate et permettant de former une prodrogue nucléotidique stabilisée.

25 Par « atome d'halogène », on désigne dans la présente invention un atome de chlore, de brome, d'iode ou de fluor.

Par « halogénoalkyle », on désigne dans la présente invention un groupement alkyle tel que défini ci-dessus, substitué par au moins un atome d'halogène. A titre d'exemple, on peut citer notamment le groupement trifluorométhyle.

- 5 Par « prodrogue » d'un composé de formule (I), on désigne dans la présente invention un composé qui est converti en composé monophosphorylé de formule (I) correspondant lors de son administration *in vivo*, ou qui a la même activité par lui-même. En particulier, on peut citer les sels pharmaceutiquement acceptables et certains dérivés en 5', en particuliers des dérivés hydrolysables, des composés actifs.
- 10 Par « sel pharmaceutiquement acceptable », on désigne dans la présente invention un sel d'un composé de formule (I) qui ne possède pas ou peu d'effet toxicologique non désiré. Il peut s'agir par exemple d'un sel d'addition acide comme un chlorhydrate ou un acétate ou d'un sel d'addition basique comme un sel de sodium ou de potassium.
- 15 Un composé de formule (I) peut être administré sous forme de prodrogue stabilisée par exemple pour améliorer son activité, sa biodisponibilité, sa stabilité ou pour altérer une quelconque propriété non désirée du composé de formule (I).

Parmi les composés de l'invention, le composé de formule **A** ($N^6,N^6,O^{2'},O^{3'}$ -tétrabenzoyladénosine) est hautement préféré.



A

La $N^6,N^6,O^{2'},O^{3'}$ -tétrabenzoyladénosine **A** peut être synthétisée comme décrit initialement par Khorana *et al.* (Lohrmann, R. ; Khorana, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4188-4194), ou par le procédé amélioré par Scott *et al.* (Zhu, X.-F.; Scott, A. I. *Synthetic Commun.* **2008**, 1346-1354)

en utilisant le *tert*-butyldiméthylsilyle en tant que groupement protecteur temporaire en 5'-OH.

Les inventeurs ont démontré que la N⁶,N⁶,O^{2'},O^{3'}-tétrabenzoyladénosine a une activité 5 antivirale (notamment anti-VIH) plus importante que le Ténofovir (TDF), qui est l'antirétroviral le plus utilisé pour le traitement des patients infectés par le VIH. Le bas niveau de toxicité cellulaire mesuré rend l'utilisation de ce composé particulièrement utile chez des patients infectés par le VIH. En outre, sans vouloir être liés à un quelconque mécanisme d'action, les inventeurs ont mis en évidence que ce composé agissait à une étape précoce de l'infection 10 virale, à savoir avant l'intégration du virus dans l'ADN de la cellule. Plus particulièrement, les inventeurs ont montré une inhibition de la production de l'ADN proviral. Cette propriété des composés de l'invention est particulièrement avantageuse pour un traitement efficace, en amont de l'intégration cellulaire.

15 La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant au moins un composé de formule (I) et un support pharmaceutiquement acceptable.

Dans le contexte de l'invention, le terme « support pharmaceutiquement acceptable» désigne des substances telles que les excipients, les véhicules, les adjuvants, les tampons qui sont 20 classiquement utilisés, en combinaison avec le(s) principe(s) actif(s), pour la préparation d'un médicament. Le choix de tels supports dépend essentiellement de la voie d'administration envisagée.

Dans un mode de réalisation particulier, les composés de l'invention peuvent être sous forme encapsulée, en étant par exemple introduits dans des microsphères ou des microcapsules qui 25 sont des réservoirs constitués d'un cœur de principe actif entouré par une membrane de matériau enrobant. Les polymères formant le matériau enrobant peuvent être d'origine naturelle (gélatine, chitosane, ...), hémisynthétique (dérivés de la cellulose...) ou synthétique comme les copolymères des acides lactique et glycolique couramment utilisés. Les composés de l'invention peuvent également être encapsulés dans des nanoparticules, qui sont des 30 systèmes colloïdaux dont la taille est comprise entre 10 et 1000 nm, à base de polymères biodégradables, ou de lipides capables de retenir une ou des molécules actives par séquestration et/ou adsorption.

La composition pharmaceutique selon l'invention comprend de préférence une quantité de composé selon l'invention comprise entre 5µg et 1000 mg, de préférence entre 1 et 500 mg, de préférence entre 5 et 100mg.

Le rapport entre les quantités en poids de composé selon l'invention et de support pharmaceutiquement acceptable est compris entre 5/95 et 95/5, de préférence entre 20/80 et 80/20.

Les composés de l'invention peuvent être les seuls principes actifs, ou ils peuvent être associés à d'autres principes actifs. La composition pharmaceutique selon l'invention peut ainsi également comprendre au moins un autre actif pharmaceutique, en particulier au moins un autre médicament utilisé pour le traitement de l'infection virale. En particulier, la composition selon l'invention peut comprendre également, ou être associée à, un ou plusieurs autres antirétroviraux, par exemple du Ténofovir. De manière générale, tout antirétroviral peut être associé, à savoir des inhibiteurs de la transcriptase inverse, notamment des inhibiteurs nucléosidiques ou nucléotidiques et non nucléosidiques, des inhibiteurs de la protéase, des inhibiteurs de l'intégrase, des inhibiteurs d'entrée (anti-CCR5), des inhibiteurs de fusion, et des inhibiteurs d'attachement au site de fixation du CD4. Parmi les antirétroviraux, on peut utiliser par exemple ceux actuellement commercialisés, tels que la lamivudine, l'emtricitabine, la zalcitabine, l'abacavir, la zidovudine, la didanosine, la stavudine, l'adéfovir, le ténofovir, l'éfavirenz, l'étravirine, la névirapine, la delavridine, la rilpivirine, l'amprénavir, le fosamprénavir, le tipranavir, le lopinavir, le ritonavir, l'indinavir, le saquinavir, le darunavir, l'atazanavir, le nelfinavir, le raltegravir, l'éviltegravir, le dolutégravir, l'enfuvirtide, le maraviroc.

Les composés ou compositions selon l'invention peuvent être administrés de différentes manières et sous différentes formes. Ainsi, ils peuvent être administrés de manière systémique, par voie orale, par inhalation ou par injection, comme par exemple par voie intraveineuse, intra-musculaire, sous-cutanée, trans-dermique, intra-artérielle, etc., les voies intraveineuse, intra-musculaire, sous-cutanée, orale et par inhalation étant préférées. Pour les injections, les composés sont généralement conditionnés sous forme de suspensions liquides, qui peuvent être injectées au moyen de seringues ou de perfusions, par exemple. A cet égard, les composés sont généralement dissous dans des solutions salines, physiologiques, isotoniques, tamponnées, etc., compatibles avec un usage pharmaceutique et connues de

l'homme du métier. Ainsi, les compositions peuvent contenir un ou plusieurs agents ou véhicules choisis parmi les dispersants, solubilisants, stabilisants, conservateurs, etc. Des agents ou véhicules utilisables dans des formulations liquides et/ou injectables sont notamment la méthylcellulose, l'hydroxyméthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, le
5 polysorbate 80, le mannitol, la gélatine, le lactose, des huiles végétales, l'acacia, etc.

Les composés peuvent également être administrés sous forme de gels, huiles, comprimés, suppositoires, poudres, gélules, capsules, aérosols, etc., éventuellement au moyen de formes galéniques ou de dispositifs assurant une libération prolongée et/ou retardée. Pour ce type de formulation, on utilise avantageusement un agent tel que la cellulose, des carbonates ou des
10 amidons.

Il est entendu que le débit et/ou la dose injectée peuvent être adaptés par l'homme du métier en fonction du patient, de la pathologie concernée, du mode d'administration, etc. Typiquement, les composés sont administrés à des doses pouvant varier entre 0.1 µg et 100 mg/kg de poids corporel, plus généralement de 0,01 à 10 mg/kg, typiquement entre 0,1 et 10
15 mg/kg. Généralement on administre de 5µg et 1000 mg, de préférence entre 1 et 500 mg, de préférence entre 5 et 100mg par jour. En outre, des injections répétées peuvent être réalisées, le cas échéant. D'autre part, pour des traitements chroniques, des systèmes retard ou prolongés peuvent être utilisés.

20 La présente invention concerne également une méthode de traitement d'une infection virale, comprenant l'administration à un patient d'une quantité efficace d'au moins un composé de formule (I) et/ou d'une composition en contenant.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un composé tel que
25 défini ci-dessus dans le cadre de la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection virale.

Dans un objectif de médecine personnalisée, l'invention a en outre pour objet une méthode pour identifier les patients infectés par un virus VIH, en particulier VIH-1, qui seraient très
30 sensibles à une thérapie avec une composition pharmaceutique décrite ici, ladite méthode comprenant la recherche d'une mutation dans le codon 215 de la transcriptase inverse, une substitution de la thréonine sauvage, en tyrosine, étant indicatrice d'une plus grande

sensibilité à un composé de l'invention, par rapport à un virus sauvage. Par « patients très sensibles », on entend des patients pour lesquels une thérapie avec un composé de l'invention serait particulièrement avantageuse, étant entendu que les composés de l'invention restent aussi utiles pour traiter une infection par un virus sauvage ou porteur d'autres mutations.

- 5 La recherche de cette mutation peut être réalisée par toute technique standard, de génotypage, séquençage ou détection rapide par sondes (cf par exemple Ross, et al AIDS Research and Human Retroviruses, 1999, 15(14): 1287-1292 ; Mitsuya et al, J Virol. 2008, 82(21):10747-55).
- 10 Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de la souffrance, amélioration de la durée de vie, ralentissement de la progression de la maladie, etc.). Le traitement peut en outre être réalisé en combinaison avec d'autres agents ou traitements chimiques ou physiques. Les composés selon l'invention sont de préférence conditionnés et 15 administrés de façon combinée, séparée ou séquentielle par rapport à d'autres agents ou traitements thérapeutiques. Les traitements et médicaments de l'invention sont tout particulièrement destinés aux humains. Les patients susceptibles d'être traités par les composés et/ou compositions de l'invention peuvent notamment être une population de patients résistants aux antiviraux classiquement utilisés pour le traitement de l'infection virale, 20 en particulier de patients (de préférence les patients infectés par le virus VIH) résistants aux inhibiteurs de transcriptase inverse nucléosidiques, non-nucléosidiques, ou aux inhibiteurs de l'intégrase ou de la protéase.
- Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse comprennent notamment les molécules suivantes : zidovudine, molécule également connue sous le nom AZT, lamivudine, 25 emtricitabine, didanosine, stavudine, abacavir, zalcitabine, tenofovir, racivir, amdoxovir, apricitabine, elvucitabine.
- Les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse comprennent notamment les molécules suivantes : efavirenz, nevirapine, étravirine, delavirdine, rilpivirine.
- Les inhibiteurs de l'intégrase incluent l'elvitégravir et le dolutégravir.
- 30 Les inhibiteurs de la protéase incluent les molécules suivantes : amprenavir, tipranavir, indinavir, saquinavir, fosamprenavir, ritonavir, darunavir, atazanavir, nelfinavir.

Les composés selon l'invention peuvent être synthétisés de façon simple (en 3 étapes seulement) à partir, par exemple, d'adénosine commerciale.

Les trois étapes ont lieu sans étape de purification intermédiaire, il s'agit tout d'abord d'une étape de protection régiosélective de la position 5'- de l'adénosine en utilisant du chlorure de 5 *tert*-butyldiméthylsilyle, suivie d'une protection de la fonction amine de la base et des deux autres hydroxyles en position 2'- et 3'- du ribose par du chlorure de benzoyle. L'étape terminale est la déprotection de l'hydroxyle en position 5'-, qui peut être réalisée par du fluorure de tétrabutylammonium ou de l'acide trifluoroacétique, de préférence de l'acide trifluoroacétique. Une étape de purification par colonne de chromatographie permet alors 10 d'obtenir le composé d'intérêt.

D'autres aspects et avantages de la présente demande apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Exemples

15

Exemple 1 : Synthèse du composé N⁶,N⁶,O^{2'},O^{3'}-tétrabenzyloladénosine (composé A) selon l'invention

- Exemple 1.1 : Premier mode de réalisation

A une solution d'adénosine commerciale (540 mg, 2,0 mmol) et de pyridine (10 mL), du 20 chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (TBSCl) (396 mg, 2,6 mmol) est ajouté à 0°C. Après agitation pendant 2 h à 0°C, le mélange réactionnel est ramené à température ambiante et agité à nouveau pendant 7 h. La solution est ensuite refroidie à 0°C et du chlorure de benzoyle (1,12 mL, 9,6 mmol) est ajouté goutte à goutte. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le mélange est dilué dans du CH₂Cl₂ (100 mL) et lavé avec une solution saturée de 25 NaCl (40 mL). La phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂ (2 x 40 mL), les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous vide. Le brut réactionnel obtenu est dissous dans du THF (36 mL), et une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique TFA (18 mL, TFA/H₂O 1:1) est additionnée lentement. Après 3h d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est neutralisé avec une solution de NaHCO₃ (9,72 g dans 100 30 mL de H₂O) à 0°C et extraite avec du CH₂Cl₂ (4 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, et concentrées sous vide après filtration.

Le produit obtenu est purifié sur colonne de chromatographie (Eluant: cyclohexane/EtOAc = 4:1 à 1:1 puis CH₂Cl₂/CH₃OH 100:5) pour donner l'adénosine tétrabenzoylée sous forme d'un solide blanc. Rendement: 1.36 g (99%).

- Exemple 1.2 : Second mode de réalisation

- 5 A une solution d'adénosine commerciale (3 g, 11,2 mmol) et de pyridine distillée (60 mL), du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (TBSCl) (2,2 g, 14,6 mmol) est ajouté à 0°C. Après agitation pendant 4 h à 0°C, le mélange réactionnel est ramené à température ambiante et agité à nouveau pendant une nuit. La pyridine est évaporée puis le mélange réactionnel est repris dans du CH₂Cl₂ (500 mL) et du MeOH (50 mL), et lavé avec une solution saturée de NaCl (500 mL) et de NaHCO₃ (500 mL). La phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂ (200 mL), les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous vide. Le solide est dissous dans 60 mL de pyridine, la solution est refroidie à 0°C et du chlorure de benzoyle (6,26 mL, 53,9 mmol) est ajouté goutte à goutte. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le mélange est dilué dans du CH₂Cl₂ (300 mL) et lavé avec une solution saturée de NaCl (2x 150 mL). La phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂ (150 mL), les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous vide. Le brut réactionnel obtenu est dissous dans du THF (100 mL), et une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique TFA (50 mL, TFA/H₂O 1:1) est additionnée lentement. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est neutralisé avec une solution de NaHCO₃ à 0°C et extrait 15 avec du CH₂Cl₂ (2x 150 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, et concentrées sous vide après filtration.
- 20 Le produit obtenu est purifié sur colonne de chromatographie (Eluant: cyclohexane/EtOAc = 4:1 à 1:1 puis CH₂Cl₂/CH₃OH 100:5) pour donner l'adénosine tétrabenzoylée sous forme d'un solide blanc. Rendement: 5,96 g (77%).

25 - Caractérisation du produit obtenu avec les 2 modes de réalisation

Rf: 0.25 (cyclohexane/EtOAc = 2:1); NMR 1H: (CDCl₃) δ 8.70 (s, 1 H, H2 ou H8), 8.21 (s, 1 H, H2 ou H8), 8.05 (d, J=7.5 Hz, 2H, Bz), 7.33-7.86 (m, 18H, Bz), 6.36 (m,, 2H, H1', H2'), 6.06 (dd, J = 1,6, 5,2 Hz 1H, H3'), 5.56 (sl, 1H, OH), 4.64 (bs, 1H, H4'), 4.05 (m, 2H, 2 x H5')

HRMS: calculé pour C₃₈H₂₉N₅O₈Na: 706.1914, trouvé 706.1917 [M+Na⁺].

30

Exemple 2 : Tests antiviraux et de cytotoxicité

Matériels et méthodes :

Composés:

Le composé **A** (adénosine tétrabenzoylée, cf préparation à l'exemple 1) est dissous dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) à 10 mM. Le Ténofovir commercial est dissous dans l'eau à 1 g/L.

Cellules et virus:

- 5 Les cellules HeLa-P4 sont des cellules HeLa CD4 LTR-LacZ dans lesquelles l'expression de LacZ est induite par la protéine Tat trans-activatrice de VIH, rendant possible la quantification précise de l'infectivité VIH-1 à partir d'un seul cycle de réPLICATION. Des cellules HeLa-CD4 croissant de façon exponentielle à une densité de 1×10^4 /mL sont placées dans des plaques 96 puits et infectées le jour suivant avec 3 ng d'antigène p24 de VIH en présence de différentes
10 concentrations de composés.

Test antiviral dans les cellules HeLa-P4

- Les titres pour un simple cycle du virus ont été déterminés dans des cellules HeLa-P4. Les cellules ont été infectées, en dupliCATS, dans des plaques 96 puits, avec le clone VIH-1 pNL-4.3 (équivalent à 3 ng d'antigène p24). Les titres pour un simple cycle des virus ont été déterminés 48 heures après infection en quantifiant l'activité béta-galactosidase dans des lysats P4 par test colorimétrique (test CPRG) basé sur le clivage du chlorophénol red-beta-D-galactopyranoside (CPRG) par la béta-galactosidase. La concentration inhibitrice à 50% (IC50) a été déterminée comme la concentration de composé **A** fournissant 50% d'inhibition des
20 niveaux de béta-galactosidase par rapport aux cellules infectées non traitées.

Test antiviral dans les cellules MT2

- Les cellules MT2 ont été concentrées à 3.10^6 /mL et infectées avec 10^7 virus (LAI). Les cellules ont été réparties dans des plaques 96 puits (1.10^5 /puits) et incubées en présence de
25 différentes concentrations du composé **A** (en quadriPLICATE). Les charges virales ont été réalisées au jour 3 (Test Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan (CTM) HIV-1 v2).

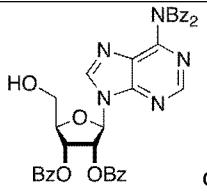
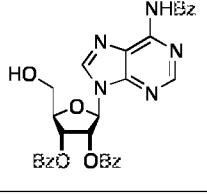
Tests de cytotoxicité

- 30 Un test de viabilité cellulaire mesurant l'absorbance à 560 et 690 nm en utilisant le réactif jaune tétrazolium MTS [bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényltétrazolium] a été réalisé avec l'adénosine tétrabenzoylée dans les lignées cellulaires HeLa-CD4, Vero, FH, MT-2, et SupT1.

Résultats

Activité antivirale envers le VIH

- 5 L'activité antivirale du composé A selon l'invention a été évaluée en utilisant une quantité de VIH correspondant à 3 ng d'antigène p24. Pour comparaison, est présentée ici l'activité obtenue avec un composé ne présentant pas de double benzoylation en position N6.

Structure	Production virale (10 µM de composé)
 composé A	0%
	109%

10

En utilisant une quantité de VIH correspondant à 3 ng d'antigène p24, l'IC50 de l'adénosine tétrabenzoylée (composé A) est entre 1 et 2 µM. Dans les mêmes conditions, l'IC50 du TDF (Ténofovir) est entre 5 et 10 µM (voir [Figure 1](#)).

- 15 Le composé A selon l'invention a été testé sur le virus pNL4-3 modifié ou non par mutagénèse sur site, comprenant ou non (wt) les mutations localisées dans le gène de la transcriptase inverse et associées avec la résistance aux principaux NRTIs utilisés en pratique clinique. Les tableaux 1A à 1C ci-dessous regroupent les index de résistance du composé A selon l'invention sur les virus avec et sans mutation.
- 20 L'index de résistance d'un mutant représente le rapport de la concentration en composé capable d'inhiber par moitié (IC50) la croissance du virus mutant testé sur la concentration en composé capable d'inhiber par moitié (IC50) la croissance du virus sauvage.
- Un index de résistance inférieur ou égal à 1 signifie que la souche virale testée est sensible au traitement, ou en d'autres termes, que le composé inhibe efficacement la multiplication du

virus. Un index de résistance supérieur à environ 1,5 ou 2 signifie que la souche virale est résistante au traitement.

5 **Tableau 1A : Index de résistance (« fold change ») des mutants aux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse.**

	Index de résistance
pnL4-3 wild type	1
pNL4-3 T215Y	0,41
pNL4-3 M41L-L210W-T215Y	0,38
pNL4-3 M184V	0,99
pNL4-3 K65R	0,92
pNL4-3 K65R-M184V	1,07
pNL4-3 M184V-M41L-L210W-T215Y	0,58

Le composé **A** a été testé sur des cellules MT2 infectées par des virus LAI. L'IC50 a été déterminée dans ce cas à 1,6µM.

10

Tableau 1B : Index de résistance des mutants aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

	Index de résistance
pnL4-3 wild type	1
pNL4-3 K103N	1
pNL4-3 E138K	0,89

Tableau 1C: Index de résistance des mutants aux inhibiteurs de l'intégrase

	Index de résistance
pnL4-3 wild type	1
pNL4-3 N155H	1,04
pNL4-3 G140S-Q184H	0,99
pNL4-3 Q184H	0,88

15

Tous les mutants résistants sont sensibles au composé **A**, et même plus sensibles pour certains (index de résistance < 1) comme notamment ceux porteurs de la mutation T215Y.

20

Essai de cytotoxicité

En utilisant différents types cellulaires (HeLa-CD4, Vero, FH, MT-2, et SupT1), la CC50 (concentration cytotoxique à 50%) du composé **A** a été mesurée à plus de 100 µM dans tous les cas.

5

Exemple 3 : Inhibition de la production d'ADN proviral double brin et de production d'ARN cellulaire

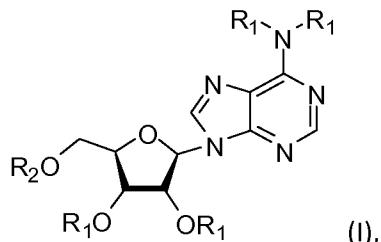
Les cellules MT2 ont été concentrées à $15 \cdot 10^6$ /mL et incubées 2 h avec 10 ou 25 µM du 10 composé **A**. Le virus Laï est ensuite ajouté à une multiplicité d'infection de 0,01 pendant 1 h. Les cellules sont lavées puis incubées dans du milieu de culture contenant 10 ou 25 µM du composé à tester. Un prélèvement de $1 \cdot 10^6$ cellules est réalisé à différents temps et l'ADN viral est quantifié par une méthode de PCR en temps réel Taqman. Les charges virales ARN sont quantifiées dans le milieu de culture (Test Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan (CTM) HIV-1 v2).

15

Les résultats sont présentés aux Figures 2 et 3. Ils montrent que l'apparition de l'ADN viral intracellulaire (Figure 2), et la production de l'ARN viral extracellulaire (Figure 3) sont inhibées par le composé **A**. En d'autres termes, le composé **A** empêche la production d'ADN viral intracellulaire et par conséquent celle d'ARN extracellulaire. La comparaison avec l'AZT 20 (zidovudine) montre la nette supériorité du composé **A** sur l'inhibition de la charge virale.

REVENDICATIONS

5 1. Composé de formule (I)



dans laquelle :

chaque R₁ est indépendamment choisi parmi un groupement benzyle et un groupement benzoyle, éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants
10 choisis parmi un groupement nitro (NO₂), un groupement alkyle, et un atome d'halogène, et

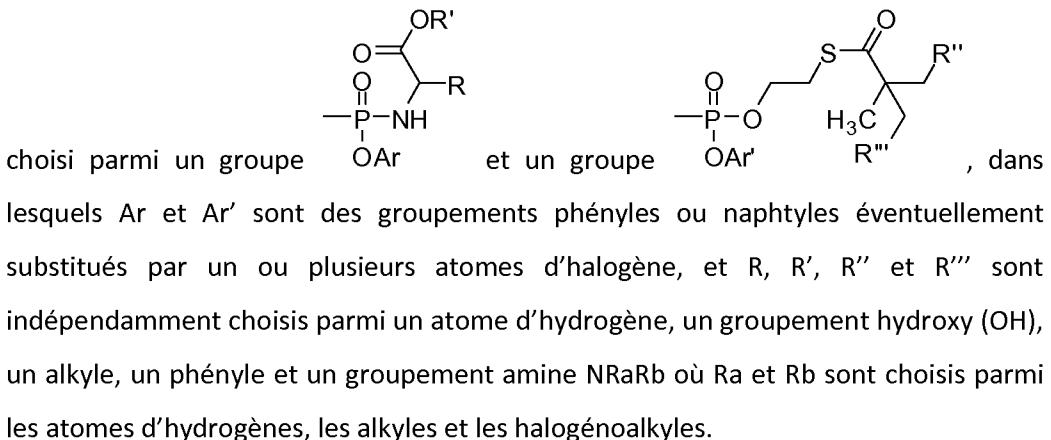
R₂ est choisi parmi un atome d'hydrogène, un groupement acyle, un monophosphate, diphosphate ou triphosphate, ou un dérivé phosphate stabilisé,
15 un isomère, tautomère ou énantiomère de celui-ci, une prodrogue ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ou un mélange de ceux-ci,
pour une utilisation dans le traitement d'une infection virale.

- 2. Composé selon la revendication 1, pour une utilisation dans le traitement d'une infection virale, l'infection virale étant choisie parmi une infection par le virus VIH, le virus de l'hépatite C, le virus de l'hépatite B et le virus de l'herpès.
- 20 3. Composé selon la revendication 1 ou 2, pour une utilisation dans le traitement d'une infection virale, qui est une infection par le virus VIH.
- 25 4. Composé selon la revendication 3, pour une utilisation dans le traitement d'une infection virale, qui est une infection par le virus VIH-1.
- 30 5. Composé selon la revendication 3 ou 4, pour une utilisation dans le traitement de patients infectés par le virus VIH et résistants aux inhibiteurs de transcriptase inverse nucléosidiques.

6. Composé, pour une utilisation dans le traitement d'une infection virale selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les quatre groupements R₁ sont des groupements benzoyles.

5

7. Composé, pour une utilisation dans le traitement d'une infection virale selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel R₂ est un dérivé phosphate stabilisé



10

15

8. Composé, pour une utilisation dans le traitement d'une infection virale selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel R₂ est un atome d'hydrogène.

9. Composé, pour une utilisation dans le traitement d'une infection virale selon la revendication 8, dans lequel le composé est la N⁶,N⁶,O²',O³'-tétrabenzoyladénosine.

20

10. Composé tel que défini à l'une des revendications 1 à 9, à titre de médicament.

11. Composition pharmaceutique, comprenant au moins un composé tel que défini à l'une des revendications 1 à 9, et un support pharmaceutiquement acceptable.

25

12. Composition selon la revendication 11, dans laquelle le composé de formule (I) est la N⁶,N⁶,O²',O³'-tétrabenzoyladénosine.

30

13. Composition pharmaceutique selon la revendication 10 ou 11, comprenant en outre un ou plusieurs autres antirétroviraux.

14. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, dans laquelle la composition est adaptée pour une administration par voie orale.

5

15. Méthode *in vitro* pour évaluer si un patient infecté par un virus VIH, notamment VIH-1, serait sensible à une thérapie avec un composé tel que défini à l'une des revendications 1 à 9, ladite méthode comprenant la recherche d'une mutation dans le codon 215 de la transcriptase inverse du virus, une substitution de la thréonine sauvage en tyrosine, étant indicatrice d'une plus grande sensibilité audit composé par rapport au virus sauvage.

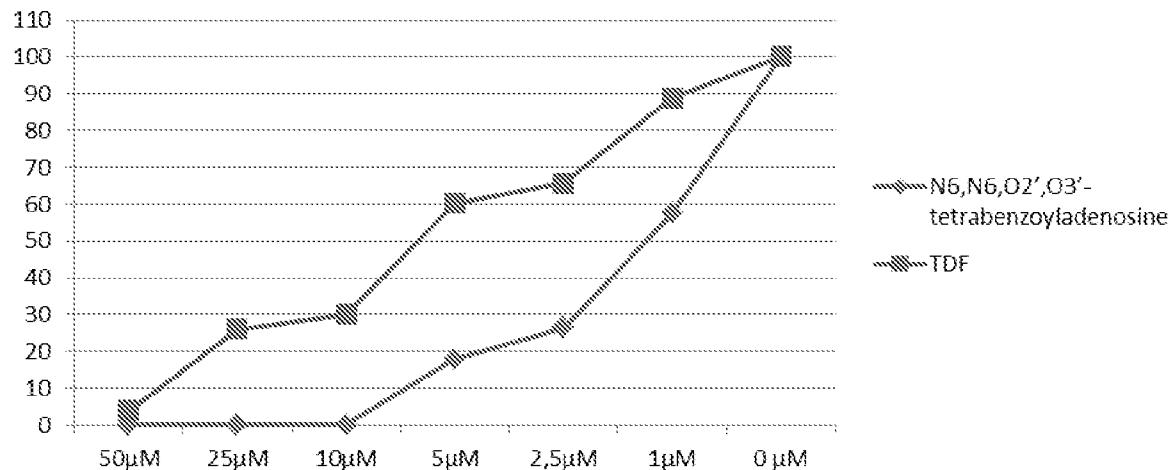


FIGURE 1

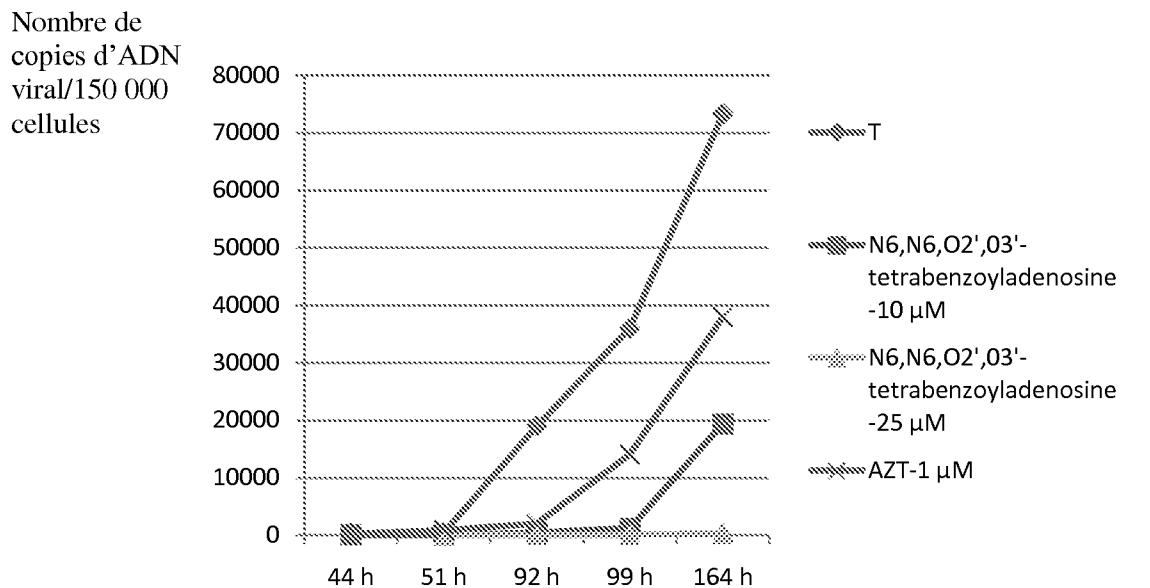


FIGURE 2

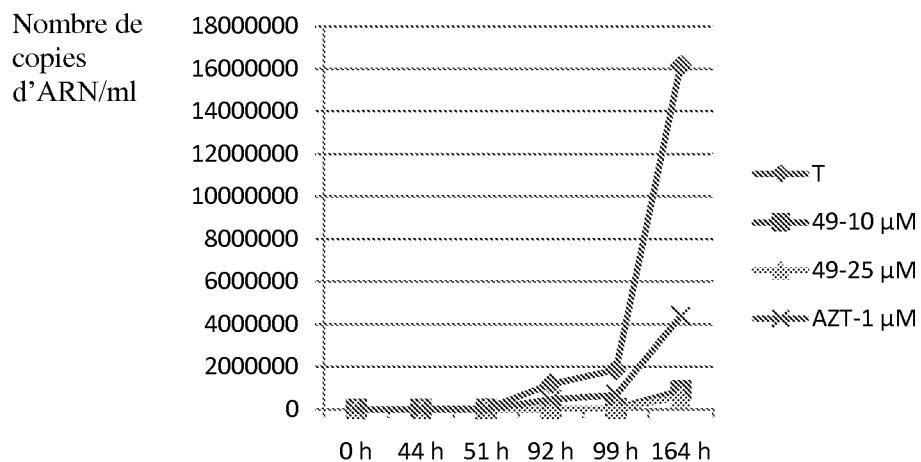


FIGURE 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2012/052433

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D487/04
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2003/008841 A1 (DEVOS RENE [GB] ET AL) 9 January 2003 (2003-01-09) paragraph [0006] example 92 claim 1 -----	1-15
A	EP 0 462 621 A2 (PRENDERGAST PATRICK THOMAS [IE]) 27 December 1991 (1991-12-27) page 4, line 23 - line 44 claim 1 -----	1-15
A	WO 2005/084653 A2 (CAMBRIDGE BIOTECHNOLOGY LTD [GB]; PRITCHARD MARTYN [GB]; OUZMAN JACQUE) 15 September 2005 (2005-09-15) claim 1 ----- -/-	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 December 2012	19/12/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Samsam Bakhtiary, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/FR2012/052433

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XUE-FENG ZHU AND CO: ""Novel synthetic approach to multibenzoylated nucleosides"", SYNTHETIC COMMUNICATIONS, vol. 38, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 1346-1354, XP002667614, page 1347; compounds 3-6 -----	1-15
A	TAKESHI ENDO AND CO: ""Oxidation of N,N-dialkyl-2',3',5'-tri-O-acetyladenosines with Ruthenium tetraoxide and a novel selective N-Monodealkylation sequence"", JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 44, no. 21, 1 January 1979 (1979-01-01), pages 3652-3656, XP002667615, page 3653; compound 1h -----	1-15
A	QING DAI AND CO: ""Efficient chemical synthesis of AppDNA by adenylation of immobilized DNA-5'-monophosphate"", ORGANIC LETTERS, vol. 11, no. 5, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 1067-1070, XP002667616, page 1068; compounds 3,5 -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2012/052433

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 2003008841	A1	09-01-2003	AR 030510 A1 AU 9549701 A BR 0113611 A CA 2419399 A1 CN 1466591 A EP 1315736 A2 JP 2004513083 A MX PA03001775 A PA 8528001 A1 PE 04102002 A1 US 2003008841 A1 US 2004110718 A1 UY 26914 A1 WO 0218404 A2	20-08-2003 13-03-2002 24-06-2003 07-03-2002 07-01-2004 04-06-2003 30-04-2004 04-06-2003 30-07-2002 28-05-2002 09-01-2003 10-06-2004 28-02-2002 07-03-2002
EP 0462621	A2	27-12-1991	AP 312 A AU 4441997 A AU 7775894 A AU 7920491 A CA 2045279 A1 EP 0462621 A2 OA 9370 A PH 30703 A	19-02-1994 22-01-1998 02-02-1995 02-01-1992 22-12-1991 27-12-1991 15-09-1992 16-09-1997
WO 2005084653	A2	15-09-2005	AU 2005218997 A1 BR PI0508488 A CA 2557285 A1 EA 200601642 A1 EA 200800538 A1 EP 1749016 A2 JP 2007526291 A KR 20070004792 A SG 144146 A1 US 2008221060 A1 WO 2005084653 A2	15-09-2005 31-07-2007 15-09-2005 29-12-2006 30-06-2008 07-02-2007 13-09-2007 09-01-2007 29-07-2008 11-09-2008 15-09-2005

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2012/052433

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C07D487/04
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C07D

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 2003/008841 A1 (DEVOS RENE [GB] ET AL) 9 janvier 2003 (2003-01-09) alinéa [0006] exemple 92 revendication 1 -----	1-15
A	EP 0 462 621 A2 (PRENDERGAST PATRICK THOMAS [IE]) 27 décembre 1991 (1991-12-27) page 4, ligne 23 - ligne 44 revendication 1 -----	1-15
A	WO 2005/084653 A2 (CAMBRIDGE BIOTECHNOLOGY LTD [GB]; PRITCHARD MARTYN [GB]; OUZMAN JACQUE) 15 septembre 2005 (2005-09-15) revendication 1 ----- -/-	1-15

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

7 décembre 2012

19/12/2012

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Samsam Bakhtiary, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2012/052433

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	XUE-FENG ZHU AND CO: ""Novel synthetic approach to multibenzoylated nucleosides"", SYNTHETIC COMMUNICATIONS, vol. 38, 1 janvier 2008 (2008-01-01), pages 1346-1354, XP002667614, page 1347; composés 3-6 -----	1-15
A	TAKESHI ENDO AND CO: ""Oxidation of N,N-dialkyl-2',3',5'-tri-O-acetyladenosines with Ruthenium tetraoxide and a novel selective N-Monodealkylation sequence"", JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 44, no. 21, 1 janvier 1979 (1979-01-01), pages 3652-3656, XP002667615, page 3653; composé 1h -----	1-15
A	QING DAI AND CO: ""Efficient chemical synthesis of AppDNA by adenylation of immobilized DNA-5'-monophosphate"", ORGANIC LETTERS, vol. 11, no. 5, 1 janvier 2009 (2009-01-01), pages 1067-1070, XP002667616, page 1068; composés 3,5 -----	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2012/052433

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2003008841	A1 09-01-2003	AR 030510 A1 AU 9549701 A BR 0113611 A CA 2419399 A1 CN 1466591 A EP 1315736 A2 JP 2004513083 A MX PA03001775 A PA 8528001 A1 PE 04102002 A1 US 2003008841 A1 US 2004110718 A1 UY 26914 A1 WO 0218404 A2	20-08-2003 13-03-2002 24-06-2003 07-03-2002 07-01-2004 04-06-2003 30-04-2004 04-06-2003 30-07-2002 28-05-2002 09-01-2003 10-06-2004 28-02-2002 07-03-2002
EP 0462621	A2 27-12-1991	AP 312 A AU 4441997 A AU 7775894 A AU 7920491 A CA 2045279 A1 EP 0462621 A2 OA 9370 A PH 30703 A	19-02-1994 22-01-1998 02-02-1995 02-01-1992 22-12-1991 27-12-1991 15-09-1992 16-09-1997
WO 2005084653	A2 15-09-2005	AU 2005218997 A1 BR PI0508488 A CA 2557285 A1 EA 200601642 A1 EA 200800538 A1 EP 1749016 A2 JP 2007526291 A KR 20070004792 A SG 144146 A1 US 2008221060 A1 WO 2005084653 A2	15-09-2005 31-07-2007 15-09-2005 29-12-2006 30-06-2008 07-02-2007 13-09-2007 09-01-2007 29-07-2008 11-09-2008 15-09-2005