(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
27 novembre 2014 (27.11.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/188131 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 9/51 (2006.01) *A61K 31/404* (2006.01)
A61P 33/06 (2006.01) *A61K 31/366* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2014/051200

(22) Date de dépôt international :
22 mai 2014 (22.05.2014)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
13/54605 22 mai 2013 (22.05.2013) FR

(71) Déposant : **UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III** [FR/FR]; 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9 (FR).

(72) Inventeurs : **NEPVEU, Françoise**; 10 rue Paul Valéry, F-31520 Ramonville Saint-Agne (FR). **IBRAHIM, Hany**; 83 rue Bonnat, Appt 75, F-31400 Toulouse (FR). **IBRAHIM, Nehal**; 83 rue Bonnat, Appt 75, F-31400 Toulouse (FR).

(74) Mandataires : **GROSSET-FOURNIER, Chantal** et al.; 54 rue Saint-Lazare, F-75009 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, SA, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

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

— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))*

WO 2014/188131 A1

(54) **Title** : USE OF NANOPARTICLES FOR THE PRODUCTION OF INJECTABLE, WATER-SOLUBLE ANTI-MALARIAL COMPOSITIONS

(54) **Titre** : UTILISATION DE NANOPARTICULES POUR LA PREPARATION DE COMPOSITIONS ANTIPALUDEENNES SOLUBLES DANS L'EAU ET INJECTABLES

(57) **Abstract** : The invention relates to the use of nanoparticles for the production of soluble anti-malarial compositions, pharmaceutical compositions comprising or consisting of these nanoparticles, and a method for producing said nanoparticles.

(57) **Abrégé** : L'invention concerne l'utilisation de nanoparticules pour la préparation de compositions antipaludéennes solubles, les compositions pharmaceutiques comprenant ou constituées par lesdites nanoparticules, ainsi qu'un procédé de préparation des1 nanoparticules.

UTILISATION DE NANOPARTICULES POUR LA PREPARATION DE COMPOSITIONS ANTIPALUDEENNES SOLUBLES DANS L'EAU ET INJECTABLES

L'invention concerne l'utilisation de nanoparticules pour la préparation de compositions antipaludéennes solubles, les compositions pharmaceutiques comprenant ou constituées par lesdites nanoparticules, ainsi qu'un procédé de préparation des nanoparticules.

Le paludisme, ou malaria, menace la moitié de la population mondiale. Plus de 200 millions de cas de paludisme sont rapportés annuellement conduisant à environ un million de décès par an. Cette maladie représente toujours un problème majeur de santé publique. Il s'agit d'une maladie infectieuse causée par un parasite, appartenant au genre *Plasmodium* (essentiellement *P. falciparum*), transmis à l'homme par l'intermédiaire de moustiques *Anopheles* infectés.

Le cycle évolutif du parasite comporte une phase sexuée (sporogonie), se déroulant chez l'anophèle, et une phase asexuée (schizogonie), se déroulant chez l'homme. Cette phase asexuée, causant la maladie chez l'homme, comporte elle-même deux stades : un stade pré-érythrocytaire (hépatique), suivi d'un stade érythrocytaire (sanguin). Le parasite se transforme dans l'hépatocyte en schizonte hépatique (merosomes) contenant plusieurs milliers de merozoïtes. Après cette étape de maturation qui dure une quinzaine de jours, les merosomes éclatent et relâchent des milliers de mérozoïtes qui envahissent les globules rouges. Au stade érythrocytaire, le mérozoïte se multiplie. Le parasite dégrade l'hémoglobine et digère 30% ou plus de cette protéine pour récupérer les acides aminés nécessaires à la synthèse de ses propres protéines. Lors de l'éclatement du globule rouge, les parasites continuent leur cycle réplicatif mais quelques mérozoïtes se différencient en gamétocytes. Le stade érythrocytaire est le stade symptomatique de la malaria : fièvre. La malaria sévère (coma, fonctions cérébrales altérées) est due à l'obstruction des capillaires sanguins du cerveau par les hématies parasitées et peut être létale dans 15 à 20% des cas d'infections.

Face au fléau du paludisme, le problème le plus critique est le développement de phénomènes de résistance par le parasite vis-à-vis des antipaludiques classiques de type

quinoline/quinoléine. D'autres médicaments comme l'artémisinine et ses dérivés d'hémisynthèse (ARTs), sont cependant efficaces contre les souches multi-résistantes de P. falciparum, et ont également une large spécificité contre les stades sanguins asexués et sexués. L'OMS recommande les combinaisons thérapeutiques à base de dérivés de l'artémisinine pour lutter contre les cas de malaria non sévères. La combinaison de plusieurs molécules antipaludiques à mécanismes d'action différents, permet de lutter contre les effets de résistance. Les ARTs induisent une réduction rapide de la biomasse parasitaire, ce qui se traduit par des réponses cliniques et parasitologiques rapides suite au traitement. Aucune autre molécule antipaludique n'offre actuellement un même niveau d'efficacité et de tolérance que l'artémisinine, la rendant indispensable pour le traitement du paludisme grave. En dépit d'être le médicament antipaludique le plus efficace contre tous les stades érythrocytaires de Plasmodium à ce jour, l'artémisinine souffre d'une très faible solubilité dans l'eau, d'une courte demi-vie, d'un important effet de premier passage hépatique. De plus, le parasite a également développé une résistance vis-à-vis de l'artémisinine en Asie.

Les molécules de la famille indolone-*N*-oxyde constituent également un nouvel archétype chimique à propriétés antipaludiques (F. Nepveu *et al.*, J. Med. Chem., 2010, 53(2), 699-714 ; F.Nepveu *et al.,* « Dérivés pour le traitement de la malaria », brevet n° 07/06425 du 13-09-2007) basées sur de nouveaux mécanismes d'action. En effet, les indolone-*N*-oxydes présentent une activité anti-parasitaire équipotente contre les souches de *P. falciparum* sensibles ou résistantes à la chloroquine. De même, les indolone-*N*-oxydes ont l'avantage de présenter une affinité modérée pour l'albumine humaine sérique (HSA), permettant ainsi leur transport par cette protéine (N. Ibrahim *et al.*, Biomacromolecules 2010, 11, 3341-3351). Cependant, la très faible solubilité aqueuse des indolone-*N*-oxydes constitue un facteur limitant pour déterminer une forme posologique appropriée pour l'évaluation clinique de ces molécules.

Les protéines plasmatiques peuvent servir de transporteurs pour les médicaments. L'affinité d'une substance active pour les protéines plasmatiques est une caractéristique physico-chimique importante déterminant sa pharmacocinétique, également nommée par le terme ADMET : abréviation de « Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité ».

L'albumine sérique humaine (HSA) est la principale protéine extracellulaire du sang (60%), et le transporteur majeur des médicaments dans le sang ainsi que des composés endogènes. La liaison d'un médicament à la HSA a deux conséquences importantes : (i) la solubilisation de molécules hydrophobes permettant leur transport vers les cellules *in vitro* et *in vivo*, et (ii) la diminution de la concentration en molécule libre, qui est la forme pharmacologiquement active. Par exemple, un certain nombre de molécules actives *in vitro* ont été rendues inefficaces *in vivo* du fait d'une trop grande affinité pour l'albumine. D'autres molécules très actives *in vitro* se révèlent inefficaces *in vivo* du fait de leur insolubilité en milieu aqueux. Il est donc généralement nécessaire d'étudier l'interaction d'un futur médicament avec l'albumine.

Actuellement, du fait des effets de résistance du parasite Plasmodium à de nombreux médicaments, le nombre de cas de paludisme sévère augmente. L'impact de la malaria sur la mortalité infantile demeure importante, notamment en Afrique où 1 /5 des morts infantiles sont dues à la malaria. Le paludisme sévère et le traitement des enfants exigent une hospitalisation et des formulations à effets rapides telles que les injections intraveineuses. Il y a, à ce jour, un manque réel de formulations d'antipaludéens solubles en milieu aqueux et donc injectables. L'artémisinine n'est pas soluble dans l'eau et n'existe pas en formulation injectable. Les essais pré-cliniques et cliniques des *''leads''* de la série indolone-*N*-oxyde ne sont pas réalisables du fait de leur insolubilité en milieu aqueux.

L'un des buts de l'invention est de fournir de nouvelles formulations solubles de compositions antipaludiques utilisables pour une administration intraveineuse.

Un autre but de l'invention est de fournir de nouvelles formulations de compositions antipaludiques ciblant le globule rouge parasité.

Un autre but de l'invention est également de fournir un procédé de préparation de nanoparticules entrant dans la constitution de nouvelles compositions antipaludiques.

L'invention concerne ainsi une composition comprenant un agent antipaludéen comme substance active et de l'albumine humaine en tant que transporteur pour son utilisation comme médicament injectable sous forme de nanoparticules dans le traitement de la malaria.

L'invention repose sur l'observation surprenante faîte par les Inventeurs que l'albumine peut solubiliser l'agent antipaludéen sans lui faire perdre ses propriétés thérapeutiques.

De plus, l'albumine conserve sa fonction de vecteur de ciblage des globules rouges et permet de délivrer préférentiellement l'agent antipaludéen au niveau des globules rouges parasités, favorisant du même coup l'activité thérapeutique de l'agent antipaludéen.

Dans l'invention, le terme ***« transporteur »*** désigne un agent utilisé pour solubiliser une substance active. Ce terme correspond notamment à l'albumine sérique humaine utilisée pour solubiliser un agent antipaludéen.

Dans l'invention, le terme ***« vecteur ciblant »*** désigne un agent utilisé pour transporter une substance active vers des cellules spécifiques. Ce terme correspond notamment à l'albumine sérique humaine utilisée pour transporter un agent antipaludéen préférentiellement vers les globules rouges parasités.

Dans l'invention, le terme ***« injectable »*** est utilisé pour indiquer qu'une solution est administrable par voie parentérale. Dans le cas du traitement de cas de malaria compliqués, ou cérébral ou infantile, un médicament antipaludéen est préférentiellement injecté dans la circulation sanguine par voie intraveineuse afin de livrer le médicament directement sur le site de l'infection, c'est-à-dire le sang pour obtenir une action rapide et éviter l'effet de premier passage (métabolisation au niveau du foie lors d'une administration entérale).

Les ***« nanoparticules »*** correspondent à des particules ayant une taille de 10 à 1000 nm, notamment de 50 à 700 nm, particulièrement de 100 à 600 nm et plus particulièrement de 150 à 300 nm. En outre les tailles des nanoparticules citées ci-dessus sont valables avant et après la formulation de ces nanoparticules dans une composition pharmaceutique. Dans l'invention, les nanoparticules sont composées d'un transporteur et d'un agent antipaludéen.

Les compositions sont solubles dans l'eau, dans un tampon phosphate et dans les liquides physiologiques, notamment le sang.

Par ailleurs, la nanoformulation présente de nombreux avantages par rapport aux formulations traditionnelles. En effet, les nanoparticules permettent d'améliorer la vitesse de dissolution, la solubilité à saturation, la biodisponibilité et donc l'efficacité

des substances actives. De même, les nanoparticules permettent d'obtenir un effet qui élimine les fluctuations des concentrations plasmatiques du médicament, évite les concentrations sous-thérapeutiques à l'origine du développement des phénomènes de résistance et prolonge la durée de vie des substances actives.

Un mode de réalisation particulier de l'invention concerne une composition comprenant un agent antipaludéen comme substance active et de l'albumine humaine en tant que transporteur, l'agent antipaludéen et l'albumine humaine n'étant pas liés l'un à l'autre par une liaison chimique, et notamment par une liaison covalente, pour son utilisation comme médicament injectable sous forme de nanoparticules dans le traitement de la malaria.

L'expression *« l'agent antipaludéen et l'albumine humaine n'étant pas liés l'un à l'autre par une liaison chimique, et notamment par une liaison covalente »* signifie que l'agent antipaludéen et l'albumine se retrouvent dans la composition sous forme de deux substances distinctes.

Un autre mode de réalisation particulier de l'invention concerne une composition comprenant un agent antipaludéen comme substance active et de l'albumine humaine en tant que transporteur, l'agent antipaludéen et l'albumine humaine étant liés l'un à l'autre par une liaison covalente, pour son utilisation comme médicament injectable sous forme de nanoparticules dans le traitement de la malaria.

L'expression *« l'agent antipaludéen et l'albumine humaine étant liés l'un à l'autre par une liaison covalente »* signifie que l'agent antipaludéen et l'albumine se retrouvent dans la composition sous la forme d'une seule substance, c'est-à-dire que l'albumine est fonctionnalisée avec le composé antipaludéen.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition comprenant un agent antipaludéen comme substance active et de l'albumine humaine purifiée en tant que transporteur pour son utilisation comme médicament injectable sous forme de nanoparticules dans le traitement de la malaria.

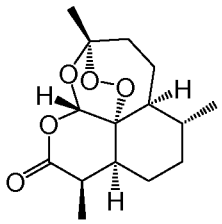
L'albumine humaine purifiée correspond à de l'albumine essentiellement dépourvue d'acides gras, c'est-à-dire moins de 0,005 %.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne une composition définie ci-dessus, dans laquelle la substance active est choisie parmi les dérivés d'indolone-*N*-oxydes et d'artémisinine.

L'invention présente ainsi l'avantage de rendre solubles les dérivés indolone-*N*-oxydes en milieu aqueux ou milieu aqueux tamponné.

De même, elle présente également l'avantage de proposer une nouvelle formulation soluble de l'artémisinine, laquelle est rendue plus efficace.

La molécule d'artémisinine peut être représentée par la formule suivante :



A titre d'exemple, l'artémisinine sous forme de nanosuspensions possède une demi-vie plus longue et est utilisable à des doses plus faibles et donc à une toxicité moindre.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne une composition définie ci-dessus, dans laquelle le dérivé d'indolone-*N*-oxydes et l'albumine ne sont pas liés entre eux par une liaison chimique, et notamment par une liaison de covalence.

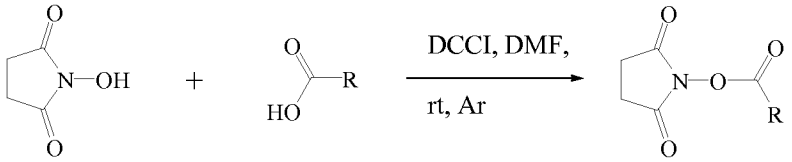
L'expression « le dérivé d'indolone-*N*-oxydes et l'albumine ne sont pas liés entre eux par une liaison chimique, et notamment par une liaison covalente » signifie que le dérivé d'indolone-*N*-oxydes et l'albumine se retrouvent dans la composition sous la forme de deux substances distinctes.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne une composition définie ci-dessus, dans laquelle un dérivé d'indolone-*N*-oxydes est fixé de manière covalente à l'albumine.

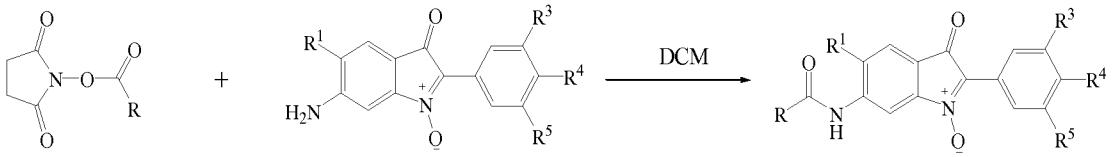
Il est en effet possible de lier par liaison de covalence une indolone-*N*-oxyde à l'albumine. La liaison se fait à partir d'une indolone-*N*-oxyde portant un groupement amine. Ce groupement peut être lié aux résidus carboxyliques de l'albumine en utilisant des protocoles d'activation en conditions douces (milieu aqueux).

Par exemple, il est possible d'activer les groupements carboxyliques de la protéine avec le *N*-hydroxysuccinimide, puis d'ajouter l'indolone-*N*-oxyde portant un

groupement NH_2 selon la réaction suivante (réactions avec des esters de *N*-hydroxysuccinimide et de dérivés d'amino-indolone-*N*-oxydes) :



Synthèse des esters de *N*-hydroxysuccinimide

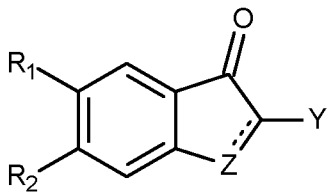


Cette liaison covalente entre le dérivé d'indolone-*N*-oxydes et l'albumine est telle que les propriétés pharmacocinétiques soient substantiellement conservées.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne une composition définie ci-dessus, dans laquelle l'artémisinine et l'albumine ne sont pas liées entre eux par une liaison chimique, et notamment par une liaison covalente.

L'expression *« l'artémisinine et l'albumine ne sont pas liés entre eux par une liaison chimique, et notamment par une liaison covalente »* signifie que l'artémisinine et l'albumine se retrouvent dans la composition sous la forme de deux substances distinctes.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition définie ci-dessus, dans laquelle la substance active est choisie parmi les composés de formule Ia :



Ia

dans laquelle :

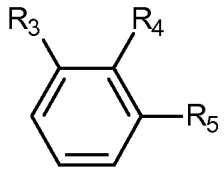
- le ou les substituants R_1 et R_2 sont choisis indifféremment dans le groupe comprenant l'atome d'hydrogène, un halogène, notamment le chlore et le fluor, le groupement CF_3, les groupements alkyle de 1 à 3 carbones, notamment méthyle, les groupements

alkyloxy de 1 à 6 carbones, notamment méthoxy, benzyloxy, les groupements -$COCH_3$, -$COOCH_3$, -OCF_3, NO_2, le groupement NH_2 et les groupements alkylamino,

- les deux substituants R_1 et R_2 voisins pouvant former le cycle méthylènedioxy -$O(CH_2)$ O-;

- Y représente soit :

  • un groupement phényl ramifié de formule IIa



IIa

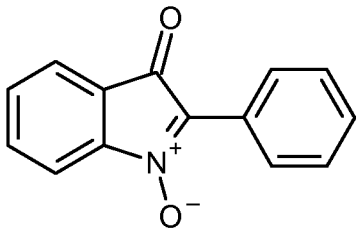
dans laquelle le ou les substituants R_3, R_4 et R_5 sont choisis indifféremment dans le groupe comprenant l'hydrogène, un halogène, notamment F, Cl, les groupements alkylfluorés notamment CF_3, les groupements alkyle à 1 à 3 carbones, les groupements alkyloxy notamment OCH_3, OCF_3, phényl-oxy, les groupements alkylamino, dialkyl ou monoalkyl, notamment $(CH_3)_2N$, $(C_2H_5)_2N$, $(C_3H_7)_2N$, $(C_3H_7)NH$ et leurs sels, les groupements NO_2, NH_2, CH_3CONH, CH_3OCO, 4-chlorophenyl, *tert*-butyl, isopropoxy, hydroxymethyl, morpholin-4-yl, butylamino,

  • un groupement pyren-1-yl,
  • un groupement 6'-méthoxy-naphthalen-2-yl,
  • un groupement 2'-pyridinyl,
  • un groupement 3'-pyridinyl, ou
  • un groupement thiophen-3-yl,

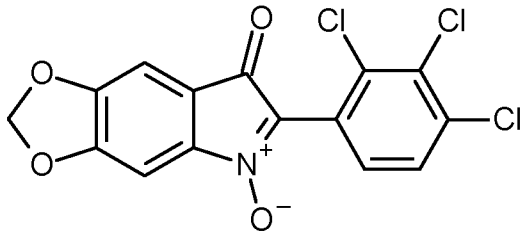
- Z représente soit :

  • N^+O^-, et  correspond à une double liaison covalente, ou
  • NH ou NOH, et  correspond à une simple liaison covalente.

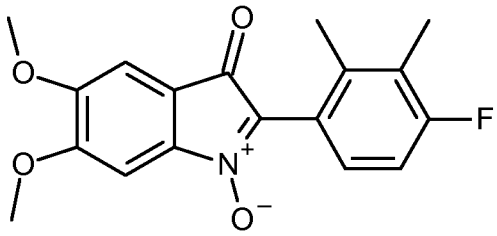
Dans un autre mode de réalisation, l'invention concerne une composition définie ci-dessus, dans laquelle la substance active est choisie parmi les composés suivants :



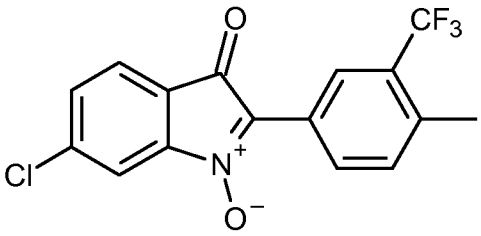
1.



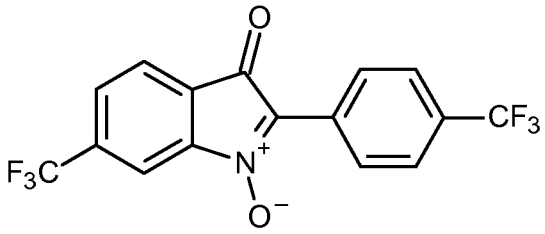
2.



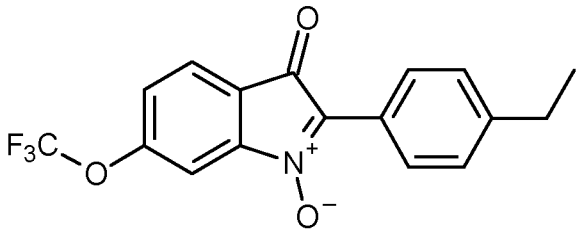
3.



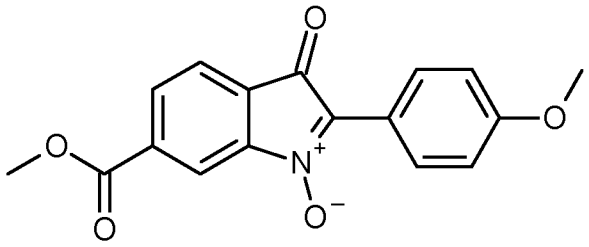
4.



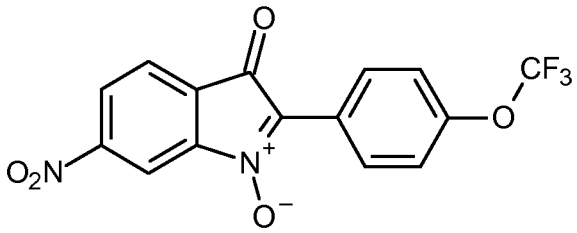
5 5.



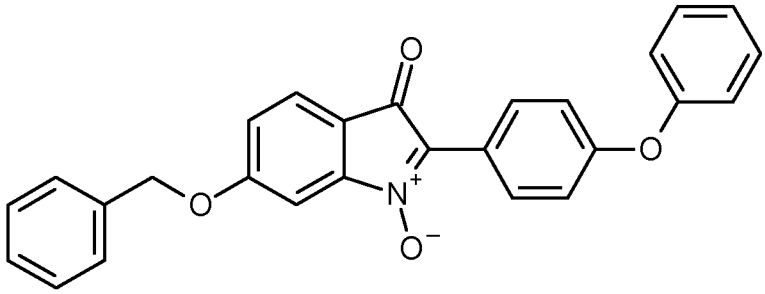
6.



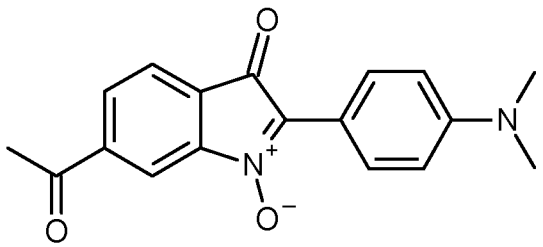
7.



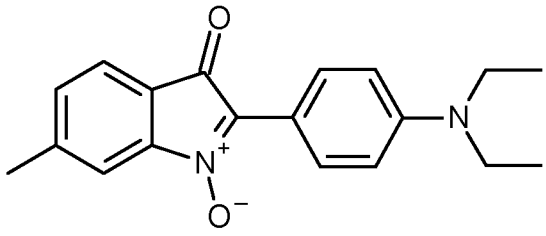
8.



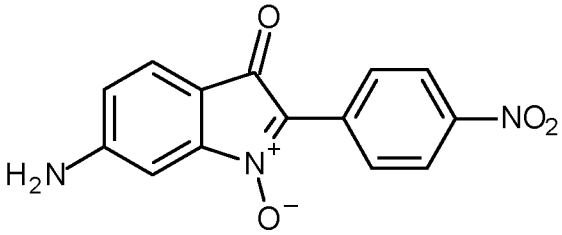
9.



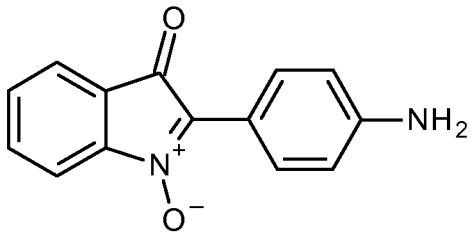
10.



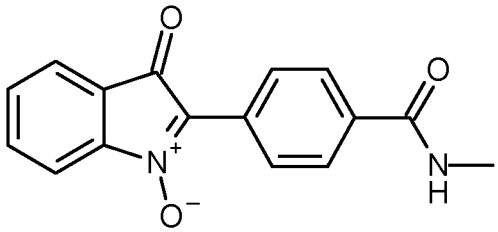
11.



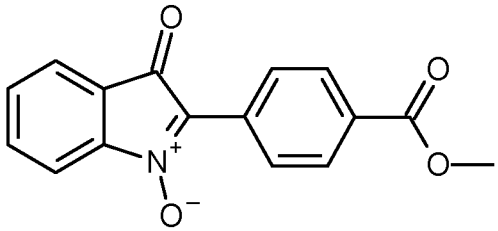
12.



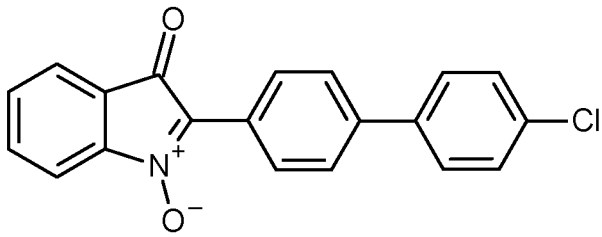
13.



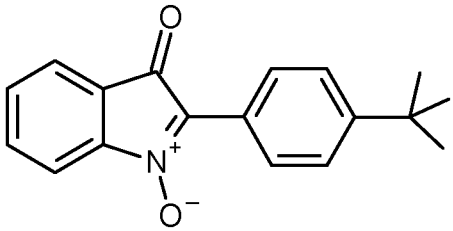
14.



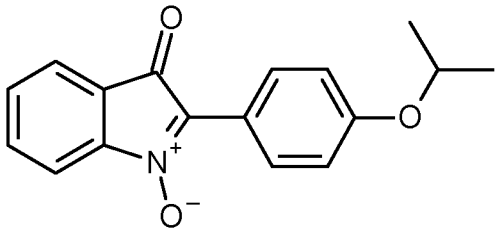
15.



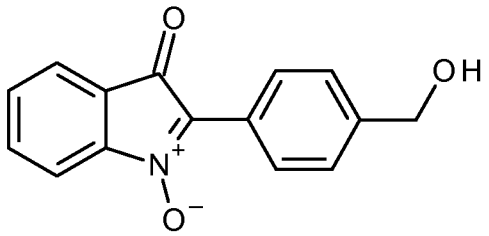
16.



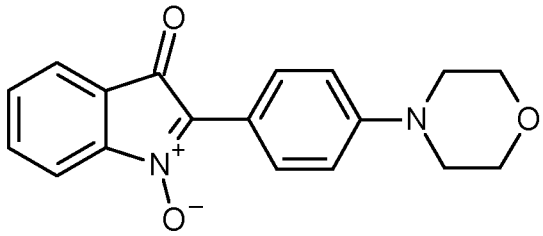
17.



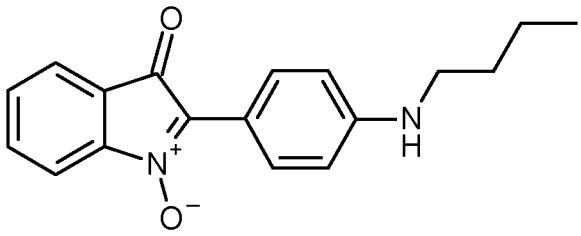
18.



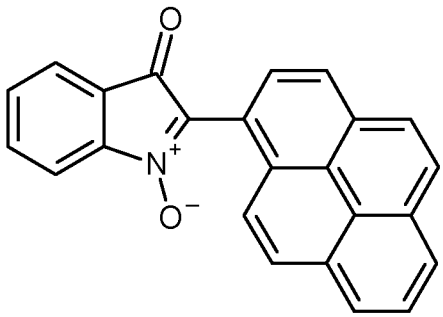
19.



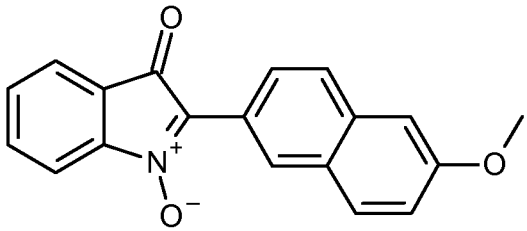
20.



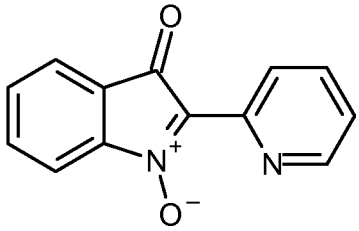
21.



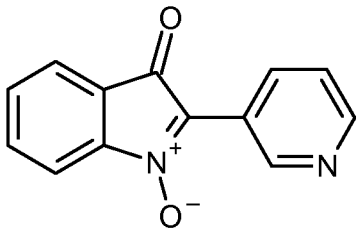
22.



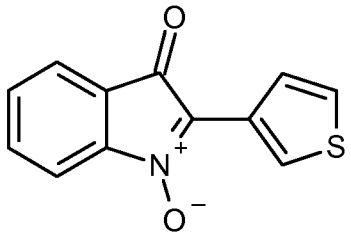
23.



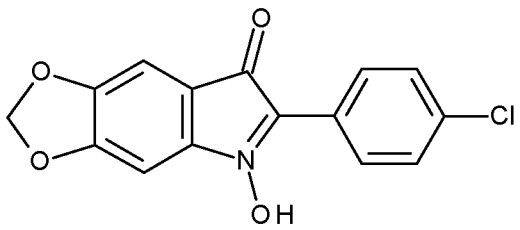
24.



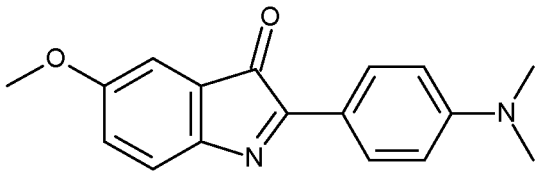
25.



26.



27.



28.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition définie ci-dessus, dans laquelle la substance active est de l'artémisinine.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition définie ci-dessus, dans laquelle la substance active et l'albumine humaine sont présentes dans un rapport pondéral de 1 : 5 à 1 : 20.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition définie ci-dessus, dans laquelle la substance active et l'albumine humaine sont susceptibles d'être

utilisées sous forme de dose unitaire, dans laquelle la substance active est présente de 375 à 1125 mg.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition définie ci-dessus dans laquelle la substance active est un dérivé d'indolone-*N*-oxydes utilisé sous forme de dose unitaire de 375 à 1125 mg.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition définie ci-dessus dans laquelle la substance active est un dérivé d'indolone-*N*-oxydes utilisé sous forme de dose unitaire de 375 à 1125 mg, à raison d'une prise par jour.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition définie ci-dessus dans laquelle la substance active est un dérivé d'indolone-*N*-oxydes utilisé sous forme de dose unitaire de 5 à 15 mg/kg, à raison d'une prise par jour.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition définie ci-dessus dans laquelle la substance active est l'artémisinine utilisée sous forme de dose unitaire de 375 à 750 mg.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition définie ci-dessus dans laquelle la substance active est l'artémisinine utilisée sous forme de dose unitaire de 375 à 750 mg, à raison d'une prise par jour.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition définie ci-dessus dans laquelle la substance active est l'artémisinine utilisée sous forme de dose unitaire de 5 à 10 mg/kg, à raison d'une prise par jour.

Dans les compositions définies ci-dessus comprenant des doses unitaires de substance active de 375 à 1125 mg, l'albumine est présente à raison de 1,8 à 22,5 g.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition définie ci-dessus, dans laquelle les nanoparticules ont une taille allant de 200 à 400 nm.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition définie ci-dessus comprenant des nanoparticules dans lesquelles la substance active est un dérivé d'indolone-*N*-oxydes et des nanoparticules dans lesquelles la substance active est l'artémisinine.

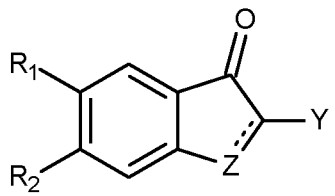
Un autre aspect de l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant un agent antipaludéen comme substance active et de l'albumine humaine transportant le principe actif vers le globule rouge parasité, notamment sous la forme de nanoparticules de substance active et d'albumine.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus comprenant un agent antipaludéen comme substance active et de l'albumine humaine intervenant à la fois comme transporteur de l'agent antipaludéen pour le solubiliser et comme vecteur de ciblage permettant de délivrer l'agent antipaludéen vers les globules rouges parasités.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus comprenant un agent antipaludéen et de l'albumine, ainsi qu'un excipient.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus, contenant à titre de substance active une molécule choisie parmi les dérivés d'indolone-*N*-oxydes, ou l'artémisinine, en association avec un vecteur ciblant le stade érythrocytaire du parasite, l'albumine humaine.

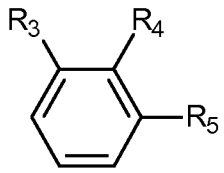
Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus, dans laquelle la substance active est choisie parmi les composés de formule Ia dans laquelle :



Ia

dans laquelle :

- le ou les substituants R_1 et R_2 sont choisis indifféremment dans le groupe comprenant l'atome d'hydrogène, un halogène, notamment le chlore et le fluor, le groupement CF_3, les groupements alkyle de 1 à 3 carbones, notamment méthyle, les groupements alkyloxy de 1 à 6 carbones, notamment méthoxy, benzyloxy, les groupements $-COCH_3$, $-COOCH_3$, $-OCF_3$, NO_2, le groupement NH_2 et les groupements alkylamino,
- les deux substituants R_1 et R_2 voisins pouvant former le cycle méthylènedioxy $-O(CH_2)O-$;
- Y représente soit :
  - un groupement phényl ramifié de formule IIa



IIa

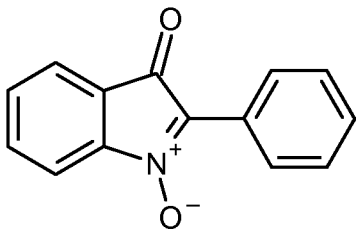
dans laquelle le ou les substituants R_3, R_4 et R_5 sont choisis indifféremment dans le groupe comprenant l'hydrogène, un halogène, notamment F, Cl, les groupements alkylfluorés notamment CF_3, les groupements alkyle à 1 à 3 carbones, les groupements alkyloxy notamment OCH_3, OCF_3, phényl-oxy, les groupements alkylamino, dialkyl ou monoalkyl, notamment $(CH_3)_2N$, $(C_2H_5)_2N$, $(C_3H_7)_2N$, $(C_3H_7)NH$ et leurs sels, les groupements NO_2, NH_2, CH_3CONH, CH_3OCO, 4-chlorophenyl, *tert*-butyl, isopropoxy, hydroxymethyl, morpholin-4-yl, butylamino,

- un groupement pyren-1-yl,
- un groupement 6'-méthoxy-naphthalen-2-yl,
- un groupement 2'-pyridinyl,
- un groupement 3'-pyridinyl, ou
- un groupement thiophen-3-yl,

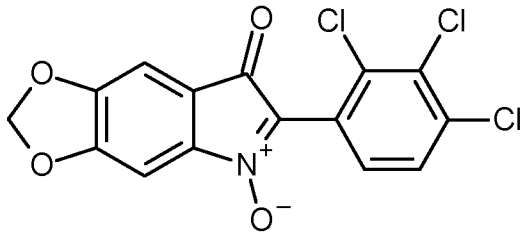
- Z représente soit :

- N^+O^-, et  correspond à une double liaison covalente, ou
- NH ou NOH, et  correspond à une simple liaison covalente.

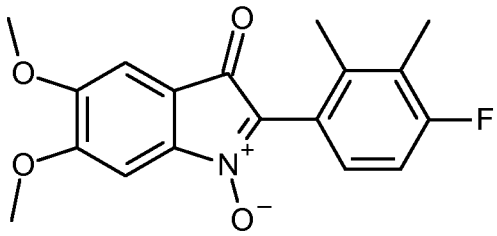
Dans un autre mode de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus, dans laquelle la substance active est choisie parmi les composés suivants:



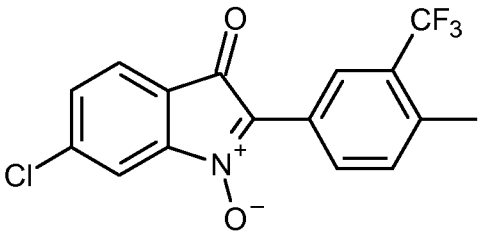
1.



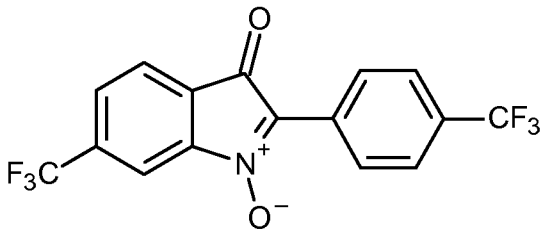
2.



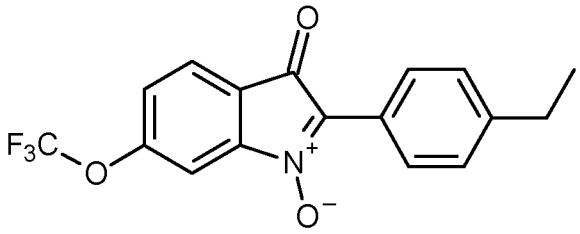
3.



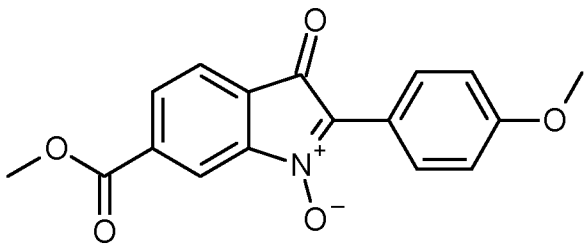
4.



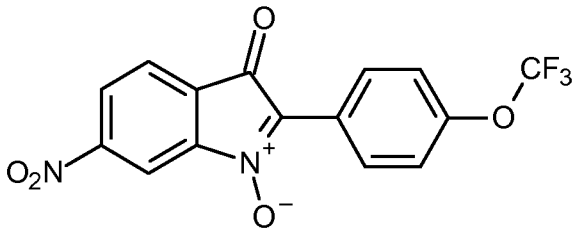
5.



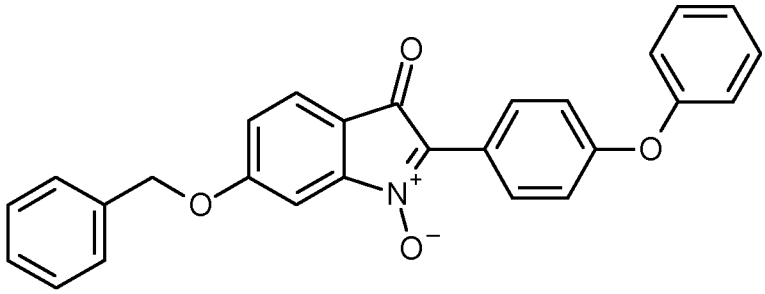
6.



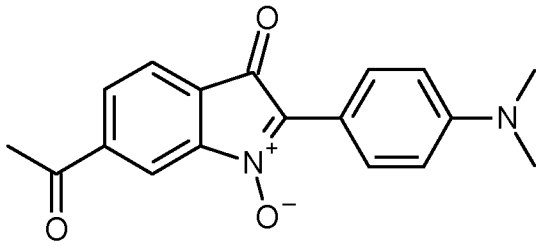
7.



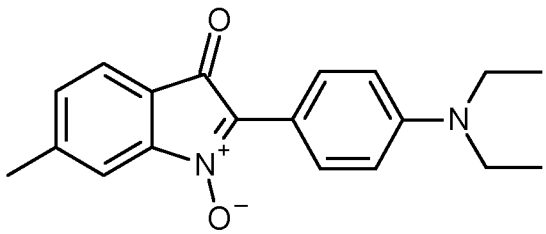
8.



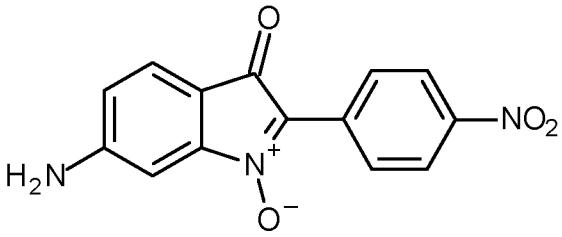
9.



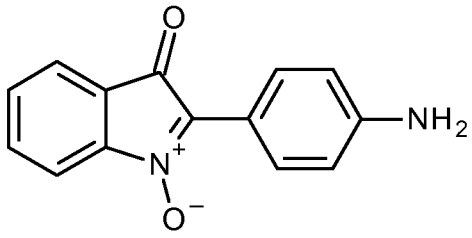
10.



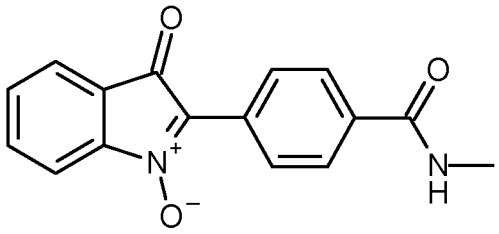
11.



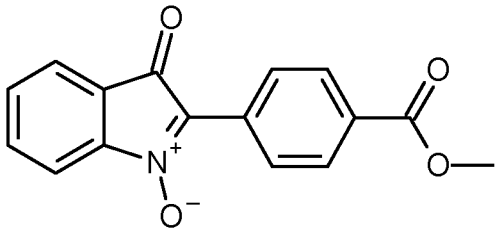
12.



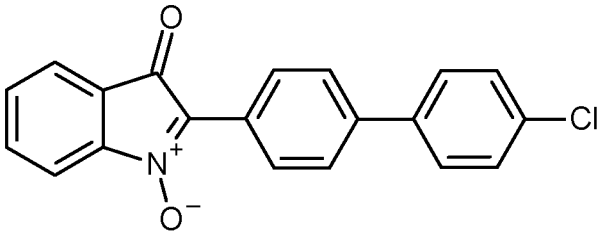
13.



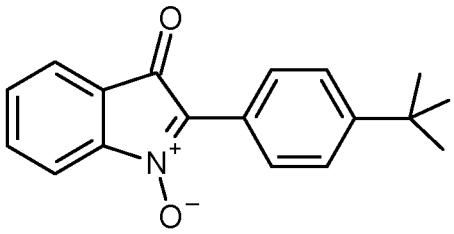
14.



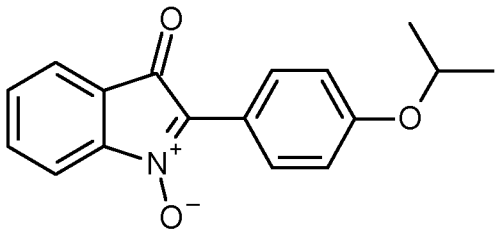
15.



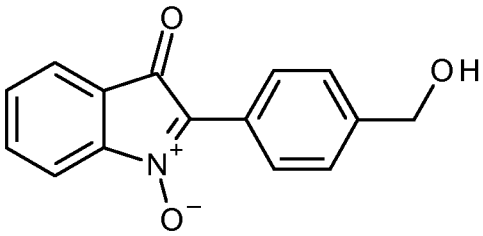
16.



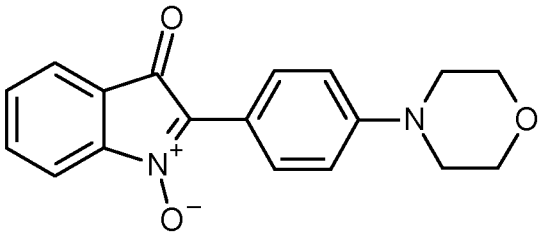
17.



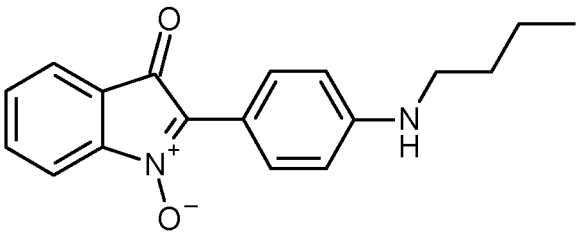
18.



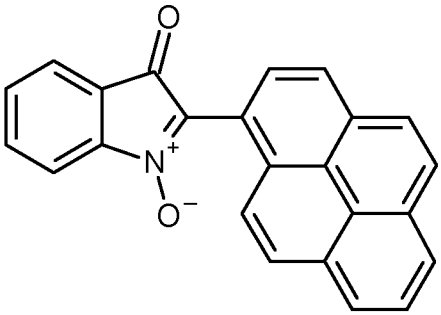
19.



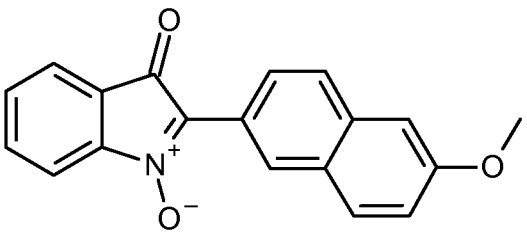
20.



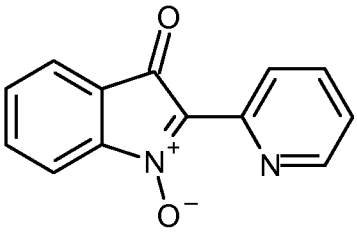
21.



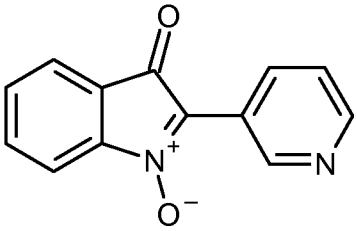
22.



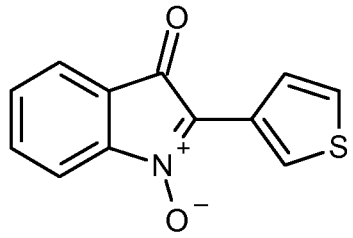
23.



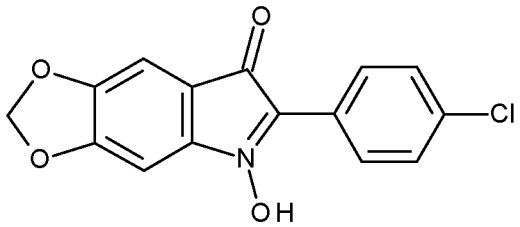
24.



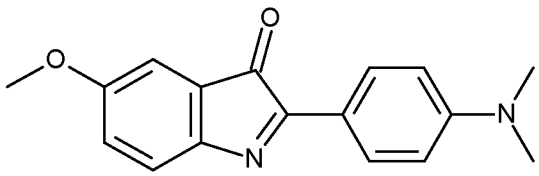
25.



26.



27.



28.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus, dans laquelle la substance active est l'artémisinine.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus, dans laquelle la substance active et l'albumine humaine sont présentes dans un rapport pondéral de 1/5 à 1/20.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus, dans laquelle la substance active et l'albumine humaine sont susceptibles d'être utilisées sous forme de dose unitaire, dans laquelle la substance active est présente de 375 à 1125 mg.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus dans laquelle la substance active est un dérivé d'indolone-*N*-oxydes utilisé sous forme de dose unitaire de 375 à 1125 mg.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus dans laquelle la substance active est un dérivé d'indolone-*N*-oxydes utilisé sous forme de dose unitaire de 375 à 1125 mg, à raison d'une prise par jour.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus dans laquelle la substance active est un dérivé d'indolone-*N*-oxydes utilisé sous forme de dose unitaire de 5 à 15 mg/kg, à raison d'une prise par jour.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus dans laquelle la substance active est l'artémisinine utilisée sous forme de dose unitaire de 375 à 750 mg.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus dans laquelle la substance active est l'artémisinine utilisée sous forme de dose unitaire de 375 à 750 mg, à raison d'une prise par jour.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus dans laquelle la substance active est l'artémisinine utilisée sous forme de dose unitaire de 5 à 10 mg/kg, à raison d'une prise par jour.

Dans les compositions pharmaceutiques définies ci-dessus comprenant des doses unitaires de substance active de 375 à 1125 mg, l'albumine est présente à raison de 1,8 à 22,5 g.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus, se présentant sous forme de solution injectable par voie intraveineuse.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus, se présentant sous forme de lyophilisat.

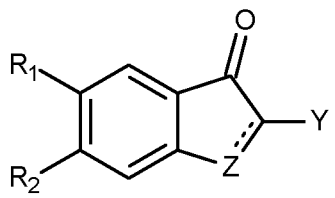
Dans un mode de réalisation, l'invention concerne une composition pharmaceutique définie ci-dessus comprenant des nanoparticules dans lesquelles la substance active est un dérivé d'indolone-*N*-oxydes et des nanoparticules dans lesquelles la substance active est l'artémisinine.

Un autre aspect de l'invention concerne des nanoparticules comprenant un agent anti-paludéen comme substance active et de l'albumine humaine.

Les nanoparticules ont été préparées à partir d'albumine sérique humaine (HSA). Cette protéine présente plusieurs avantages pour une formulation injectable de nanoparticules pour traiter le paludisme au stade sanguin : (i) la HSA a des propriétés tensioactives qui améliorent la mouillabilité de la drogue, (ii) la biodisponibilité du médicament est maximale (100%), (iii) la HSA cible les globules rouges parasités car elle y est captée et dégradée sélectivement, (iv) le médicament conserve son activité rapide, (v) le métabolisme hépatique est évité, (vi) les doses thérapeutiques sont réduites, ce qui réduit la toxicité du médicament, (vii) la HSA est biocompatible, biodégradable et non immunogène.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne des nanoparticules définies ci-dessus, dans lesquelles la substance active est choisie parmi les dérivés d'indolone-*N*-oxydes ou l'artémisinine.

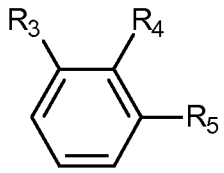
Dans un mode de réalisation, l'invention concerne des nanoparticules définies ci-dessus, dans laquelle la substance active est choisie parmi les composés de formule Ia dans laquelle:



Ia

dans laquelle :

- le ou les substituants R_1 et R_2 sont choisis indifféremment dans le groupe comprenant l'atome d'hydrogène, un halogène, notamment le chlore et le fluor, le groupement CF_3, les groupements alkyle de 1 à 3 carbones, notamment méthyle, les groupements alkyloxy de 1 à 6 carbones, notamment méthoxy, benzyloxy, les groupements $-COCH_3$, $-COOCH_3$, $-OCF_3$, NO_2, le groupement NH_2 et les groupements alkylamino,
- les deux substituants R_1 et R_2 voisins pouvant former le cycle méthylènedioxy $-O(CH_2)O-$;
- Y représente soit :
  - un groupement phényl ramifié de formule IIa



IIa

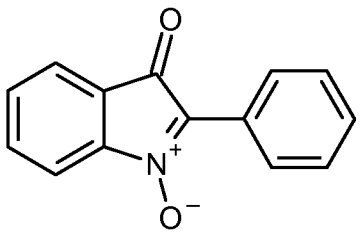
dans laquelle le ou les substituants R_3, R_4 et R_5 sont choisis indifféremment dans le groupe comprenant l'hydrogène, un halogène, notamment F, Cl, les groupements alkylfluorés notamment CF_3, les groupements alkyle à 1 à 3 carbones, les groupements alkyloxy notamment OCH_3, OCF_3, phényl-oxy, les groupements alkylamino, dialkyl ou monoalkyl, notamment $(CH_3)_2N$, $(C_2H_5)_2N$, $(C_3H_7)_2N$, $(C_3H_7)NH$ et leurs sels, les groupements NO_2, NH_2, CH_3CONH, CH_3OCO, 4-chlorophenyl, *tert*-butyl, isopropoxy, hydroxymethyl, morpholin-4-yl, butylamino,

- un groupement pyren-1-yl,
- un groupement 6'-méthoxy-naphthalen-2-yl,
- un groupement 2'-pyridinyl,
- un groupement 3'-pyridinyl, ou
- un groupement thiophen-3-yl,

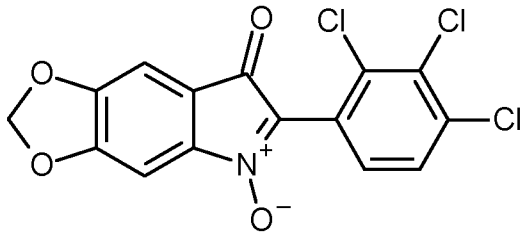
- Z représente soit :

- N^+O^-, et  correspond à une double liaison covalente, ou
- NH ou NOH, et  correspond à une simple liaison covalente.

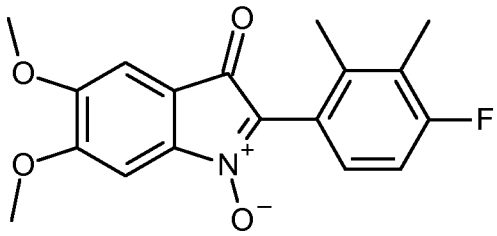
Dans un autre mode de réalisation, l'invention concerne des nanoparticules définies ci-dessus, dans laquelle la substance active est choisie parmi les composés suivants:



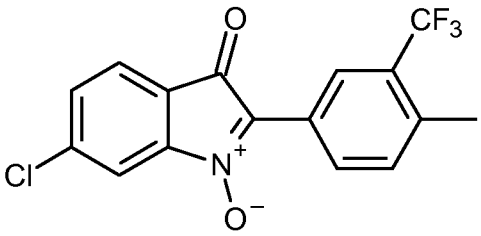
1.



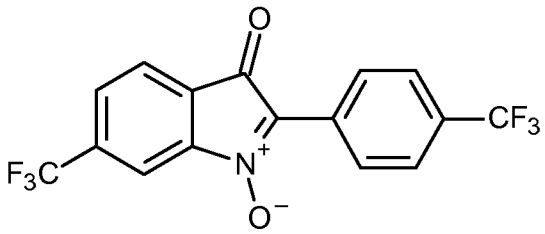
2.



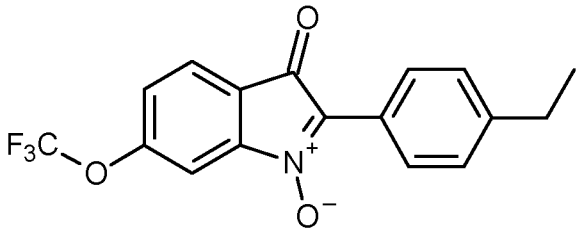
3.



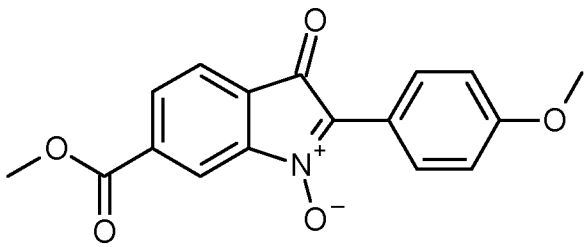
4.



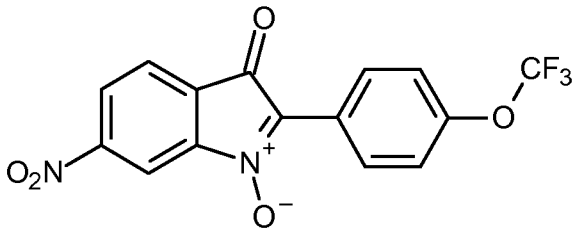
5.



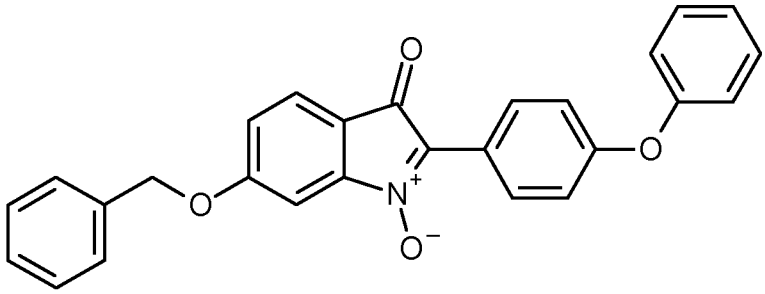
6.



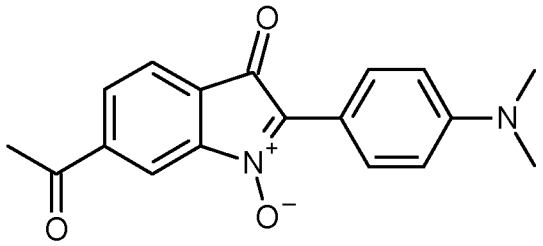
7.



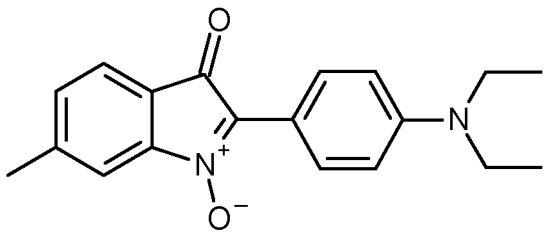
8.



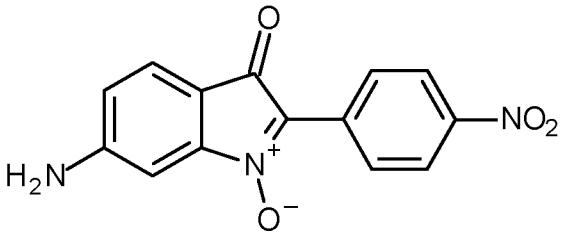
9.



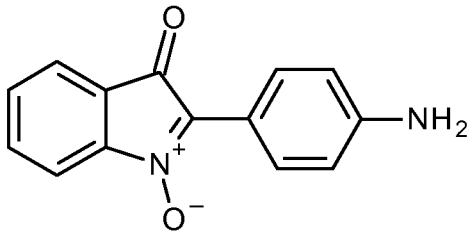
10.



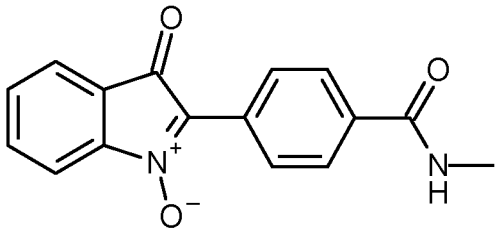
11.



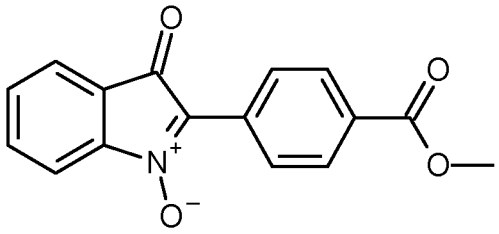
12.



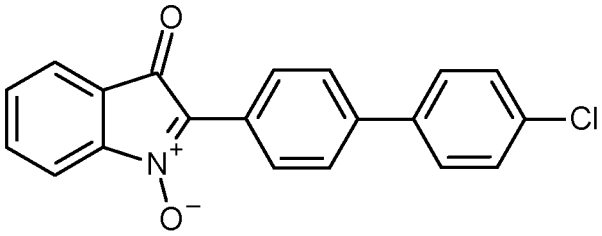
13.



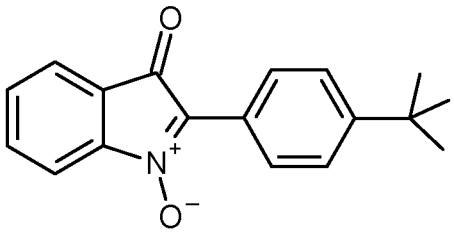
14.



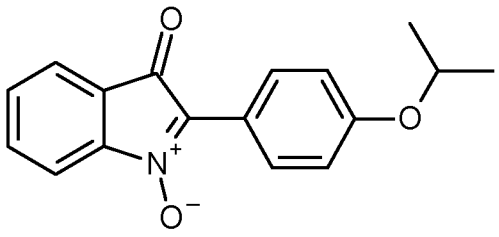
15.



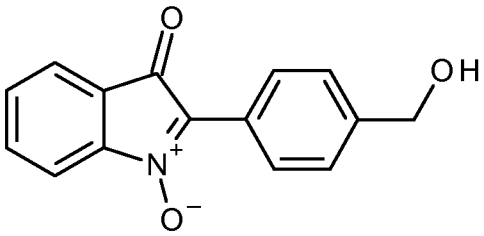
16.



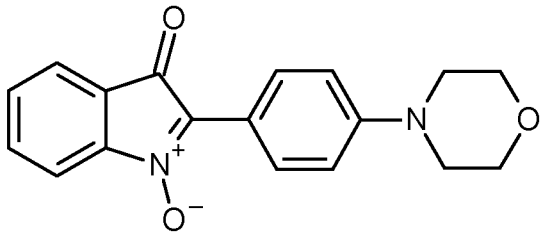
17.



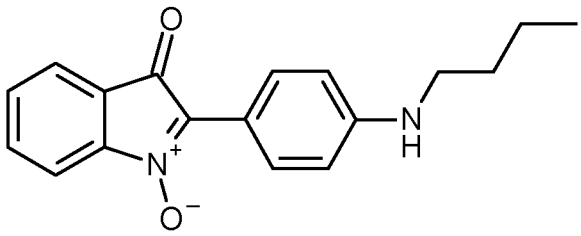
18.



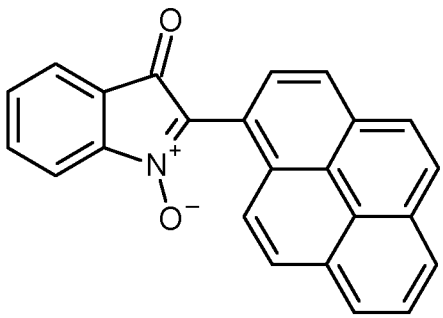
19.



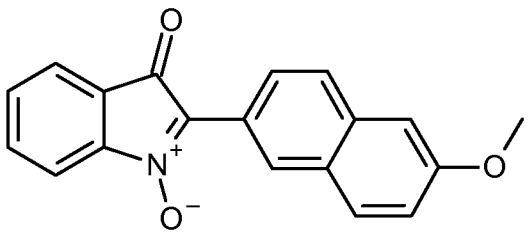
20.



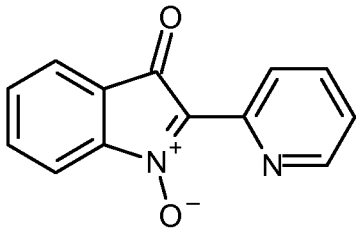
21.



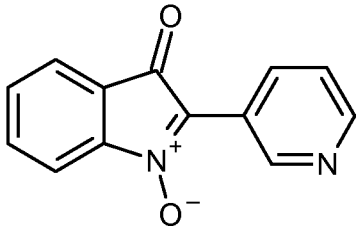
22.



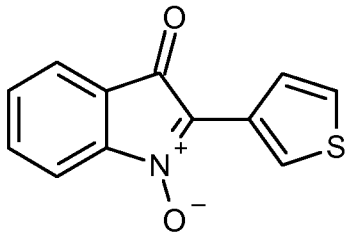
23.



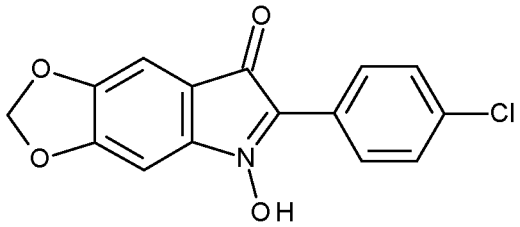
24.



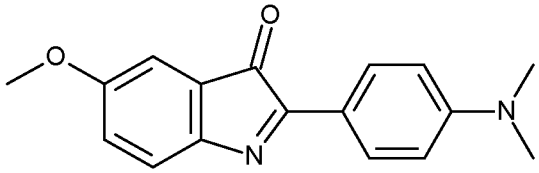
25.



26.



27.



28.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne des nanoparticules définies ci-dessus, dans lesquelles la substance active est l'artémisinine.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne des nanoparticules définies ci-dessus, dans lesquelles la substance active (indolone-*N*-oxyde) et l'albumine humaine sont présentes dans un rapport de concentration substance : albumine allant de 1 : 5 à 1 : 20 pour obtenir un diamètre de particule inférieur à 330 nm avec une homogénéité satisfaisante, soit un indice de polydispersité inférieur à 0,25.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne des nanoparticules définies ci-dessus, dans lesquelles la substance active, l'artémisinine et l'albumine humaine sont présentes dans un rapport de concentration artémisinine : albumine allant de 1 : 5 à 1 : 10 conduisant à des tailles de particules inférieures à 350 nm et un index de polydispersité inférieur à 0,25.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne des nanoparticules définies ci-dessus, dans lesquelles la substance active est susceptible d'être utilisée sous forme de dose unitaire de 375 à 1125 mg.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne des nanoparticules définies ci-dessus, ayant une taille allant 200 à 400 nm.

Un autre aspect de l'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules comprenant :

- une étape d'évaporation du solvant organique contenu dans la nanosuspension, pour obtenir une nanosuspension dépourvue de solvant organique,
- une étape d'homogénéisation à une pression allant de 15000 (103 421,35 kPa) à 30000 psi (206 842,71 kPa), d'un mélange d'un agent antipaludéen et d'albumine dissous, respectivement, dans un solvant organique et dans un solvant aqueux, pour obtenir une nanosuspension,
- et une étape de lyophilisation de la nanosuspension dépourvue de solvant organique, pour obtenir des nanoparticules.

L'étape d'homogénéisation se fait pendant 10 à 40 cycles, lesquels cycles pouvant être effectués en une ou deux étapes.

Un mode de réalisation de l'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules défini ci-dessus, dans lequel l'agent antipaludéen est choisi parmi les dérivés d'indolone-*N*-oxyde et leurs sels pharmaceutiquement acceptables.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules défini ci-dessus, dans lequel l'agent antipaludéen est l'artémisinine.

Dans un autre mode de réalisation, l'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules défini ci-dessus, dans lequel les dérivés d'indolone-*N*-oxydes sont dissous dans l'acétone.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules défini ci-dessus, dans lequel l'étape d'homogénéisation est réalisée de 15 000 psi (103 421,35 kPa) à 30 000 psi (206 842,71 kPa) pendant 10 à 20 cycles.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules défini ci-dessus, dans lequel l'étape d'homogénéisation est réalisée à 25000 psi (172 368,93 kPa) pendant 15 cycles.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules défini ci-dessus, dans lequel l'artémisinine est dissoute dans de l'éthanol.

Dans un autre mode de réalisation plus particulier, l'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules défini ci-dessus, dans lequel l'étape d'homogénéisation est réalisée à 15000 psi (103 421,35 kPa) pendant 5 cycles, suivis de 35 cycles à 25000 psi (172 368,93 kPa).

Dans un autre mode de réalisation plus particulier, l'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules défini ci-dessus, dans lequel l'albumine est dissoute dans de l'eau ou dans un tampon phosphate.

L'élimination du solvant est généralement relativement facile à l'échelle d'un laboratoire, mais elle devient plus problématique lors d'une production en grandes quantités. Il a donc été procédé à des tests préliminaires pour déterminer le solvant organique approprié. Le critère de sélection du solvant a été la meilleure solubilité possible avec la substance active et la meilleure volatilité possible

Sur ces critères, l'acétone/eau (14%, v/v) a été retenu comme système solvant/antisolvant. L'eau agit comme un antisolvant miscible de la substance hydrophobe. Alors que l'albumine incorpore la substance active dans sa matrice et augmente sa mouillabilité.

Il est important de noter qu'en l'absence de substance active, une solution aqueuse de HSA ne peut être transformée en nanoparticules quand elle est mélangée avec de l'acétone dans les mêmes conditions expérimentales. La présence de la substance active est donc un pré-requis à la formation de nanoparticules stables selon ce procédé. Ceci peut être expliqué par la précipitation de la substance active au contact de l'eau qui entraînerait son inclusion dans la matrice de la HSA, favorisée par l'affinité entre la substance active et la HSA.

De plus, l'ajout de substance active dans de l'acétone et dans de l'eau sans HSA produit des agrégats macroscopiques de substance active.

Le procédé de l'invention a donc été optimisée en termes de ratio de substance active/HSA, concentration de substance active, force ionique et paramètres d'homogénéisation (pression d'homogénéisation et nombre de cycles).

La stabilité physique des nanoparticules est principalement représentée par l'absence d'agrégats et la formation de particules. L'apparition de telles particules s'expliquent par la maturation d'Ostwald, un phénomène qui résulte de la différence de solubilité à saturation entre les petites particules de quelques nm à 500 nm et les grosses particules, de l'ordre du micromètre. Les petites particules possèdent un haut degré de courbure et ont donc une plus grande solubilité à saturation en comparaison des grosses particules. En conséquence, les petites particules se dissolvent et se déposent à la surface des grosses particules, qui sont moins solubles. De cette manière, les petites particules disparaissent tandis que les grosses continuent de croître en microparticules.

Généralement plus le PI est grand, plus le phénomène de maturation d'Ostwald est prononcé. Pour pallier ce problème, il a été procédé à des cycles d'homogénéisation supplémentaires, réalisés après que les particules aient atteint leur taille minimale, ceci pour améliorer l'homogénéité de la population et limiter ainsi la maturation d'Ostwald.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules comprenant :

- une étape d'évaporation du solvant organique contenu dans la nanosuspension, pour obtenir une nanosuspension dépourvue de solvant organique,
- une étape d'homogénéisation à 15 cycles à 25000 psi (172 368,93 kPa) d'un mélange de dérivé d'indolone-*N*-oxydes et d'albumine dissous respectivement, dans de l'acétone et dans de l'eau, pour obtenir une nanosuspension,
- et une étape de lyophilisation de la nanosuspension dépourvue de solvant organique, pour obtenir des nanoparticules.

Dans un mode de réalisation, l'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules comprenant :

- une étape d'évaporation du solvant organique contenu dans la nanosuspension, pour obtenir une nanosuspension dépourvue de solvant organique,
- une étape d'homogénéisation à 5 cycles à 15000 psi (103 421,35 kPa), puis 35 cycles à 25 000 psi (172 368,93 kPa) d'un mélange d'artémisinine et d'albumine dissous respectivement, dans de l'éthanol et dans de l'eau, pour obtenir une nanosuspension,

- et une étape de lyophilisation de la nanosuspension dépourvue de solvant organique, pour obtenir des nanoparticules.

Dans un autre mode de réalisation plus particulier, l'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules défini ci-dessus, comprenant un agent de cryoprotection utilisé avant l'étape de lyophilisation, pour éviter l'agrégation des nanoparticules.

Les figures et les exemples suivants illustreront mieux l'invention, sans pour autant en limiter sa portée.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1. Optimisation des conditions de préparation des nanoparticules de substance active (6-(4-chlorophényl)-7H-[1,3]dioxolo [4,5-f]indol-7-one-5-oxyde)/ albumine sérique humaine (HSA).

(A) Effets du rapport [substance active]/ [HSA] sur le diamètre moyen en nm (histogrammes) et l'indice de polydispersité (courbes) des nanoparticules. Le diamètre moyen est mesuré avant lyophilisation (barres de gauche) et après lyophilisation (barres de droite). L'indice de polydispersité est mesuré avant (losanges) et après (carrés) lyophilisation.

(B) Effets de la concentration en substance active sur le diamètre moyen en nm (histogramme) et l'indice de polydispersité (courbe) des nanoparticules.

(C) Effets de la force ionique (concentration en NaCl) sur le diamètre moyen en nm (histogrammes) et le potentiel Zeta en mV (courbes) des nanoparticules. Le diamètre moyen est mesuré avant (barres de gauche) et après (barres de droite) lyophilisation. Le potentiel Zeta est mesuré avant (losanges) et après (carré) lyophilisation.

(D) Effets de la pression d'homogénéisation en psi sur le diamètre moyen en nm (histogramme) et l'indice de polydispersité (courbe) des nanoparticules. (NH : Non homogénéisé).

(E) Effets du nombre de cycles sur le diamètre moyen en nm (histogramme) et l'indice de polydispersité (courbe) des nanoparticules.

Figure 2. Observation et distribution des nanoparticules de substance active (6-(4-chlorophényl)-7H-[1,3]dioxolo [4,5-f]indol-7-one-5-oxyde)/ albumine sérique humaine (HSA).

La substance active et les nanoparticules de substance active/HSA ont été examinées par microscopie électronique en transmission (MET) et analysées par spectroscopie à corrélation de photons (PCS) à différents stades de la préparation des nanoparticules.

La figure a) présente les cristaux de substance active pure, dont la taille excède la limite mesurable par PCS (3 μm).

La figure b) correspond à la suspension initiale, obtenue après ajout de la substance active et évaporation du solvant et avant homogénéisation. Elle présente des particules rectangulaires avec un diamètre moyen de 786 nm et un indice de polydispersité de la population de 0,325.

La figure c) correspond à la suspension après homogénéisation et présente des particules avec un diamètre moyen de 222,2 nm et un indice de polydispersité de la population de 0,166.

La figure d) correspond à la suspension après lyophilisation et présente des particules avec un diamètre moyen de 367,8 nm et un indice de polydispersité de la population de 0,268.

Figure 3. Cinétique de dissolution (libération) de la substance active (6-(4-chlorophényl)-7H-[1,3]dioxolo [4,5-f]indol-7-one-5-oxyde) dans du PBS.

La dissolution de la substance active, pour la substance active pure (triangles) et pour les nanoparticules de substance active/albumine sérique humaine (carrés), a été mesurée en fonction du temps. L'axe des ordonnées correspond au pourcentage de substance active libérée, et l'axe des abscisses correspond au temps en heures.

La dissolution de la substance active pure est relativement lente (100% en 3 heures) avec un décalage initial de 45 minutes environ dû à un manque de mouillabilité.

Au contraire, les nanoparticules de substance active/albumine sérique humaine homogénéisées présentent une dissolution rapide de la substance active (100% en 30 minutes, en comparaison de seulement 1,5% de substance active pure pendant la même période).

Figure 4. Evolution de la parasitémie moyenne de *Plasmodium berghei* ANKA chez des souris infectées ayant reçu différentes doses de nanoparticules de substance active (6-(4-chlorophényl)-7H-[1,3]dioxolo [4,5-f]indol-7-one-5-oxyde)/albumine sérique humaine (HSA).

Les souris ont été infectées à jour 0, puis ont reçu une injection par jour de nanoparticules chargées, le jour de l'infection (D0) et pendant les 3 jours suivants (D1, D2 et D4). La parasitémie (%) est ensuite mesurée chaque jour à partir du 4ème jour suivant l'infection (D4). L'axe des ordonnées correspond à la parasitémie en %, et l'axe des abscisses correspond au temps en jours.

Les courbes correspondent aux échantillons de souris ayant reçu des injections de nanoparticules à 0 mg/kg (losange, contrôle), 6,25 mg/kg (carrés), 12,5 mg/kg (triangles) ou 25 mg/kg (croix). La courbe en pointillés correspond à la dose efficace médiane (DE50) théorique.

Figure 5. Evolution de la parasitémie (a) et de la survie (b) chez des souris humanisées infectées par *Plasmodium falciparum*, ayant reçu ou non un traitement avec des nanoparticules de substance active (artémisinine)/albumine sérique humaine (HSA).

Les souris humanisées correspondent à des souris immunodéficientes ayant reçu une greffe de globules rouges humains. Les souris ont été infectées à jour 0, puis la parasitémie et la survie ont été mesurées tous les deux jours. L'axe des ordonnées correspond à la parasitémie en % (a) ou à la survie (b), et l'axe des abscisses correspond au temps en jours (a,b).

Les courbes correspondent aux souris n'ayant pas reçu de traitement (losanges) ou ayant reçu un traitement de nanoparticules à partir du jour 7 (une injection à 10 mg/kg pendant 4 jours) (ronds).

EXEMPLES

Exemple 1 : Préparation de nanoparticules comprenant un dérivé d'indolone-*N*-oxyde et de l'albumine humaine

Le dérivé d'indolone-*N*-oxyde (6-(4-chlorophenyl)-7*H*-[1,3]dioxolo [4,5-f]indol-7-one-5-oxyde) est préparé selon le protocole décrit dans l'article suivant : F. Nepveu *et al.,* J. Med. Chem., 2010, 53, 699-714.

(masse moléculaire = 301.7 $g.mol^{-1}$, Log P = 2.09 calculé avec l'outil informatique VCCLAB (www.virtuallaboratory.org)). La préparation nécessite de l'acétone (qualité HPLC), du PBS (tampon phosphate salin) et de l'albumine humaine (HSA), (essentiellement dépourvue d'acides gras, masse moléculaire = 66 478 $g.mol^{-1}$), achetés chez Sigma-Aldrich (St. Quentin, France).

Toutes les solutions aqueuses sont préparées en utilisant de l'eau distillée haute pureté obtenue via un système de purification d'eau Milli-Q® (Millipore, St. Quentin, France). La dissolution des dérivés d'indolone-*N*-oxyde est faite par sonication dans un bain d'ultrasons (Elma®, Germany).

Le mélange du dérivé d'indolone-*N*-oxyde et d'albumine humaine est préparé dans un ratio de 1 :5 (masse : masse) par dilution géométrique. 10 mg du dérivé d'indolone-*N*-oxyde est d'abord mélangé à 10 mg d'albumine humaine, puis 20 mg d'albumine humaine sont ajoutés puis mélangés et les 20 mg d'albumine restants sont ajoutés à la fin.

Les nanosuspensions contenant le dérivé d'indolone-*N*-oxyde et l'albumine humaine contiennent une concentration en composé de 0,5, 1, 2,5 ou 10 mg/mL. Elles sont préparées par précipitation suivie par une homogénéisation sous haute pression.

Pour la précipitation, le dérivé d'indolone-*N*-oxyde est dissout dans de l'acétone (3,3 mg/mL). L'albumine humaine est dissoute séparément dans 0,01 M de PBS (ou d'eau hautement purifiée) à une concentration de 2,5, 5, 12,5 ou 50 mg/mL pour des nanosuspensions contenant respectivement 0,5, 1, 2,5 ou 10 mg/mL de dérivé d'indolone-*N*-oxyde. La solution de dérivé d'indolone-*N*-oxyde dans l'acétone est ajoutée goutte à goutte dans la solution d'albumine humaine sous agitation magnétique (vitesse d'ajout : 1 mL/min). L'eau agit comme un antisolvant miscible pour le dérivé d'indolone-*N*-oxyde hydrophobe. L'albumine humaine incorpore le dérivé d'indolone-*N*-oxyde dans sa matrice et augmente sa mouillabilité. La suspension initiale est alors évaporée sous une pression réduite à 36 °C pendant 15 min pour éliminer l'acétone.

Pour la phase d'homogénéisation sous haute pression, la suspension initiale est homogénéisée pendant 15 cycles à 25000 psi (172368,93 kPa) en utilisant un

homogénéisateur Emulsiflex-C3- haute pression (SODEXIM S.A.S., France). Pendant l'homogénéisation, la température augmente fortement. Un échangeur de chaleur est alors utilisé pour empêcher la dégradation du dérivé d'indolone-*N*-oxyde thermolabile et s'assurer que la solution recyclée est suffisamment froide.

La nanosuspension obtenue est séchée pour augmenter la stabilité chimique de la formulation mais aussi la stabilité physique des nanoparticules.

La lyophilisation est utilisée comme méthode de séchage dans ce procédé.

Un cryoprotecteur, comme le mannitol ou le tréhalose, est habituellement ajouté avant la lyophilisation pour empêcher l'agrégation des particules après reconstitution. Dans le procédé, l'albumine sert de cryoprotecteur. Donc, aucun autre cryoprotecteur n'est ajouté.

Ensuite, 10 mL de la nanosuspension : dérivé d'indolone-*N*-oxyde/albumine humaine, est congelée à -80 °C pendant 24h, puis lyophilisé pendant 48h à -55 °C, 6 µm Hg, en utilisant un système de séchage commercialisé par Labconco. La poudre de particules est stockée à 4 °C jusqu'à utilisation.

Pour la reconstitution, 10 mL d'eau distillée hautement purifiée sont ajoutés à la poudre lyophilisée avec une agitation douce pour éviter de faire de la mousse avec l'albumine.

Exemple 2 : Analyse de la taille des nanoparticules contenant un dérivé d'indolone-*N*-oxyde et de l'albumine humaine et mesure de leur potentiel zeta

La mesure de la taille des nanoparticules et de leur potentiel Zeta est effectuée en utilisant un analyseur de particules DelsaNano C (Beckman Coulter). Les mesures sont effectuées en triplicate à 25 °C. Les analyses de polydispersité et de diamètre moyen sont basées sur une technique de spectroscopie de corrélation de photon (PCS), aussi connue sous le nom de diffusion dynamique de la lumière (DLS). Avant les mesures, la nanosuspension respectivement composée de dérivé d'indolone-*N*-oxyde et d'albumine est diluée dans de l'eau MilliQ jusqu'à l'obtention d'une intensité de diffusion appropriée (1 :100). L'angle de diffusion est 165°.

La taille des particules est exprimée en diamètre moyen pondéré en intensité en nanomètres, et la distribution des tailles de particules est exprimée en index de polydispersité (PI). Le potentiel Zeta est une mesure de la charge électrique à la surface des particules. Les hauts potentiels Zeta (> ou = à 30 mV) indiquent un système colloïde

physiquement stable, tandis que les nanosuspensions avec un faible potentiel Zeta ont tendance à floculer. Les mesures du potentiel Zeta sont basées sur la technique de la diffusion électrophorètique de la lumière (ELS). La préparation des échantillons est identique à celle pour la mesure des tailles de particules, utilisant un angle de diffusion de 15° et le champ magnétique appliqué est de 5 V. La standardisation est faite pour avoir une conductivité de 10 mS/cm en utilisant une solution aqueuse de KCl (0,582 % p/v).

Exemple 3 : analyse de la stabilité des nanoparticules comprenant un dérivé d'indolone-N-oxyde et de l'albumine humaine

La stabilité physique des nanosuspensions a été examinée pour la croissance potentielle des particules ou leur agrégation après stockage pendant 4 jours à 4 °C, en utilisant un analyseur DelsaNano C particules (Beckman Coulter, France).

La stabilité chimique du dérivé d'indolone-*N*-oxyde dans les nanoparticules a été évaluée après stockage à 4 °C des nanosuspensions pendant 4 jours et des poudres lyophilisées pendant 1 mois. 1 mg de nanoparticules est reconstitué dans 1 mL d'eau Milli-Q. 4 mL d'acétonitrile sont alors ajoutés et le mélange est soumis à une sonication et ensuite centrifugé. La quantité de composé dans le surnageant est analysée par HPLC-UV.

Aucune croissance significative de particule n'a été observée dans les nanosuspensions après 4 jours de stockage à 4 °C. L'augmentation du diamètre moyen est de 4,3% avec une bonne homogénéité (PI<0,2). La stabilité physique des nanosuspensions est principalement reflétée par l'absence de croissance des particules ou d'agrégation. Les indolones-*N*-oxydes montrent une bonne stabilité chimique dans les nanoparticules d'albumine comme dans la forme poudre (lyophilisée) ou dans les formes aqueuses. Dans le cas de la forme lyophilisée, le pourcentage de dérivé d'indolone-*N*-oxyde restant dans les particules après stockage pendant 1 mois à 4 °C est de 97,65% (± 0,66). La bonne stabilité des composés est aussi observée en suspension aqueuse après 4 jours de stockage à 4 °C, avec une moyenne de 99,73% (±0,24).

Exemple 4 : Evaluation *in vivo* de l'effet des nanoparticules comprenant un dérivé d'indolone-*N*-oxyde et de l'albumine humaine, sur des souris infectées par *Plasmodium berghei*

20 souris femelles BALB/c, âgées de 5 à 6 semaines, de 16 à 18 g (Charles River, France) sont utilisées dans un test de Peter, avec 4 groupes de 5 souris.

Procédure du test de Peter : Les globules rouges parasités sont prélevées de souris donneuses BALB/c infectées et dilués dans du sérum physiologique à raison de $5*10^7$ globules rouges parasités/mL.

Jour 0 : Les souris sont infectées par voie intrapéritonéale avec un aliquot de 0,2 mL de suspension. Les nanoparticules lyophilisées sont reconstituées dans du sérum physiologique stérile et la nanosuspension résultante est filtrée à travers un filtre de 5 µm (faible absorption de protéine). Deux heures après l'infection, les souris sont traitées par voie intraveineuse avec 0,1 mL de la nanosuspension à différentes doses : 6,25, 12,5, 25 mg/kg de poids corporel. Le groupe contrôle reçoit 0,1 mL de NaCl (0,9%) à la place.

Jours 1 à 3 : 24, 48, 72 heures post infection, les groupes expérimentaux de souris sont retraités avec la même dose et par la même voie d'administration que le jour 0 (recommandation du test de Peter).

Jour 4 : A partir du jour 4 (96 heures post-infection), des frottis de sang sont préparés quotidiennement à partir de la veine de la queue et sont marqués avec de l'éosine – bleu de méthylène. La parasitémie est déterminée microscopiquement par comptage du nombre de globules rouges infectés pour 3000 érythrocytes (si la parasitémie est > à 1%). Pour les faibles parasitémies (< 1%), 10 000 érythrocytes sont comptés. Les signes cliniques et la perte de poids des animaux sont surveillés quotidiennement.

L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel R version 2.4.1 (www.r-project.org). L'analyse de la survie est faite par le test logarithmique de Kaplan-Meier. Une différence est considérée comme significative quand la valeur P est < à 0,05.

Une différence significative du temps de survie (p=0,00236) est observée entre les souris traitées avec des nanoparticules : dérivé d'indolone-*N*-oxyde/albumine humaine versus les souris non traitées (contrôles). Cet effet est également significatif sur l'évolution de la parasitémie (Figure 1). L'analyse des données révèle des différences entre le groupe contrôle et les groupes traités avec différentes doses de nanoparticules :

dérivé d'indolone-*N*-oxyde/albumine. Dans cet essai à 4 jours, 80 % des souris du groupe contrôle meurent avec une parasitémie (86,4%) entre le jour 8 et le jour 13. Toutes les souris de groupe contrôle meurent avant le jour 19. Les souris traitées avec la plus faible dose (6,25 mg/kg) et la dose intermédiaire (12,5 mg/kg) de nanoparticules de dérivé d'indolone-*N*-oxyde/albumine humaine meurent plus tard, respectivement 80% et 60% au jour 22 avec moins de 40% de parasitémie. Toutes les souris traitées avec la dose de 25 mg/kg de nanoparticules de dérivé d'indolone-*N*-oxyde/albumine humaine restent vivantes sans parasitémie jusqu'à la fin de l'expérience, soit le jour 34. Une différence majeure est observée entre les souris contrôles et souris traitées avec 25 mg/kg de nanoparticules de dérivé d'indolone-*N*-oxyde/albumine (p=0,0017).

De précédents tests *in vivo* dans un modèle de souris infectées par *Plasmodium berghei* souche ANKA révèlent que cette formulation ne donne aucun signe de toxicité ou détresse à une dose allant jusqu'à 4x100 mg/kg. Les résultats de la présente invention montrent que dans ce même modèle, la dose de 25mg/kg/jour est curative à 100% (Tableau 1). Les souris sans parasitémie à 30 jours sont guéries. Les nanoparticules de dérivé d'indolone-*N*-oxyde/albumine humaine montrent une ED50 estimée à 7,66 mg/kg avec une erreur standard à 0,96, une valeur légèrement supérieure à celle rapportées pour l'artésunate (5,9 mg/kg) et la chloroquine (1,8 mg/kg). De plus, la ED90/ED50 est de 2,96 ce qui reflète une bonne réponse à l'activité du dérivé d'indolone-*N*-oxyde en fonction de la dose (ED90 est de 22,65 mg/kg avec une erreur standard de 1,19). De manière intéressante, cette formulation est plus efficace que l'artésunate et la chloroquine dans le prolongement du temps de survie (8,2 jours et 17 jours pour artésunate et chloroquine respectivement).

Les résultats de l'activité anti-malarique *in vivo* du dérivé d'indolone-*N*-oxyde formulé (nanoparticules) ou non formulé testé sur des souris infectées avec *P. berghei* selon le test de Peter est présentée dans le Tableau 1 ci-dessous :

Composé	Dose	Pourcentage d'inhibition de la parasitémie à jour 4	Survie moyenne (jours)
Dérivé d'indolone-*N*-oxyde : 6-(4-chlorophenyl)-7H-[1,3]dioxolo [4,5-f]indol-7-one-5-oxyde, non formulé	30 mg/kg/4 jours *(voie orale)*	14.5	-
Dérivé d'indolone-*N*-oxyde : 6-(4-chlorophenyl)-7H-[1,3]dioxolo [4,5-f]indol-7-one-5-oxyde, non formulé	30 mg/kg/4 jours *(voie intrapéritonéale)*	62.1	-
Nanoparticules d'indolone-*N*-oxyde : 6-(4-chlorophenyl)-7H-[1,3]dioxolo [4,5-f]indol-7-one-5-oxyde /HSA (Human Serum Albumin)	25 mg/kg/4 jours *(voie intraveineuse)*	99.1	> 34
Dérivé d'indolone-*N*-oxyde : 2-(4-Dimethylamino-phenyl)-5-methoxy-indol-3-one, non formulé	Non testé car pas assez soluble dans l'eau		
Nanoparticules d'indolone-N-oxyde : 2-	a) 25 mg/kg/4 jours *(voie intraveineuse)*	95%	

(4-Dimethylamino-phenyl)-5-methoxy-indol-3-one /HSA (Human Serum Albumin)	b) 50 mg/kg /4 jours *(voie intraveineuse)*	100%	
Nanoparticules d'indolone-N-oxyde : 2-(4-Dimethylamino-phenyl)-5-methoxy-indol-3-one /HSA (Human Serum Albumin)	a) 25 mg/kg/4 jours *(voie intrapéritonéale)* b) 50 mg/kg /4 jours *(voie intrapéritonéale)*	99.18% 98.9%	
Chloroquine	10 mg/kg/4 jours *(voie intraveineuse)*	99	17
Chloroquine	30 mg/kg/4 jours *(voie intrapéritonéale)*	100	26
Nanoparticules d'artémisinine /HSA (Human Serum Albumin)	25 mg/kg/4 jours *(voie intraveineuse)*	97.5	
Artésunate	10 mg/kg/3 jours (*voie orale)*	99.1	8.2
Artésunate	3.2 mg/kg/4 jours *(voie intraveineuse)*	58	11.7
Artésunate	6.4 mg/kg/4 jours *(voie intraveineuse)*	87	12.4

Tableau 1.

De plus, les nanoparticules de dérivé d'indolone-*N*-oxyde/albumine permettent une administration par voie intraveineuse des indolones-*N*-oxydes, ce qui était avant impossible en raison de leur solubilité limitée.

Les formulations commerciales d'artésunate entraînent seulement 58% d'inhibition de la parasitémie à une dose de 3,2 mg/kg et 87% d'inhibition de parasitémie à une dose de 6,4 mg/kg. De plus, les recrudescences sont observées pour les deux doses et la survie n'excède pas 20 jours. Pour les nanoparticules de dérivé d'indolone-*N*-oxyde/albumine décrites, il n'y a pas de recrudescence et le temps de survie dépasse 34 jours.

Exemple 5 : Evaluation *in vivo* de l'effet des nanoparticules comprenant un dérivé d'indolone-*N*-oxyde et de l'albumine humaine, sur des souris « humanisées » infectées par *Plasmodium falciparum*

Des souris NSG âgées de 9 à 11 semaines (Charles River, US) sont utilisées pour obtenir une infection *in vivo* par *P. falciparum*.

Des globules rouges humains sont obtenus à partir de donneurs sans historique de malaria (Etablissement Français du Sang, Rungis, France). Les globules rouges humains sont lavés deux fois avec du milieu RPMI-1640 (Gibco/BRL) et centrifugés à 900 tpm, 10 min à 25 °C. Le surnageant est éliminé et les globules rouges humains sont resuspendus dans du milieu RPMI-1640 et conservés à 4°C pendant maximum 2 semaines. Avant utilisation, les globules rouges humains sont de nouveau lavés deux fois et centrifugés à 900 tpm, pendant 10 min à 25°C dans du milieu RPMI-1640.

Les souris NSG « humanisées » pour les globules rouges sont infectées avec la souche 3D7 de *P. falciparum* suivant le protocole décrit dans l'article suivant : Moreno *et al.*, Int. J. Parasitol. 2006, 36, 361-369.

La déplétion des tissus en macrophages est induite par du clodronate fournis par Roche Diagnostic et encapsulés en liposomes de clodronate comme décrit dans l'article suivant : Van Rooijen *et al.*, J. Immunol. Methods, 1994, 174, 83-93.

Au jour 0, chaque souris reçoit une injection intra péritonéale avec une dose de 10 mg/kg de cet anticorps NIMP-R14, mélangé avec 300 µg de liposomes de clodronate.

Au jour 2, 4 et 6, chaque souris reçoit, en intrapéritonéale, 0,5 mL de globules rouges humains mélangés avec une dose de 10mg/kg d'anticorps NIMP-R14 et 300 µg de liposomes de clodronate.

Au jour 8, chaque souris est injectée avec 0,5 mL de globules rouges humains infectés par *P. falciparum* à une parasitémie de 0,3%, mélangés avec une dose de 10 mg/kg d'anticorps NIMP-R14 et 300 µg de liposome de clodronate. Après l'infection à *P.*

falciparum, une dose de 10 mg/kg d'anticorps NIMP-R14 et 150 µg de liposomes de clodronate est injectée tous les 2 à 3 jours. L'hématocrite et la greffe des globules rouges humains dans le sang périphérique de la souris sont suivis pendant tout l'essai dans des échantillons de sang prélevés sur la queue. Après une infection à *P. falciparum*, la greffe de globules rouges humains est effectuée tous les 2 à 3 jours excepté pour les souris pour lesquelles l'hématocrite est supérieur à 60% et le % de globules rouges humains supérieur à 60%. Ces souris seulement reçoivent un traitement immunosuppresseur et la greffe de globules rouges humains se fait lorsque l'hématocrite diminue à 50%.

Au jour 4, le traitement, démarrant au jour 7 post-infection, avec une dose de 25 mg/kg/jour de nanoparticules dérivé d'indolone-*N*-oxyde/albumine administrées par voie intraveineuse, induit une réduction significative de la parasitémie. La formulation prouve être très efficace avec une réduction de parasitémie de 97,5% mesurée le jour suivant la fin du traitement, chez toutes les souris traitées.

De plus, 67% des souris traitées survivent jusqu'à la fin de l'expérience.

Le Tableau 2 ci-dessous montre les résultats obtenus pour l'activité anti-malarique *in vivo* des nanoparticules de dérivé d'indolone-*N*-oyide/HSA testée sur des souris humanisées infectées par *P. falciparum* comparés avec les références de traitement de la malaria que sont la chloroquine et l'artésunate.

Composé	**Dose**	**Pourcentage d'inhibition de la parasitémie**
Chloroquine	15 mg/kg/4 jours (voie orale)	100
Artésunate	4 mg/kg/4 jours (voie orale)	28
Nanoparticules de dérivé d'indolone-*N*-oxyde/HSA (Human Serum Albumin)	25 mg/kg/4 jours (voie intraveineuse)	97.5

Tableau 2.

Exemple 6 : analyse de la cinétique de relargage d'un dérivé d'indolone-*N*-oxyde

Comme le montre la figure 2, la cinétique de dissolution du dérivé d'indolone-*N*-oxyde pur est relativement faible (100% dissout en 3h) avec un décalage dans le temps de 45 mn qui correspond au manque de mouillabilité du composé. Au contraire, les nanoparticules homogénéisées du dérivé d'indolone-*N*-oxyde et d'albumine montrent une rapide dissolution du dérivé d'indolone-*N*-oxyde (100% dissout en 30 mn comparé à 1.5% pour le dérivé d'indolone-*N*-oxyde pur sur la même période).

Exemple 7 : Préparation de nanoparticules comprenant de l'artémisinine et de l'albumine humaine

30 mg d'artémisinine sont dissous dans 9 mL d'éthanol (3.3mg/mL), la dissolution étant améliorée dans un bain à ultrasons. 300 mg d'albumine humaine sont dissous dans 60 mL d'eau Milli-Q dans une flasque appropriée. La solution d'artémisinine/éthanol est ajoutée délicatement à la solution d'albumine, sous agitation avec un agitateur magnétique, pour donner une solution colloïdale blanche. Cette solution est soumise à évaporation par un rotavapor pendant 30 minutes à 36 °C (pour éliminer l'éthanol).

Après évaporation complète de l'éthanol, le contenu de la flasque est transféré dans un récipient gradué et le volume est complété à 60 mL par de l'eau Milli-Q.

La suspension initiale est homogénéisée sous un gradient de pression : 5 cycles à 15 000 psi (103421,35 kPa), puis 35 cycles à 25 000 psi (172368,93 kPa). La taille des particules est mesurée après 5, 10, 15, 20, 25, 35 et 40 cycles.

50 mL sont soumis à un rapide refroidissement. L'échantillon est immergé dans l'azote liquide pendant 1h30 et immédiatement lié à un lyophilisateur.

Exemple 8 : Analyse de la taille des nanoparticules produites et mesure de leur potentiel zeta

Les mesures de la taille des nanoparticules et de leur potentiel Zeta sont effectuées en utilisant un analyseur de particules DelsaNano C (Beckman Coulter). Les mesures sont effectuées en triplicate à 25 °C. Les analyses de polydispersité et de diamètre moyen

sont basées sur une technique de spectroscopie de corrélation de photon (PCS), aussi connue sous le nom de diffusion dynamique de la lumière (DLS). Avant les mesures, la nanosuspension d'artémisinine et d'albumine est diluée dans de l'eau Milli-Q jusqu'à une intensité de diffusion appropriée (1 :100). L'angle de diffusion est 165°.

La taille des particules est exprimée en diamètre moyen pondéré en intensité en nanomètres, et la distribution des tailles de particules est exprimée en index de polydispersité (PI). Le potentiel Zeta est une mesure de la charge électrique à la surface des particules. Les hauts potentiels Zeta (> ou = à 30 mV) indiquent un système colloïde physiquement stable, tandis que les nanosuspensions avec un faible potentiel Zeta ont tendance à floculer. Les mesures du potentiel Zeta sont basées sur la technique de la diffusion électrophorétique de la lumière (ELS). La préparation des échantillons est identique à celle pour la mesure des tailles de particules, utilisant un angle de diffusion de 15° et le champ magnétique appliqué est de 5 V. La standardisation est faite pour avoir une conductivité de 10 mS/cm en utilisant une solution aqueuse de KCl (0.582 % p/v).

Exemple 9 : Analyse de la stabilité des nanoparticules comprenant de l'artémisinine et de l'albumine humaine

La stabilité physique des nanosuspensions a été examinée pour la croissance potentielle des particules ou leur agrégation après stockage des nanoparticules reconstituées pendant 4 jours à 4 °C en utilisant un analyseur DelsaNano C particules (Beckman Coulter, France).

La stabilité chimique de l'artémisinine dans les nanoparticules a été évaluée après stockage à 4 °C des nanosuspensions pendant 4 jours et des poudres lyophilisées pendant 1 mois. 1 mg de nanoparticules est reconstitué dans 1 mL d'eau Milli-Q. 4 mL d'acétonitrile sont alors ajoutés et le mélange est soumis à une sonication et ensuite centrifugé. La quantité d'artémisinine dans le surnageant est analysée par HPLC-MS.

Les nanoparticules reconstituées montrent une stabilité physique satisfaisante quand elles sont stockées à 4 °C pendant 4 jours. La croissance des particules est de 5,8% et l'index de polydispersité reste dans une gamme acceptable (<0.25). Les hautes valeurs de potentiel Zeta (- 43.8 mV) peuvent être impliquées dans cette stabilité en fournissant une répulsion électrostatique qui empêche l'agrégation des particules. L'artémisinine

montre une bonne stabilité chimique dans les nanoparticules à la fois sous forme de poudre et sous forme reconstituée.

Après stockage des nanoparticules pendant 1 mois à 4 °C, le pourcentage d'artémisinine restant dans les nanoparticules est de 98.4%. Dans la forme aqueuse reconstituée à 4 °C pendant 4 jours, l'artémisinine est détectée avec un pourcentage moyen de récupération de 96,6%.

Exemple 10 : Activité anti-malaria évaluée *in vivo* sur des souris humanisées infectées par *P. falciparum*

L'évaluation de l'activité anti-malaria in vivo des nanoparticules d'artémisinine est effectuée sur des souris humanisées.

Des souris NSG âgées de 9 à 11 semaines (Charles River, US) sont utilisées pour obtenir une infection *in vivo* à *P. falciparum*.

Des globules rouges humains sont obtenus à partir de donneurs sans historique de malaria (Etablissement Français du Sang, Rungis, France). Les globules rouges humains sont lavés deux fois avec du milieu RPMI-1640 (Gibco/BRL) et centrifugés à 900 tpm, 10 min à 25°C. Le surnageant est éliminé et les globules rouges humains sont resuspendus dans du milieu RPMI-1640 et conservés à 4°C pendant maximum 2 semaines. Avant utilisation, les globules rouges humains sont de nouveau lavés deux fois et centrifugés à 900 tpm, pendant 10 min à 25°C dans du milieu RPMI-1640.

Les souris NSG « humanisées » pour les globules rouges sont infectées avec la souche 3D7 de *P. falciparum* suivant le protocole décrit dans l'article suivant : Moreno *et al.*, *Int. J. Parasitol.,* 2006, 36, 361-369.

La déplétion des tissus en macrophages est induite par du clodronate fournis par Roche Diagnostic et encapsulés en liposomes comme décrit dans l'article suivant : Van Rooijen *et al., J. Immunol. Methods*, 1994, 174, 83-93. Les neutrophiles sont contrôlés en utilisant un anticorps monoclonal NIMP-R14. L'hybridome qui produit cet anticorps a été fourni par le Dr M. Strath (National Institute for Medical Research, London, U.K.).

Au jour 0, chaque souris reçoit une injection intra péritonéale avec une dose de 10mg/kg de cet anticorps NIMP-R14, mélangé avec 300 µg de liposomes de clodronate.

Au jour 2, 4 et 6, chaque souris reçoit, en intrapéritonéale, 0,5 mL de globules rouges humains mélangés avec une dose de 10mg/kg d'anticorps NIMP-R14 et 300 µg de liposome de clodronate.

Au jour 8, chaque souris est injectée avec 0,5 mL de globules rouges humains infectés par du *P. falciparum* à une parasitémie de 0,3%, mélangé avec une dose de 10 mg/kg d'anticorps NIMP-R14 et 300 µg de liposome de clodronate. Après l'infection à *P. falciparum*, une dose de 10 mg/kg d'anticorps NIMP-R14 et 150 µg de liposome de clodronate est injectée tous les 2 à 3 jours. L'hématocrite et la greffe des globules rouges humains dans le sang périphérique de la souris sont suivis pendant tout l'essai dans des échantillons de sang prélevés sur la queue. Après une infection à *P. falciparum*, la greffe de globules rouges humains est effectuée tous les 2 à 3 jours excepté pour les souris pour lesquelles l'hématocrite est supérieur à 60% et le % de globules rouges humains supérieur à 60%. Ces souris seulement reçoivent un traitement immunosuppresseur et la greffe de globules rouges humains se fait lorsque l'hématocrite diminue à 50%.

Le composé formulé est administré à des souris infectées par *P. falciparum* à une dose de 10 mg/kg tous les 4 jours.

Les souris humanisées sont infectées par voie intraveineuse avec le parasite humain *P. falciparum* (souche 3D7). Au jour 4, le traitement avec 10 mg/kg de nanoparticules d'artémisinine et albumine induit une réduction significative de la parasitémie (96%) mesurée après le dernier jour de la fin du traitement (Figure 5). Les souris survivent plus de 18 jours sans recrudescence (Tableau 3).

En comparaison, l'artésunate inhibe quant à lui seulement de 28% la parasitémie à une dose de 4mg/kg testé dans le même modèle (Coslédan *et al.*, 2008, PNAS 105(45) : 17579-17584).

L'activité anti-plasmodiale *in vivo* des nanoparticules d'artémisinine/HSA testées sur des souris humanisées infectées par *P. falciparum* est présentée dans le Tableau 3 ci-dessous.

Composé	Dose (mg/kg/jours)	Pourcentage d'inhibition de la parasitémie
Nanoparticules d'artémisinine/HSA	10 (voie intraveineuse)	96
Artésunate (Coslédan *et al*, 2008)	4 (voie orale)	28
Chloroquine	15 (voie orale)	100

Tableau 3.

Exemple 11 : Activité anti-malaria évaluée *in vitro* sur une souche de *P. falciparum*

La souche FcB1 de *P. falciparum* (souche résistante à la chloroquine) a été conservée dans un milieu RPMI 1640 ((BioWhittaker, Cambrex, Belgium) contenant de la L-glutamine (BioWhittaker), 25mM de HEPES (BioWhittaker), et 10 % de sérum humain (EFS, Toulouse, France). Les globules rouges parasités ont été conservés dans des fioles de culture de 25cm^2 (TPP, Switzerland) sous une atmosphère contrôlée (5% CO_2, 100% d'humidité relative) et synchronisé par une combinaison d'enrichissement magnétique suivie par la lyse du D-sorbitol. La chloroquine a été dissoute dans le milieu de culture et l'artémisinine dans l'éthanol (solutions stock : 10 mg/ml). Les solutions stocks des substances testées ont été préparées en mélangeant 1 mg de substance dans 1 ml de DMSO et en l'ajoutant à une solution de 1mg de BSA dans 1ml de milieu RPMI, ce qui donne une solution stock à 0,5 mg/ml. Pour les essais des substances, des dilutions en série des substances ont été faites dans le milieu de culture de *P. falciparum* et ajoutés dans des plaques de culture 96 puits (TPP). Pour l'évaluation de l'inhibition de croissance du Plasmodium, la culture a été placée dans des plaques 96 puits. Du [^{3}H]-Hypoxanthine (Perkin-Elmer) a été ajouté 24 h après le début de l'incubation. A la fin de l'incubation (48 h), les plaques de microtitration ont été congelées et décongelées, et chaque puit a été récolté sur du papier filtre en fibre de verre. L'incorporation de [^{3}H]-hypoxanthine a été déterminée avec un compteur β (1450-Microbeta Trilux, Wallac-PerkinElmer). Les pourcentages d'inhibition de croissance ont été tracés comme une fonction semilogarithmique de la concentration de substance testée. Les valeurs d'IC_{50} ont été déterminées par une analyse de régression linéaire sur les segments linéaires des

courbes. Dans chaque essai, les substances ont été testées en triplicats et les essais ont été répétés 3 fois. Les contrôles ont été effectués pour évaluer le background (contrôle négatif) et la croissance du parasite (contrôle positif).

La formulation de l'artémisinine et de dérivé d'indolone-N-oxyde sous forme de nanoparticules augmente l'activité *in vitro*. La formulation de l'artémisinine et de dérivé d'indolone-N-oxyde sous forme de nanoparticules a encore un meilleur effet *in vivo*. En résumé la formulation de l'artémisinine et de dérivé d'indolone-N-oxyde sous forme de nanoparticules entraîne un effet à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Le Tableau 4 ci-dessous montre les résultats obtenus pour l'activité anti-malarique *in vitro* contre *P. falciparum* de l'artémisinine et de dérivé d'indolone-N-oxyde non formulés ou sous forme de nanoparticules.

Composé	IC_{50} (FcB1) nM
Nanoparticules d'artémisinine/HSA (Human Serum Albumin)	< 3.5
Artémisinine non formulée	11.4 ± 4.6
Nanoparticules de dérivé d'indolone-*N*-oxyde : 6-(4-chlorophenyl)-7H-[1,3]dioxolo [4,5-f]indol-7-one-5-oxyde /HSA (Human Serum Albumin)	48 nM
Dérivé d'indolone-*N*-oxyde : 6-(4-chlorophenyl)-7H-[1,3]dioxolo [4,5-f]indol-7-one-5-oxyde, non formulé	75 ± 63 nM

Tableau 4.

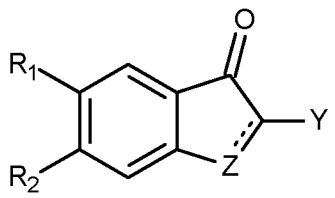
REVENDICATIONS

1- Composition comprenant un agent antipaludéen comme substance active et de l'albumine humaine en tant que transporteur, pour son utilisation comme médicament injectable sous forme de nanoparticules dans le traitement de la malaria.

2- Composition selon la revendication 1, dans laquelle la substance active est choisie parmi l'artémisinine ou les dérivés d'indolone-*N*-oxydes.

3- Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, dans laquelle la substance active est de l'artémisinine.

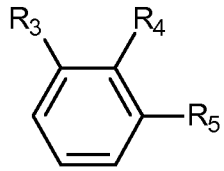
4- Composition selon l'une des revendications 1 à 2, dans laquelle la substance active est choisie parmi les composés de formule Ia:



Ia

dans laquelle :

- le ou les substituants R_1 et R_2 sont choisis indifféremment dans le groupe comprenant l'atome d'hydrogène, un halogène, notamment le chlore et le fluor, le groupement CF_3, les groupements alkyle de 1 à 3 carbones, notamment méthyle, les groupements alkyloxy de 1 à 6 carbones, notamment méthoxy, benzyloxy, les groupements $-COCH_3$, $-COOCH_3$, $-OCF_3$, NO_2, le groupement NH_2 et les groupements alkylamino,
- les deux substituants R_1 et R_2 voisins pouvant former le cycle méthylènedioxy $-O(CH_2)O-$;
- Y représente soit :
  - un groupement phényl ramifié de formule IIa



IIa

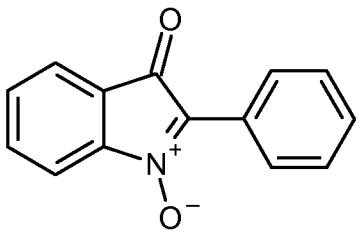
dans laquelle le ou les substituants R_3, R_4 et R_5 sont choisis indifféremment dans le groupe comprenant l'hydrogène, un halogène, notamment F, Cl, les groupements alkylfluorés notamment CF_3, les groupements alkyle à 1 à 3 carbones, les groupements alkyloxy notamment OCH_3, OCF_3, phényl-oxy, les groupements alkylamino, dialkyl ou monoalkyl, notamment $(CH_3)_2N$, $(C_2H_5)_2N$, $(C_3H_7)_2N$, $(C_3H_7)NH$ et leurs sels, les groupements NO_2, NH_2, CH_3CONH, CH_3OCO, 4-chlorophenyl, *tert*-butyl, isopropoxy, hydroxymethyl, morpholin-4-yl, butylamino,

- un groupement pyren-1-yl,
- un groupement 6'-méthoxy-naphthalen-2-yl,
- un groupement 2'-pyridinyl,
- un groupement 3'-pyridinyl, ou
- un groupement thiophen-3-yl,

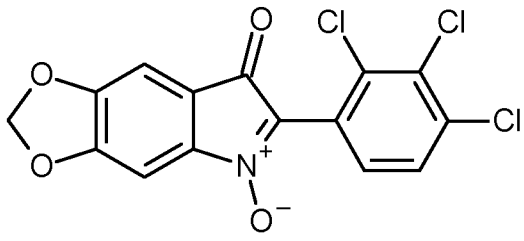
- Z représente soit :

- N^+O^-, et  correspond à une double liaison covalente, ou
- NH ou NOH, et  correspond à une simple liaison covalente,

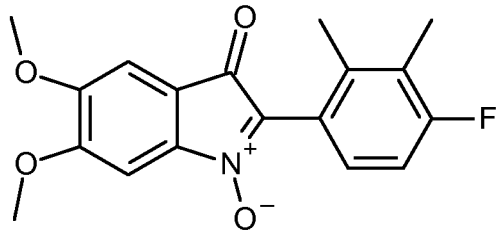
et notamment dans laquelle la substance active est choisie parmi les composés suivants :



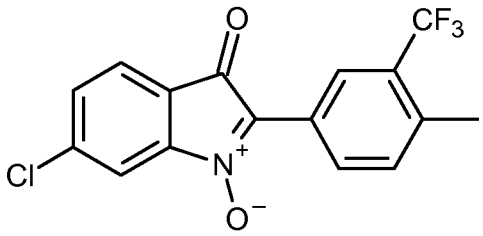
1.



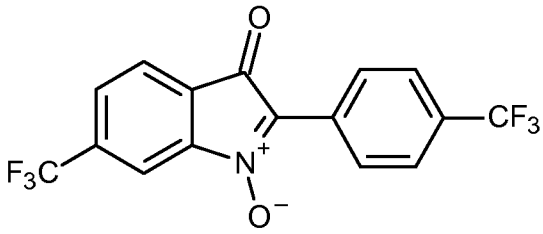
2.



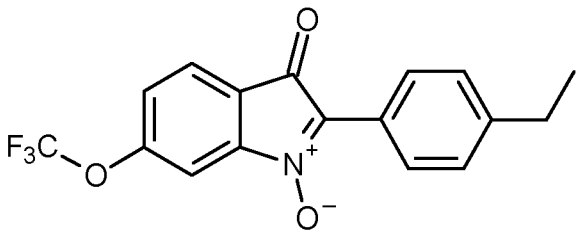
3.



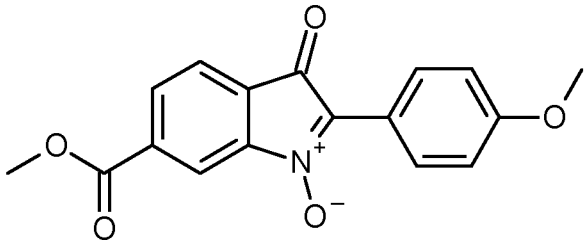
4.



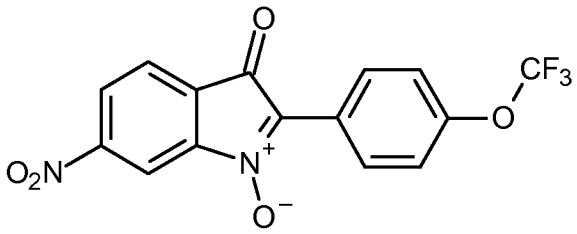
5.



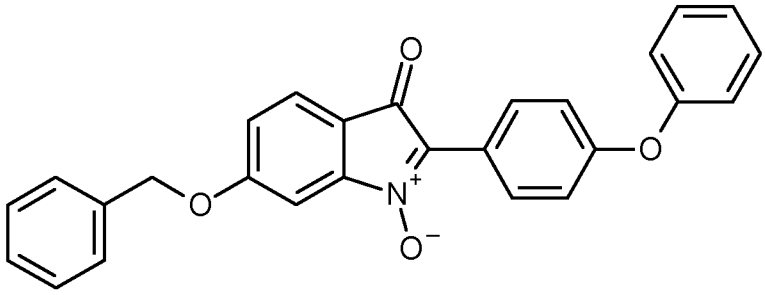
6.



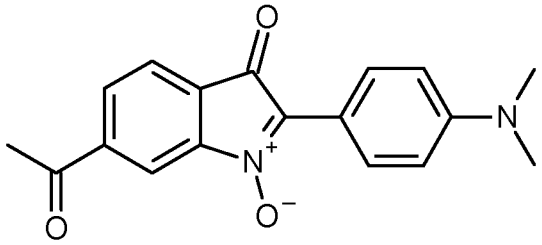
7.



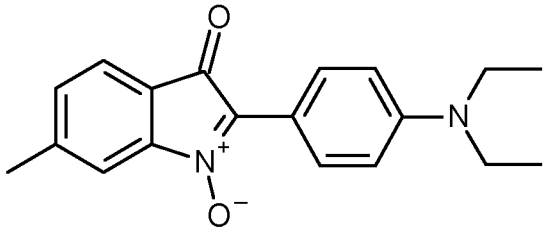
8.



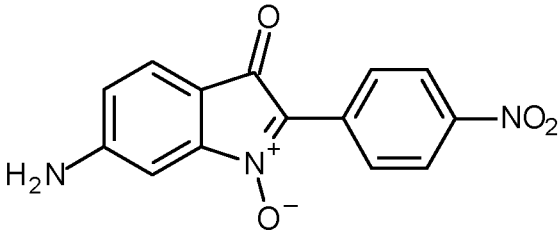
9.



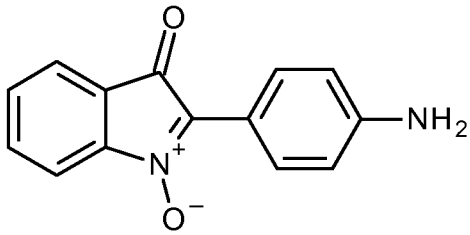
10.



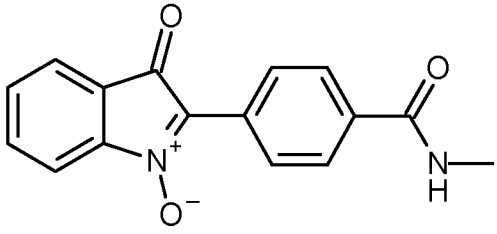
11.



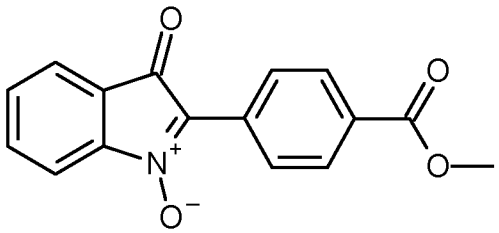
12.



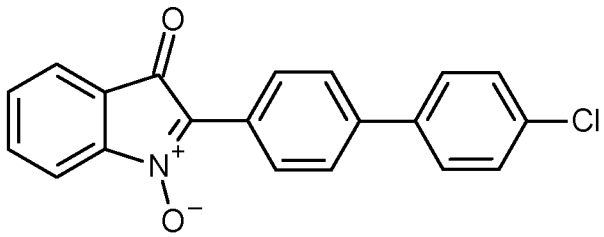
13.



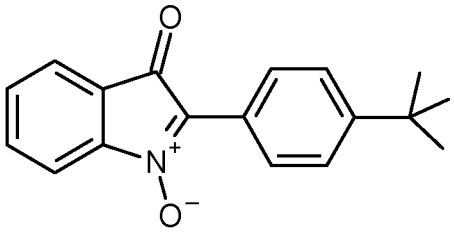
14.



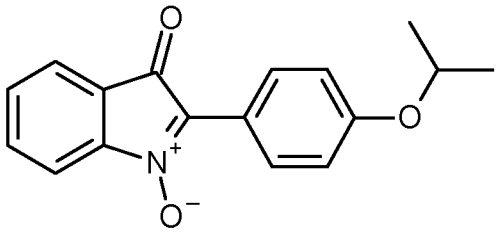
15.



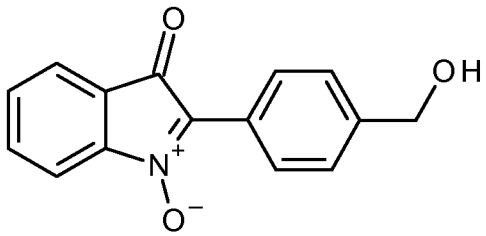
16.



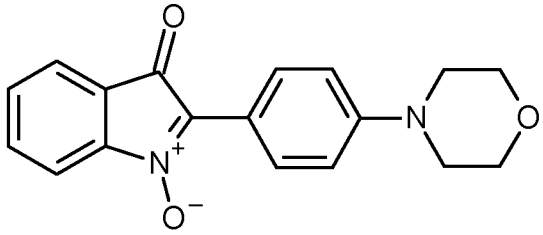
17.



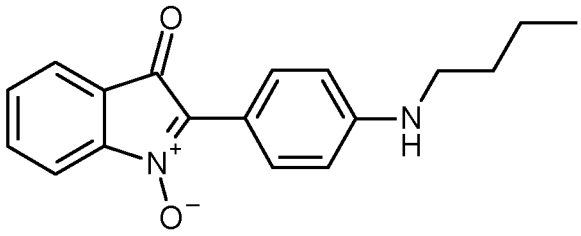
18.



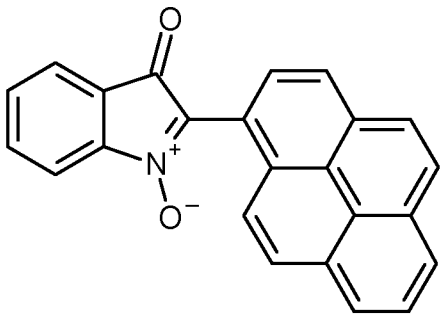
19.



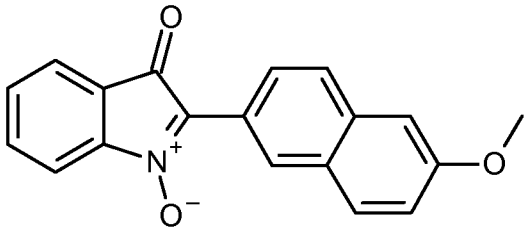
20.



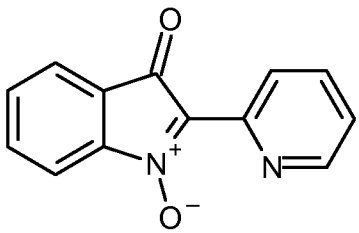
21.



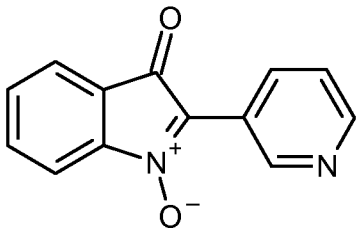
22.



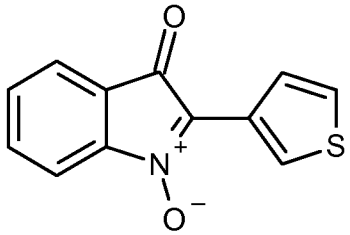
23.



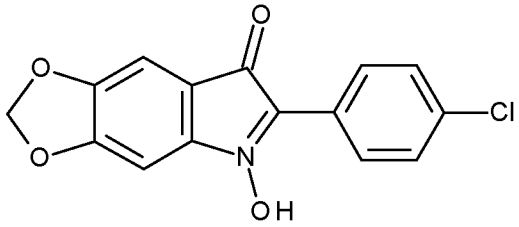
24.



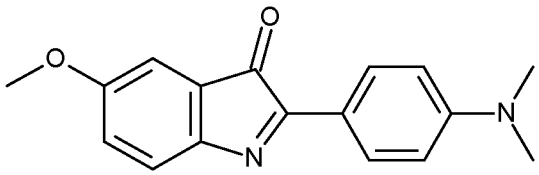
25.



26.



27.



28.

5- Composition selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle la substance active et l'albumine humaine sont présentes dans un rapport pondéral de 1 : 5 à 1 : 20.

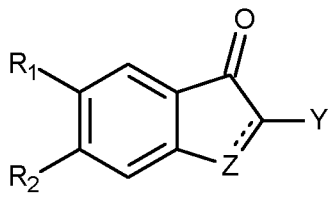
6- Composition selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle la substance active est susceptible d'être utilisée sous forme de dose unitaire de 375 à 1125 mg.

7- Composition selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle les nanoparticules ont une taille allant de 200 à 400 nm.

8- Composition pharmaceutique comprenant un agent antipaludéen comme substance active et de l'albumine humaine comme vecteur du médicament délivrant le principe actif vers les globules rouge parasités, notamment sous forme de nanoparticules, et notamment contenant à titre de substance active une molécule choisie parmi l'artémisinine ou les dérivés d'indolone-*N*-oxydes.

9- Composition pharmaceutique selon la revendication 8, dans laquelle la substance active choisie est l'artémisinine.

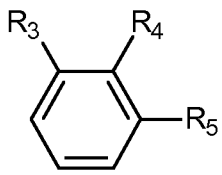
10- Composition pharmaceutique selon la revendication 8, dans laquelle la substance active est choisie parmi les composés de formule Ia:



Ia

dans laquelle :

- le ou les substituants R_1 et R_2 sont choisis indifféremment dans le groupe comprenant l'atome d'hydrogène, un halogène, notamment le chlore et le fluor, le groupement CF_3, les groupements alkyle de 1 à 3 carbones, notamment méthyle, les groupements alkyloxy de 1 à 6 carbones, notamment méthoxy, benzyloxy, les groupements $-COCH_3$, $-COOCH_3$, $-OCF_3$, NO_2, le groupement NH_2 et les groupements alkylamino,
- les deux substituants R_1 et R_2 voisins pouvant former le cycle méthylènedioxy $-O(CH_2)O-$;
- Y représente soit :
  - un groupement phényl ramifié de formule IIa



IIa

dans laquelle le ou les substituants R_3, R_4 et R_5 sont choisis indifféremment dans le groupe comprenant l'hydrogène, un halogène, notamment F, Cl, les groupements alkylfluorés notamment CF_3, les groupements alkyle à 1 à 3 carbones, les groupements alkyloxy notamment OCH_3, OCF_3, phényl-oxy, les groupements alkylamino, dialkyl ou monoalkyl, notamment $(CH_3)_2N$, $(C_2H_5)_2N$, $(C_3H_7)_2N$, $(C_3H_7)NH$ et leurs sels, les groupements NO_2, NH_2, CH_3CONH, CH_3OCO, 4-chlorophenyl, *tert*-butyl, isopropoxy, hydroxymethyl, morpholin-4-yl, butylamino,

  - un groupement pyren-1-yl,
  - un groupement 6'-méthoxy-naphthalen-2-yl,
  - un groupement 2'-pyridinyl,
  - un groupement 3'-pyridinyl, ou

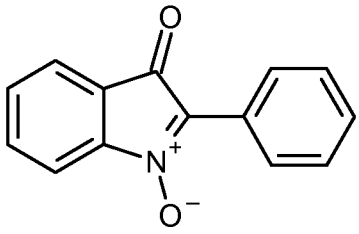
• un groupement thiophen-3-yl,

- Z représente soit :

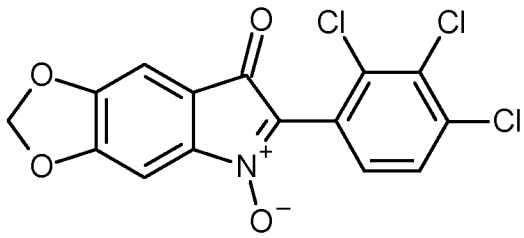
• N^+O^-, et ⁄ correspond à une double liaison covalente, ou

• NH ou NOH, et ⁄ correspond à une simple liaison covalente,

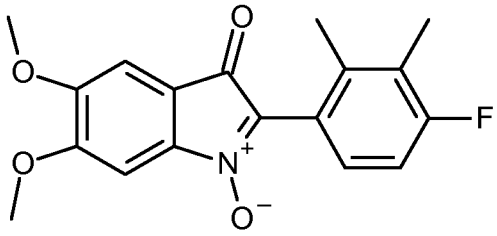
et notamment dans laquelle la substance active est choisie parmi les composés suivants :



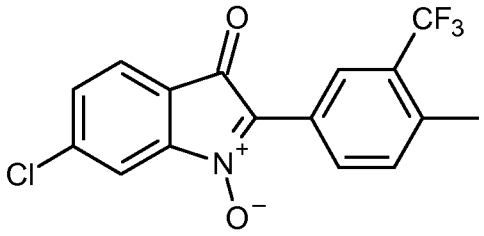
1.



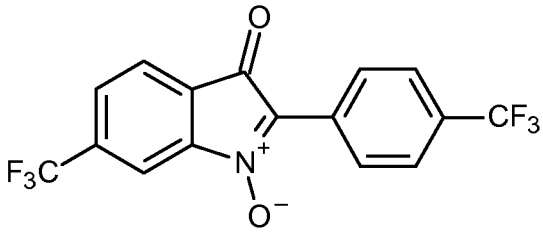
2.



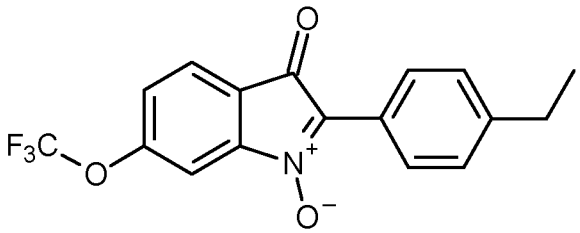
3.



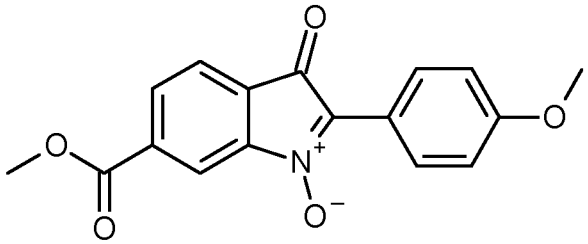
4.



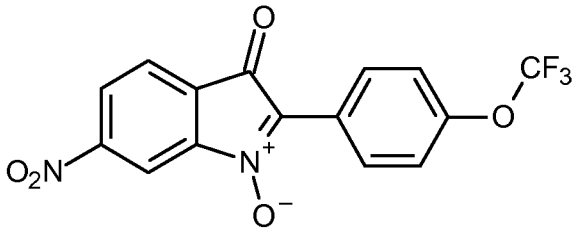
5.



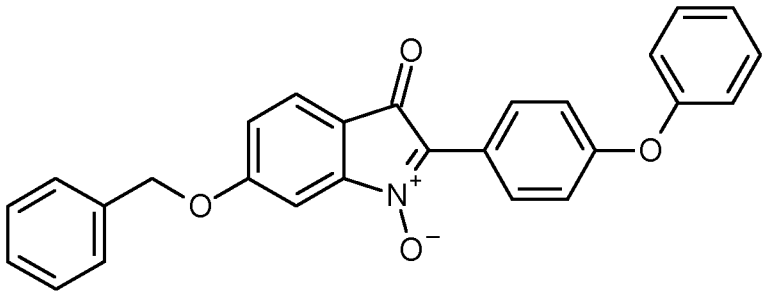
6.



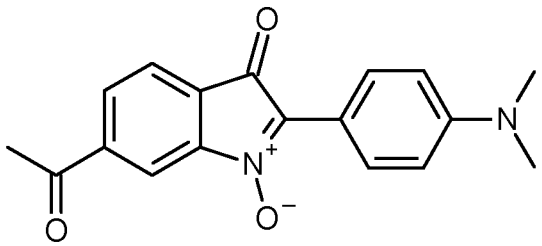
7.



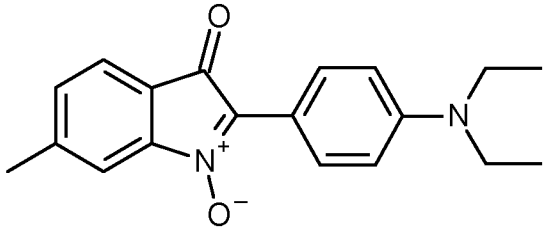
8.



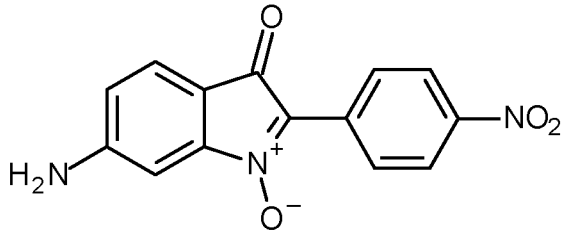
9.



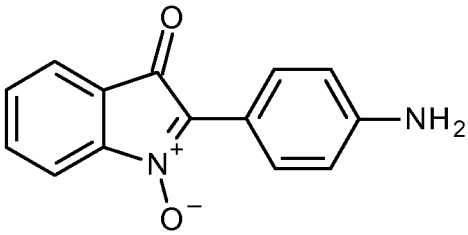
10.



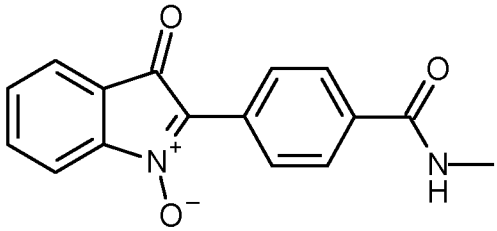
11.



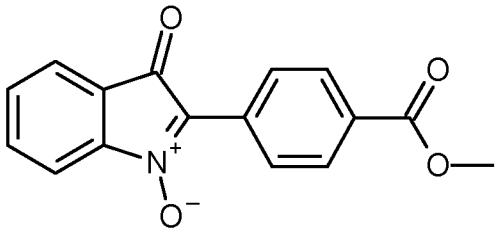
12.



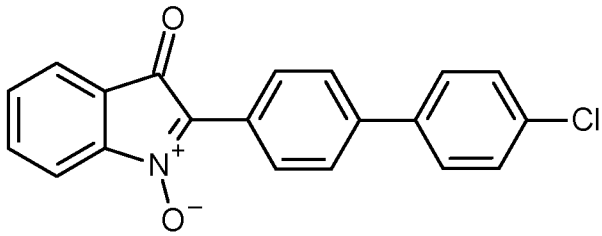
13.



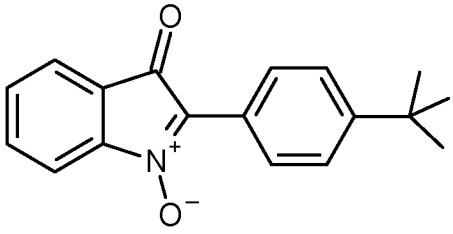
14.



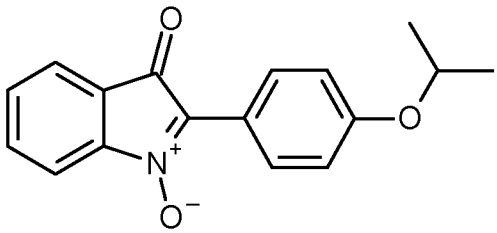
15.



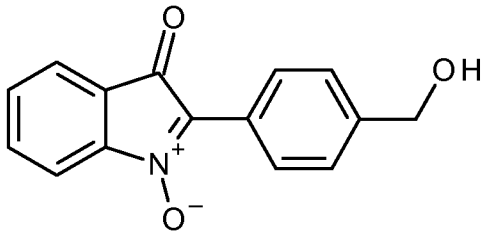
16.



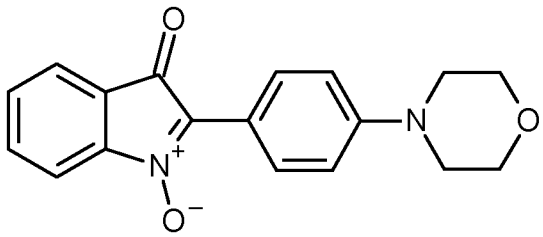
17.



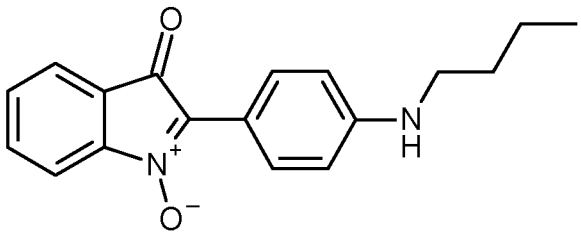
18.



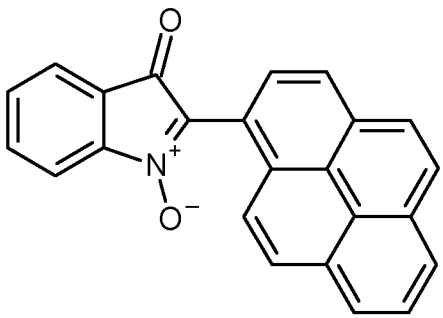
19.



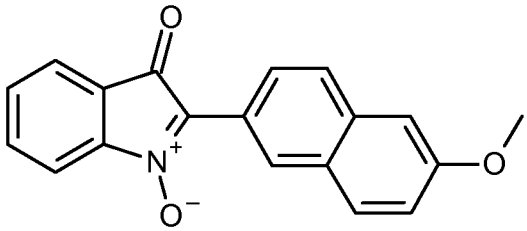
20.



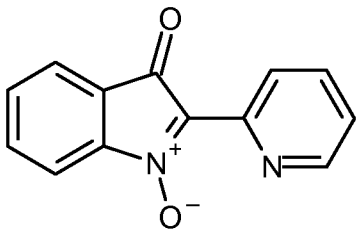
21.



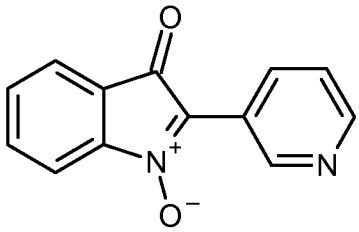
22.



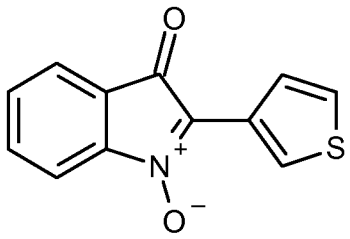
23.



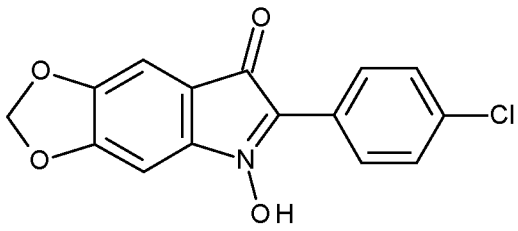
24.



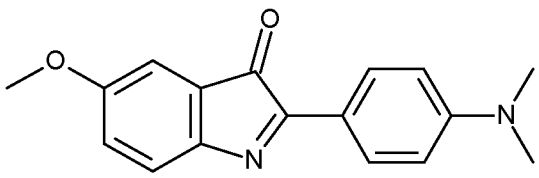
25.



26.



27.



28.

11- Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 8 à 10, dans laquelle la substance active et l'albumine humaine sont présentes dans un rapport pondéral de 1 : 5 à 1 : 20.

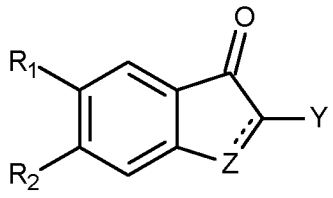
12- Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 8 à 11, dans laquelle la substance active en présence d'albumine humaine est susceptible d'être utilisée sous forme de dose unitaire de 375 à 1125 mg.

13- Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 8 à 12, se présentant sous forme de solution injectable par voie intraveineuse ou se présentant sous forme de lyophilisat.

14- Nanoparticules comprenant un agent anti-paludéen comme substance active et de l'albumine humaine, et notamment dans lesquelles la substance active est choisie parmi l'artémisinine ou les dérivés d'indolone-*N*-oxydes.

15- Nanoparticules selon la revendication 14, dans laquelle la substance active choisie est l'artémisinine.

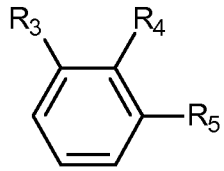
16- Nanoparticules selon la revendication 14, dans laquelle la substance active est choisie parmi les composés de formule Ia:



Ia

dans laquelle :

- le ou les substituants R_1 et R_2 sont choisis indifféremment dans le groupe comprenant l'atome d'hydrogène, un halogène, notamment le chlore et le fluor, le groupement CF_3, les groupements alkyle de 1 à 3 carbones, notamment méthyle, les groupements alkyloxy de 1 à 6 carbones, notamment méthoxy, benzyloxy, les groupements $-COCH_3$, $-COOCH_3$, $-OCF_3$, NO_2, le groupement NH_2 et les groupements alkylamino,
- les deux substituants R_1 et R_2 voisins pouvant former le cycle méthylènedioxy $-O(CH_2)O-$;
- Y représente soit :
  - un groupement phényl ramifié de formule IIa



IIa

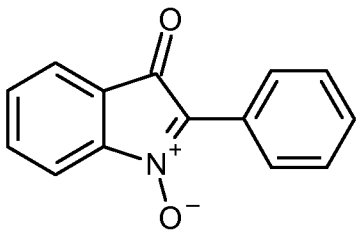
dans laquelle le ou les substituants R_3, R_4 et R_5 sont choisis indifféremment dans le groupe comprenant l'hydrogène, un halogène, notamment F, Cl, les groupements alkylfluorés notamment CF_3, les groupements alkyle à 1 à 3 carbones, les groupements alkyloxy notamment OCH_3, OCF_3, phényl-oxy, les groupements alkylamino, dialkyl ou monoalkyl, notamment $(CH_3)_2N$, $(C_2H_5)_2N$, $(C_3H_7)_2N$, $(C_3H_7)NH$ et leurs sels, les groupements NO_2, NH_2, CH_3CONH, CH_3OCO, 4-chlorophenyl, *tert*-butyl, isopropoxy, hydroxymethyl, morpholin-4-yl, butylamino,

- un groupement pyren-1-yl,
- un groupement 6'-méthoxy-naphthalen-2-yl,
- un groupement 2'-pyridinyl,
- un groupement 3'-pyridinyl, ou
- un groupement thiophen-3-yl,

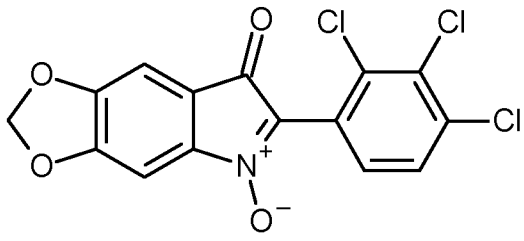
- Z représente soit :

- N^+O^-, et  correspond à une double liaison covalente, ou
- NH ou NOH, et  correspond à une simple liaison covalente,

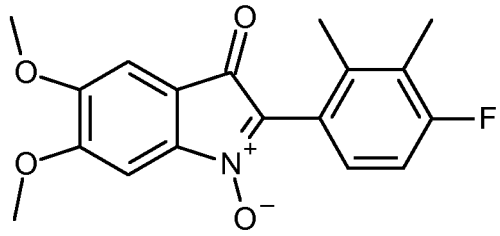
et notamment dans laquelle la substance active est choisie parmi les composés suivants :



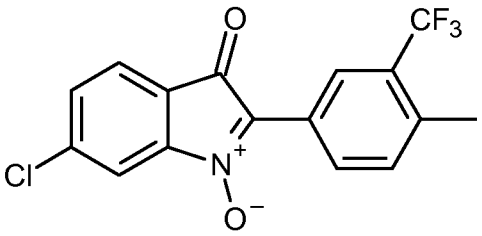
1.



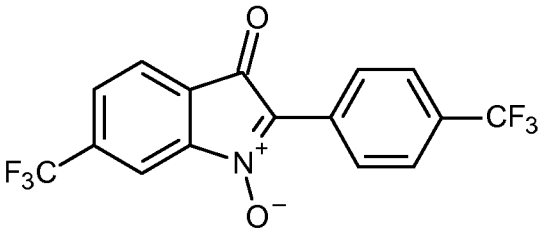
2.



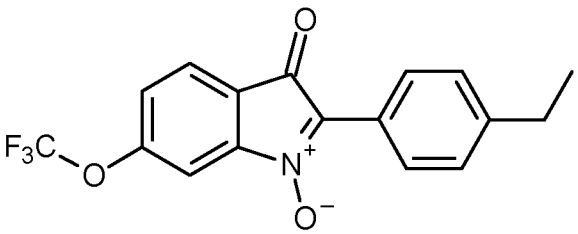
3.



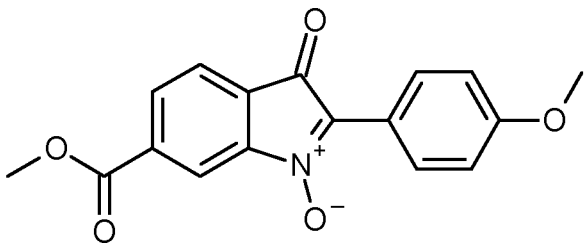
4.



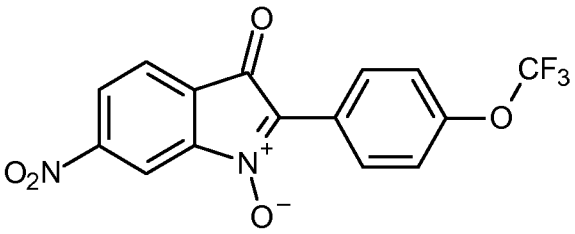
5.



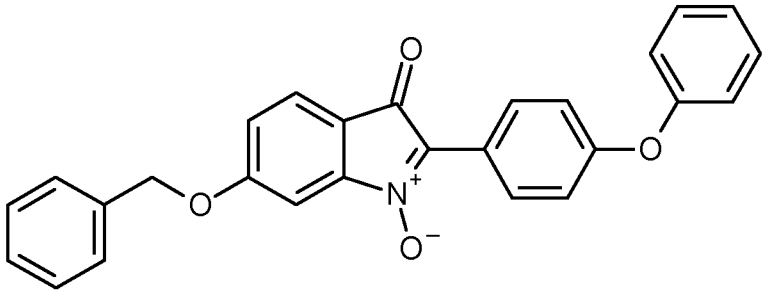
6.



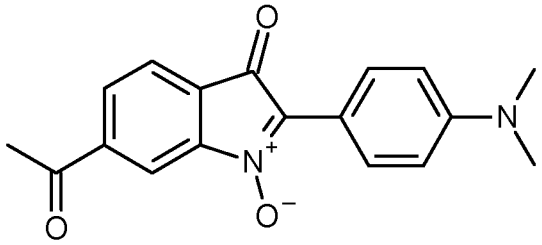
7.



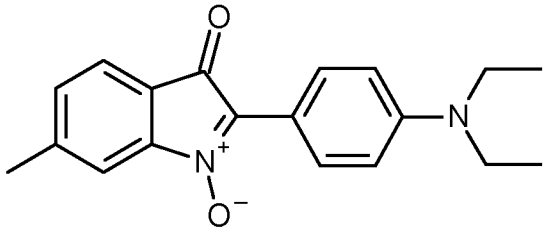
8.



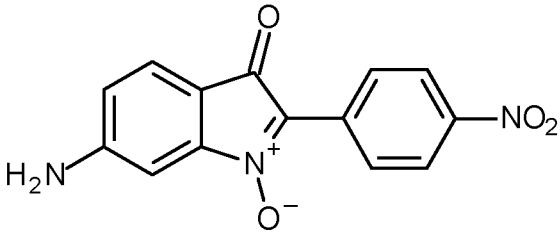
9.



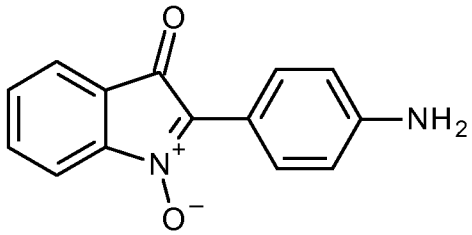
10.



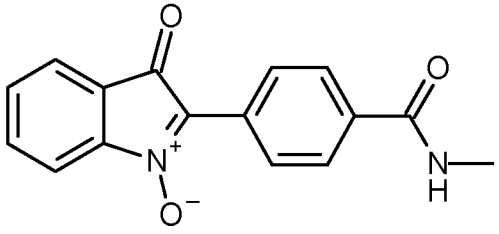
11.



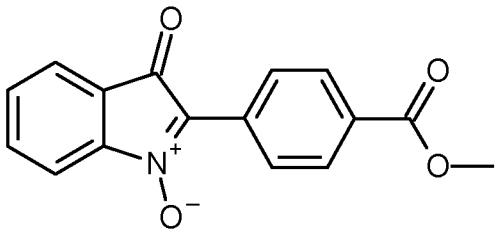
12.



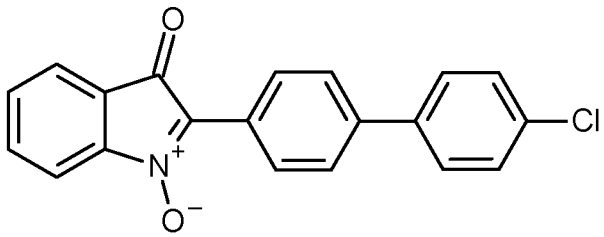
13.



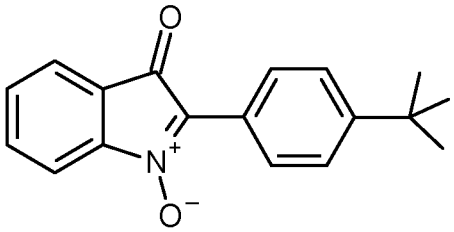
14.



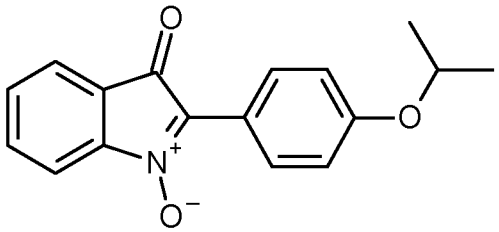
15.



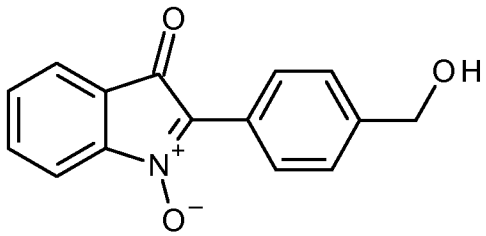
16.



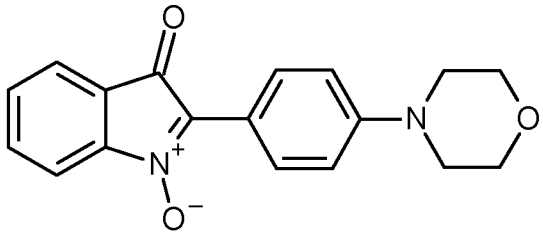
17.



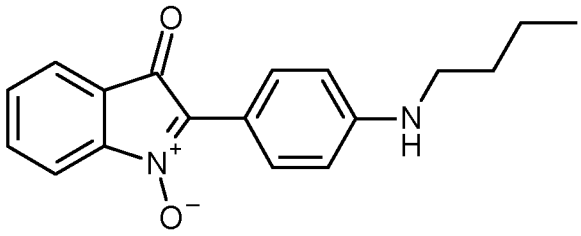
18.



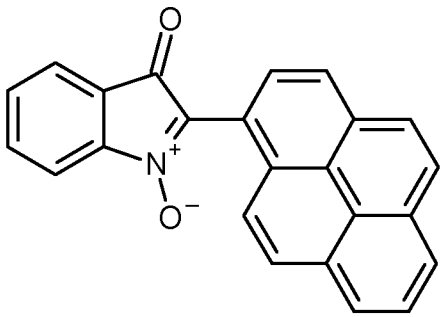
19.



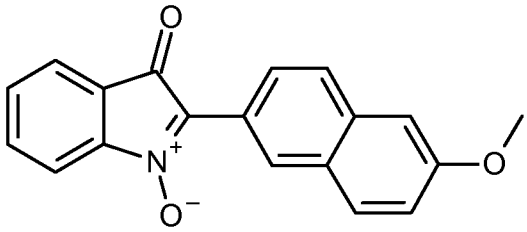
20.



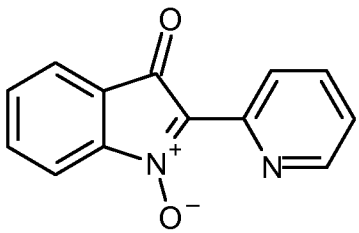
21.



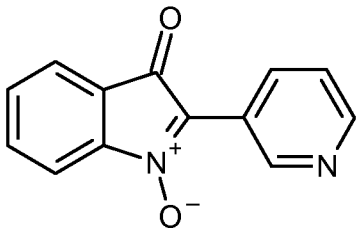
22.



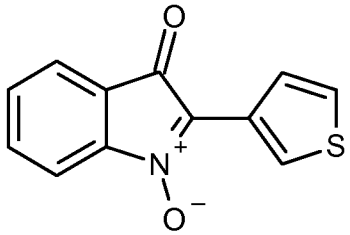
23.



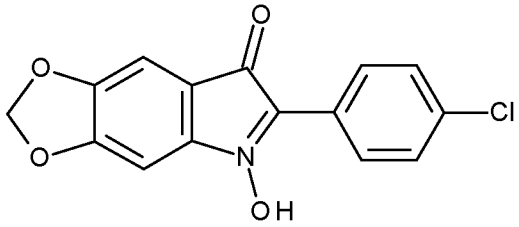
24.



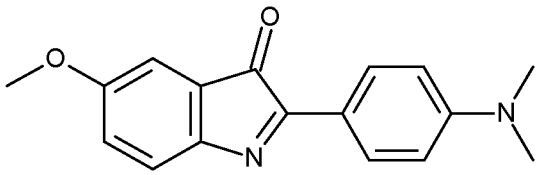
25.



26.



27.



28.

17- Nanoparticules selon la revendication 15, dans laquelle la substance active est l'artémisinine, l'artémisinine et l'albumine humaine étant présentes dans un rapport de concentration substance active : albumine allant de 1 : 5 à 1 : 10 les nanoparticules formant un ensemble substantiellement homogène avec un indice de polydispersité inférieur à 0,25 et un diamètre de particules inférieur à 350 nm.

18- Nanoparticules selon l'une des revendications 14 ou 16, dans laquelle la substance active est un dérivé d'indolone-*N*-oxydes, le dérivé d'indolone-*N*-oxydes et l'albumine humaine étant présents dans un rapport de concentration substance active : albumine allant de 1 : 5 à 1 : 20, les nanoparticules formant un ensemble substantiellement homogène avec un indice de polydispersité inférieur à 0,25 et un diamètre de particules inférieur à 330 nm.

19- Procédé de préparation de nanoparticules comprenant :

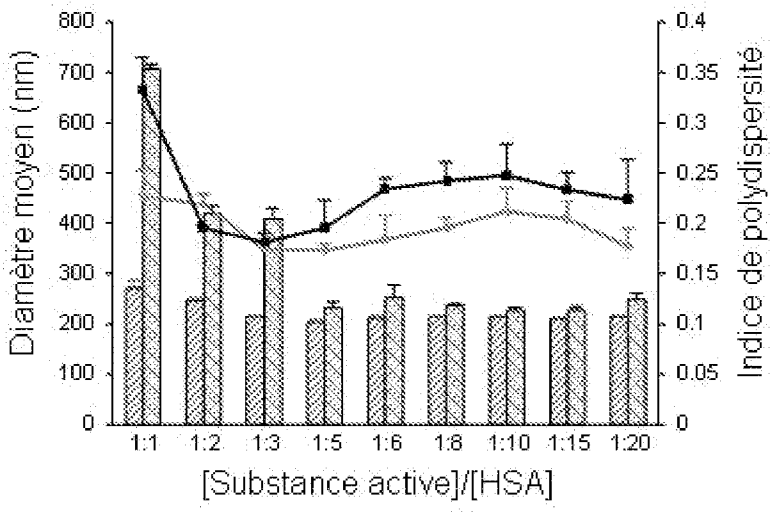
- une étape d'homogénéisation à une pression allant de 15000 à 30000 psi, d'un mélange d'un agent antipaludéen et d'albumine dissous, respectivement, dans un solvant organique et dans un solvant aqueux, pour obtenir une nanosuspension,
- une étape d'évaporation du solvant organique contenu dans la nanosuspension, pour obtenir une nanosuspension dépourvue de solvant organique,
-

- et une étape de lyophilisation de la nanosuspension dépourvue de solvant organique, pour obtenir des nanoparticules.

20- Procédé de préparation de nanoparticules selon la revendication 19, dans lequel l'agent antipaludéen est l'artémisinine,
l'artémisinine étant dissoute dans de l'éthanol, l'albumine étant dissoute dans de l'eau ou dans un tampon phosphate, et l'étape d'homogénéisation étant réalisée à 15 000 psi pendant 5 cycles, suivis de 35 cycles à 25 000 psi.

21- Procédé de préparation de nanoparticules selon la revendication 19, dans lequel l'agent antipaludéen est choisi parmi les dérivés d'indolone-*N*-oxydes, les dérivés d'indolone-*N*-oxydes étant dissous dans l'acétone, l'albumine étant dissoute dans de l'eau ou dans un tampon phosphate, l'étape d'homogénéisation étant réalisée à 25 000 psi pendant 15 cycles.

A



B

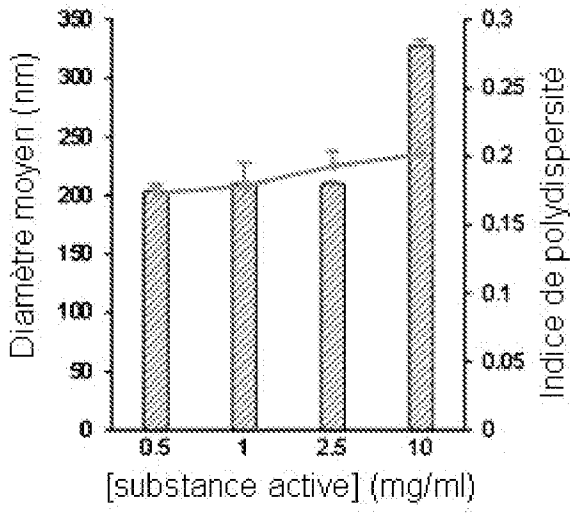
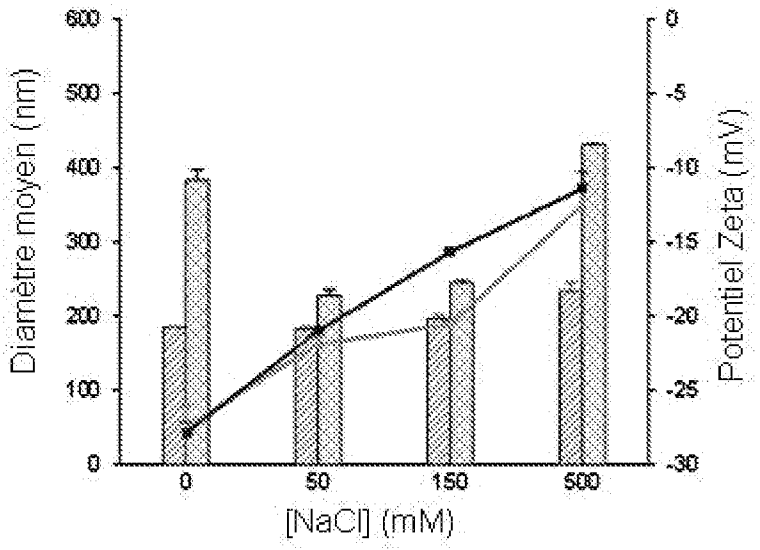


Figure 1 (début).

C



D

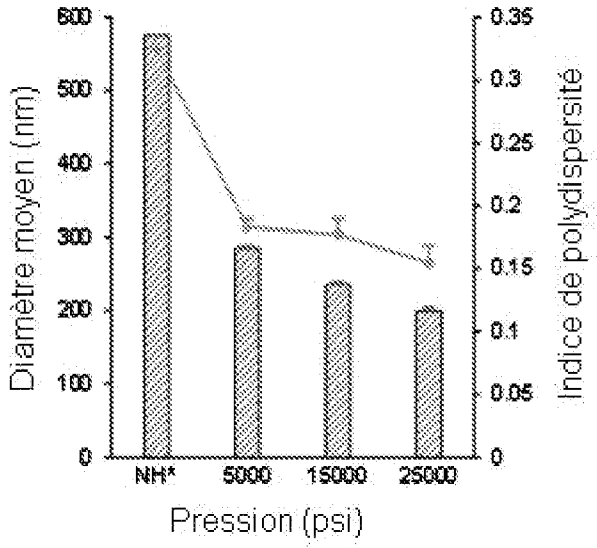


Figure 1 (suite).

E

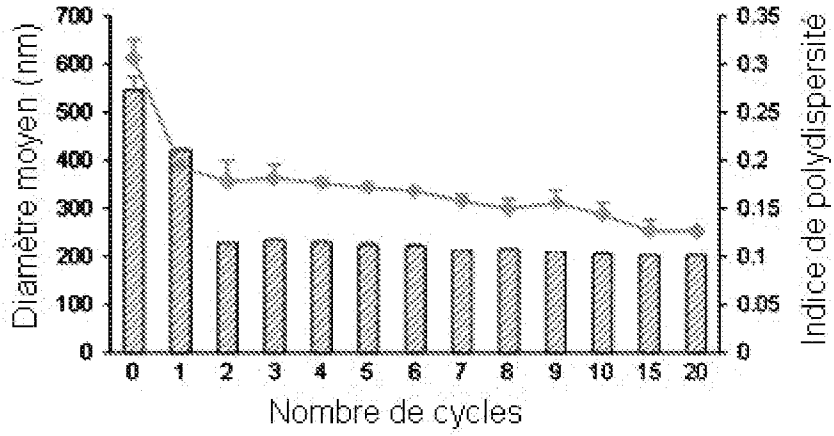


Figure 1 (fin).

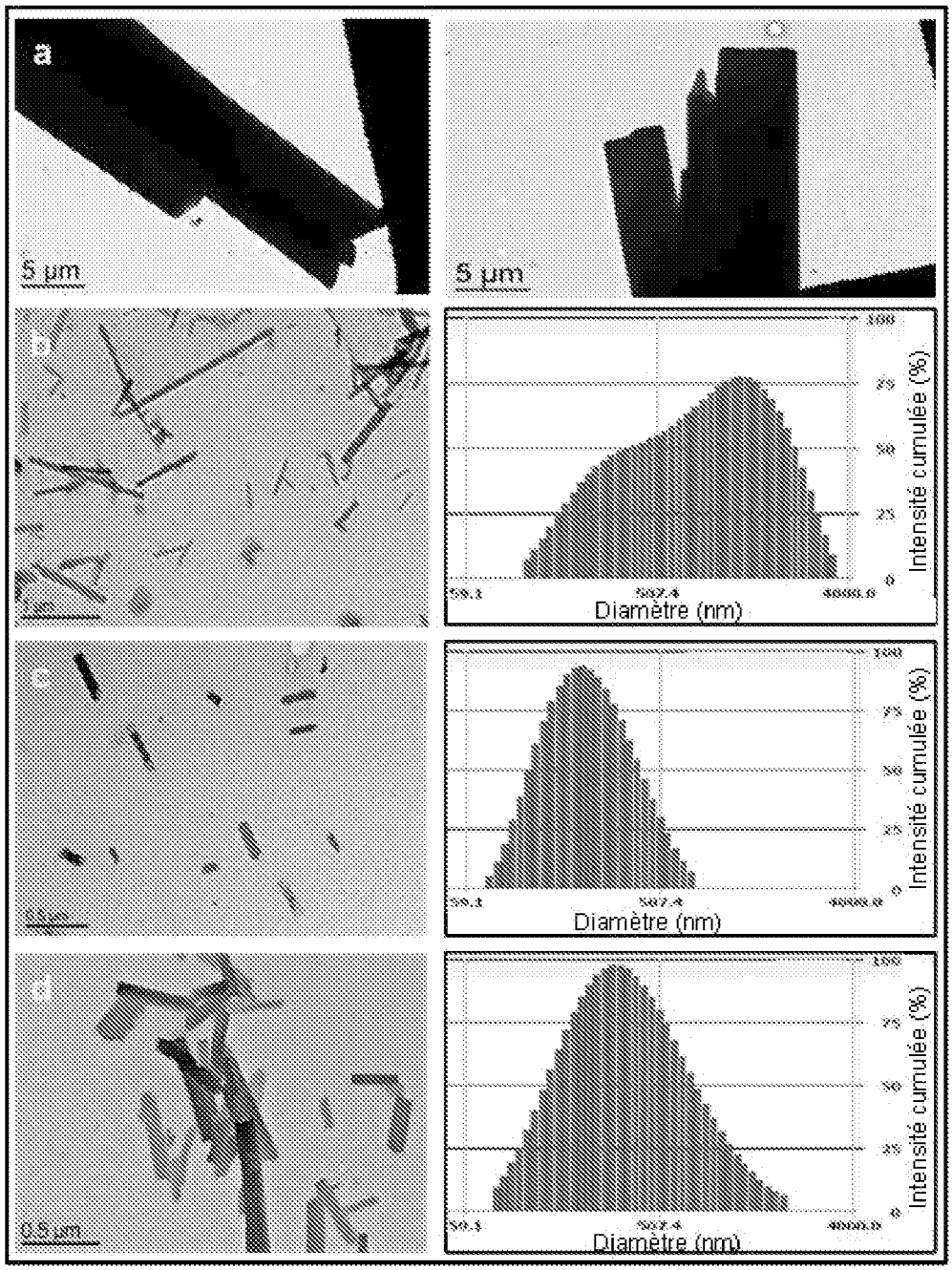

a
5 µm
5 µm
Intensité cumulée (%)
Diamètre (nm)
Intensité cumulée (%)
Diamètre (nm)
0.5 µm
Intensité cumulée (%)
Diamètre (nm)

Figure 2.

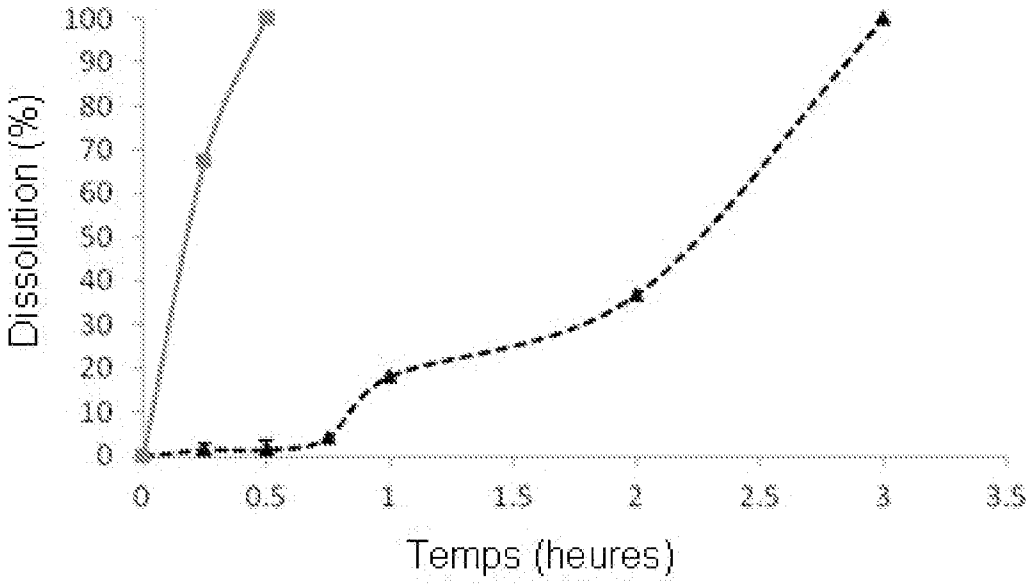

Dissolution (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
Temps (heures)

Figure 3.

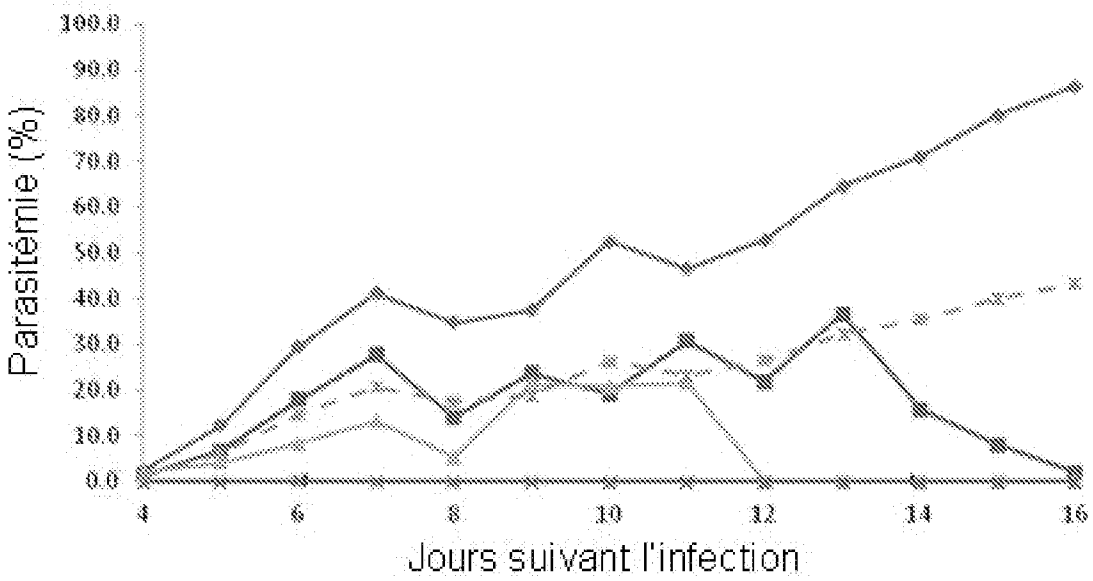

Parasitémie (%)
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
4
6
8
10
12
14
16
Jours suivant l'infection

Figure 4.

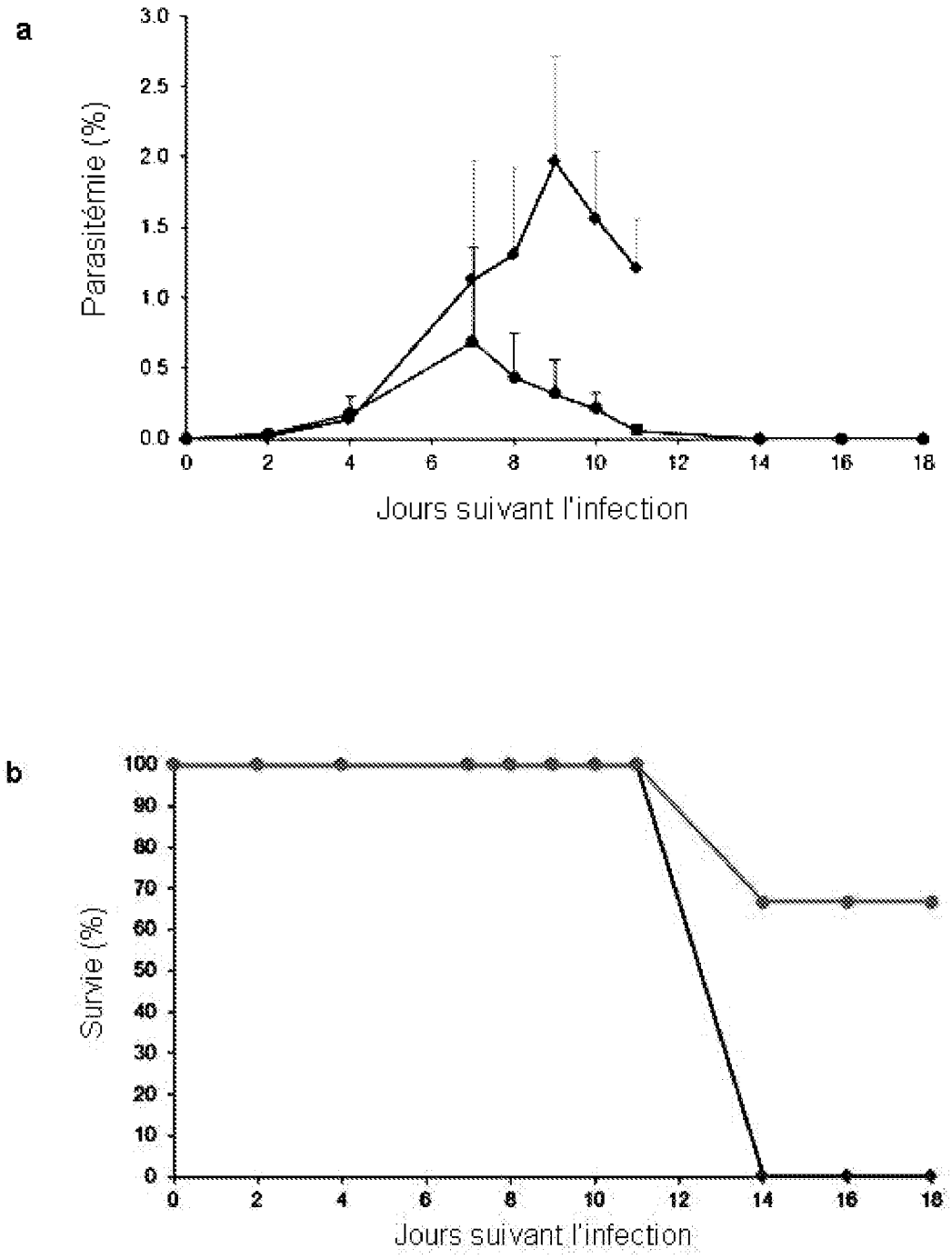

a
Parasitémie (%)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
Jours suivant l'infection
b
Survie (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
Jours suivant l'infection

Figure 5.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2014/051200

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K9/51 A61P33/06 A61K31/404 A61K31/366
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)
A61K A61P

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, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LABHASETWAR V D ET AL: "Nanoparticles - a colloidal drug delivery system for primaquine and metronidazole", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 12, no. 2, 1 April 1990 (1990-04-01), pages 113-119, XP025481010, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/0168-3659(90)90087-A [retrieved on 1990-04-01] page 114, column droite, paragraph 1 page 116; table 1 page 115, column gauche, paragraph dernier ----- -/--	1,5,6,8, 11-14

[X] 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
16 July 2014	06/11/2014

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Lemarchand, Aude

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PAYGHAN, S. A. ET AL: "Albumin microsphere containing artemisinin", PHARMACIST (BHOPAL, INDIA) , 3(2), 33-36 CODEN: PBIHAV; ISSN: 0973-8045, 2008, XP009175575, introduction; page 33 the whole document	1-3,5-9, 11-15, 17,19,20
Y	AHMED O ELZOGHBY ET AL: "Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 157, no. 2, 20 July 2011 (2011-07-20) , pages 168-182, XP028442118, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2011.07.031 [retrieved on 2011-08-01] the whole document	1-3,5-9, 11-15, 17,19,20
A	KAKRAN M ET AL: "Fabrication of drug nanoparticles by evaporative precipitation of nanosuspension", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 383, no. 1-2, 4 January 2010 (2010-01-04), pages 285-292, XP026764621, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2009.09.030 [retrieved on 2009-09-23] abstract	1-3,5-9, 11-15, 17,19,20
A	SANTOS-MAGALHAES N S ET AL: "Nanotechnology applied to the treatment of malaria", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER, vol. 62, no. 4-5, 18 March 2010 (2010-03-18), pages 560-575, XP026918000, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2009.11.024 [retrieved on 2009-11-13] the whole document page 571, paragraph 6.1.	1-3,5-9, 11-15, 17,19,20

-/--

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR2014/051200

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1. Claims 3, 9, 15, 17, 20 (in full); 1, 2, 5-8, 11-14, 19 (in part)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 3, 9, 15, 17, 20 (in full); 1, 2, 5-8, 11-14, 19 (in part)
A composition comprising an antimalarial agent as an active substance and human albumin as a carrier, intended to be used as an injectable drug in the form of nanoparticles for the treatment of malaria, wherein the active substance is artemisinin; nanoparticles comprising said active substance and albumin, and methods for preparing same.

2. Claims 4, 10, 16, 18, 21 (in full); 1, 2, 5-8, 11-14, 19 (in part)
A composition comprising an antimalarial agent as an active substance and human albumin as a carrier, intended to be used as an injectable drug in the form of nanoparticles for the treatment of malaria, wherein the active substance is selected from indolone-N-oxide derivatives of formula 1a; nanoparticles comprising said derivatives and albumin, and methods for preparing same.

3. Claim 19 (in part)
A method for preparing nanoparticles as described in claim 19.

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BECK R C R ET AL: "Spray-dried polymeric nanoparticles for pharmaceutics: A review of patents", RECENT PATENTS ON DRUG DELIVERY & FORMULATION, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS LTD, NL, vol. 6, no. 3, 1 December 2012 (2012-12-01), pages 195-208, XP009175561, ISSN: 1872-2113 bas du tableau 2 en page 19, haut du tableau 2 en page 199; pages 198-199; table 2 -----	1-3,5-9, 11-15, 17,19,20

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2014/051200

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A61K9/51 A61P33/06 A61K31/404 A61K31/366
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)
A61K A61P

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

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LABHASETWAR V D ET AL: "Nanoparticles - a colloidal drug delivery system for primaquine and metronidazole", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 12, no. 2, 1 avril 1990 (1990-04-01), pages 113-119, XP025481010, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/0168-3659(90)90087-A [extrait le 1990-04-01] page 114, colonne droite, alinéa 1 page 116; tableau 1 page 115, colonne gauche, alinéa dernier ----- -/--	1,5,6,8, 11-14

[X] 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
16 juillet 2014	06/11/2014

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

1

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	PAYGHAN, S. A. ET AL: "Albumin microsphere containing artemisinin", PHARMACIST (BHOPAL, INDIA) , 3(2), 33-36 CODEN: PBIHAV; ISSN: 0973-8045, 2008, XP009175575, introduction; page 33 le document en entier	1-3,5-9, 11-15, 17,19,20
Y	AHMED O ELZOGHBY ET AL: "Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 157, no. 2, 20 juillet 2011 (2011-07-20), pages 168-182, XP028442118, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2011.07.031 [extrait le 2011-08-01] le document en entier	1-3,5-9, 11-15, 17,19,20
A	KAKRAN M ET AL: "Fabrication of drug nanoparticles by evaporative precipitation of nanosuspension", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 383, no. 1-2, 4 janvier 2010 (2010-01-04), pages 285-292, XP026764621, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2009.09.030 [extrait le 2009-09-23] abrégé	1-3,5-9, 11-15, 17,19,20
A	SANTOS-MAGALHAES N S ET AL: "Nanotechnology applied to the treatment of malaria", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER, vol. 62, no. 4-5, 18 mars 2010 (2010-03-18), pages 560-575, XP026918000, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2009.11.024 [extrait le 2009-11-13] le document en entier page 571, alinéa 6.1.	1-3,5-9, 11-15, 17,19,20

-/--

Demande internationale n°
PCT/FR2014/051200

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Cadre n°. II Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Le rapport de recherche internationale n'a pas été établi en ce qui concerne certaines revendications conformément à l'article 17.2)a) pour les raisons suivantes :

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration chargée de la recherche internationale n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir :

2. ☐ Les revendications n^{os} parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectueé, en particulier :

3. ☐ Les revendications n^{os} parce qu'elles sont des revendications dépendantes et ne sont pasrédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre n°. III Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

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

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles exigées ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. ☐ Comme toutes les revendications qui se prêtent à la recherche ont pu faire l'objet de cette recherche sans effort particulier justifiant des taxes additionnelles, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucunes taxes de cette nature.

3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}:

4. ☒ Aucunes taxes additionnelles demandées n'ont été payées dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}:
3, 9, 15, 17, 20(complètement); 1, 2, 5-8, 11-14, 19(en partie)

Remarque quant à la réserve

☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant et, le cas échéant, du paiement de la taxe de réserve.

☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant mais la taxe de réserve n'a pas été payée dans le délai prescrit dans l'invitation.

☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

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

1. revendications: 3, 9, 15, 17, 20(complètement); 1, 2, 5-8, 11-14, 19(en partie)

   Composition comprenant un agent antipaludéen comme substance active et de l'albumine humaine en tant que transporteur, pour son utilisation comme médicament injectable sous forme de nanoparticules dans le traitement de la malaria, dans laquelle la substance active est l'artémisinine; nanoparticules comprenant cette substance active et de l'albumine et leur procédés de préparation.

   ---

2. revendications: 4, 10, 16, 18, 21(complètement); 1, 2, 5-8, 11-14, 19(en partie)

   Composition comprenant un agent antipaludéen comme substance active et de l'albumine humaine en tant que transporteur, pour son utilisation comme médicament injectable sous forme de nanoparticules dans le traitement de la malaria, dans laquelle la substance active est choisie parmi les dérivés d'indolone-N-oxydes de formule Ia; nanoparticules comprenant ces dérivés et de l'albumine et leur procédés de préparation.

   ---

3. revendication: 19(en partie)

   Procédé de préparation de nanoparticules tel que décrit dans la revendication 19.

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	BECK R C R ET AL: "Spray-dried polymeric nanoparticles for pharmaceutics: A review of patents", RECENT PATENTS ON DRUG DELIVERY & FORMULATION, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS LTD, NL, vol. 6, no. 3, 1 décembre 2012 (2012-12-01), pages 195-208, XP009175561, ISSN: 1872-2113 bas du tableau 2 en page 19, haut du tableau 2 en page 199; pages 198-199; tableau 2 -----	1-3,5-9, 11-15, 17,19,20

1