

(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
31 août 2006 (31.08.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/090029 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07H 19/073 (2006.01) **A61K 31/706** (2006.01)

les Roses (FR). **ROSILIO, Véronique** [FR/FR]; 12 Bis
Rue Gobert, F-75011 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/050488

(74) Mandataires : **LE COUPANEC, Pascale** etc.; NONY &
ASSOCIES, 3 Rue de Penthievre, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 23 juin 2005 (23.06.2005)

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0451365 30 juin 2004 (30.06.2004) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 Rue Michel Ange, F-75794 Paris
Cedex 16 (FR). **UNIVERSITE PARIS-SUD** [FR/FR];
15, avenue Georges Clemenceau, F-91405 ORSAY (FR).

(71) Déposants et

(72) Inventeurs : **STELLA, Barbara** [IT/IT]; 168, Piazzale
Costantino Il Grande, I-10134 Torino (IT). **CATTEL,**
Luigi [IT/IT]; 49, Strada del Fioccardo, I-10133 Torino
(IT). **ROCCO, Flavio** [IT/IT]; 45/4, Viale Kennedy,
I-10042 Nichelino (to) (IT).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **COU-**
VREUR, Patrick [FR/FR]; 1 Bis Rue du Lac Lé-
man, F-91140 Villebon-sur-Yvette (FR). **RENOIR,**
Jack-Michel [FR/FR]; 6 Villa les Roses, F-94240 L'Hay

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

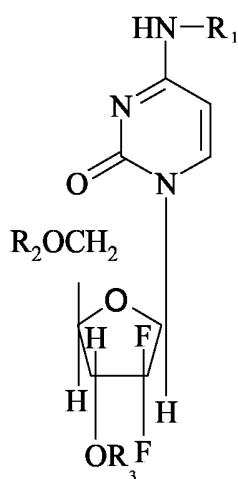
Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: GEMCITABINE DERIVATIVES NANOPARTICLES

(54) Titre : NANOPARTICULES DE DERIVES DE LA GEMCITABINE



(57) Abstract: The invention concerns a 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine derivative of general formula (I), wherein: R₁, R₂ and R₃, identical or different, represent independently of one another, a hydrogen atom or an at least C₁₈ hydrocarbon acyl radical and of such conformation that it is capable of providing said compound of general formula (I), a compacted form in a polar solvent medium, at least one of groups R₁, R₂ and R₃ being other than a hydrogen atom.

(I) (57) Abrégé : La présente invention concerne un dérivé de 2',2'-difluoro-2'-désoxycytidine de formule générale (I) : dans laquelle : R₁, R₂ et R₃, identiques ou différents, représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un radical acyle hydrocarboné au moins en C₁₈ et de conformation telle qu'il est capable de conférer audit composé de formule générale (I), une forme compactée dans un milieu solvant polaire, l'un au moins des groupements R₁, R₂ et R₃ étant différent d'un atome d'hydrogène.

WO 2006/090029 A1

Nanoparticules de dérivés de la gemcitabine

La présente invention vise à proposer de nouveaux dérivés de la 2',2'-difluoro-2'-désoxycytidine (gemcitabine) particulièrement intéressants pour leur aptitude à s'organiser à l'état de nanoparticules.

5

La gemcitabine est un agent anti-cancéreux, analogue de la désoxycytidine, actif contre les tumeurs solides de type cancer du colon, du poumon, du pancréas, du sein, de la vessie, des ovaires, etc. (Hertel L.W. *et al.*, Cancer Res., 50 ; 1990, 4417-4422 et Plunkett W. *et al.*, Anticancer Drugs, 6 (Suppl. 6) ; 1995, 7-13). Sa structure chimique est
10 similaire à celle de la cytarabine (Ara-C), à l'exception de la présence de deux atomes de fluor géminaux localisés en position 2' du sucre désoxyribose. Cette différence structurale a pour effet avantageux d'accroître la lipophilie et la perméation membranaire de la molécule de gemcitabine comparativement à celle de la cytarabine, et donc de lui conférer une toxicité plus élevée (Heinemann V. *et al.*, Cancer Res., 48 ; 1988, 4024-4031).

15

Le mécanisme d'action de la gemcitabine peut être explicité comme suit.

La gemcitabine est activée au niveau intracellulaire par phosphorylation en position 5' par action de la désoxycytidine-kinase, et ainsi transformée en son dérivé triphosphate. Celui-ci est alors incorporé dans la chaîne de l'ADN en réplication avec
20 comme conséquence l'arrêt de l'élongation de la chaîne et la mort de la cellule (Plunkett W. *et al.*, Semin. Oncol., 22 (4 Suppl. 11) ; 1995, 3-10).

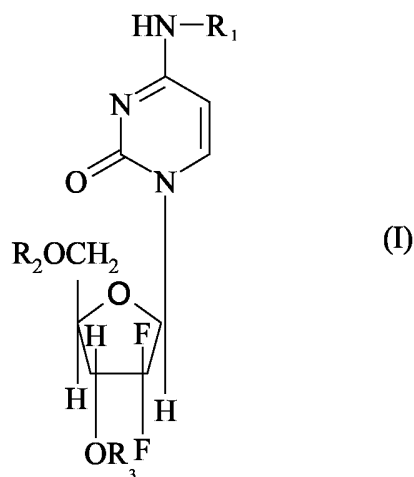
Toutefois, la gemcitabine est parallèlement métabolisée, par action de la désoxycytidine déaminase, localisée principalement dans le sang, le foie et le rein, en son dérivé uracile qui s'avère totalement inactif (Heinemann V. *et al.*, Cancer Res., 52 ; 1992, 533-539). En conséquence, lorsque la gemcitabine est administrée par voie intraveineuse,
25 elle possède une activité anticancéreuse non optimale compte tenu de sa demi-vie plasmatique significativement réduite (Storniolo A.M. *et al.*, Semin. Oncol., 24 (2 Suppl. 7) ; 1997, S7-2-S7-7).

Pour protéger la gemcitabine contre cette déamination, il a été proposé de coupler de manière covalente son radical amino en position 4 avec une chaîne acyclique.
30 Cette alternative est notamment considérée dans le brevet EP 986 570 qui décrit des esters et amides de la gemcitabine dans lesquels les groupements 3'- et/ou 5'-OH et/ou le groupement N4-aminé sont dérivatisés avec des chaînes saturées ou mono-insaturées en

C₁₈ à C₂₀. Cependant, l'augmentation d'activité anticancéreuse observée avec ces dérivés lipophiles comparativement à la gemcitabine est, dans ce cas, obtenue au détriment de leur solubilité en milieu aqueux. En effet, compte tenu de leur caractère très lipophile, ces dérivés s'avèrent difficilement compatibles avec une administration intraveineuse.

5 La présente invention a précisément pour objet de proposer de nouveaux dérivés de la gemcitabine dotés d'une activité anticancéreuse supérieure à la gemcitabine en raison d'une stabilité significative à la métabolisation et d'une demi-vie plasmatique prolongée et qui soient néanmoins compatibles avec une administration parentérale et notamment intraveineuse.

10 Plus précisément, la présente invention concerne selon un premier aspect, un dérivé de 2',2'-difluoro-2'-désoxycytidine de formule générale (I) :



dans laquelle :

15 R₁, R₂ et R₃, identiques ou différents, représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un radical acyle hydrocarboné au moins en C₁₈ et de conformation telle qu'il est capable de conférer au dit composé de formule générale (I), une forme compactée notamment de type nanoparticulaire, dans un milieu solvant polaire, l'un au moins des groupements R₁, R₂ et R₃ étant différent d'un atome d'hydrogène.

20 La présente invention concerne selon un autre de ses aspects, des nanoparticules de dérivés de gemcitabine conformes à la présente invention.

La présente invention concerne selon un autre de ses aspects, un procédé de préparation de ces nanoparticules, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la solubilisation d'un dérivé de la gemcitabine selon l'invention dans au moins un solvant organique à une concentration suffisante pour obtenir, lors de l'ajout du mélange résultant, sous agitation, à une phase aqueuse, la formation instantanée de nanoparticules dudit dérivé en suspension dans ladite phase aqueuse, et, le cas échéant,

5 - l'isolement desdites nanoparticules.

La présente invention concerne également selon un autre de ses aspects, l'utilisation de ces dérivés et nanoparticules pour la préparation d'une composition pharmaceutique dotée d'une activité anticancéreuse ou antivirale.

Elle concerne en outre une composition pharmaceutique comprenant, à titre de
10 matière active, au moins un dérivé conforme à la présente invention, notamment sous la forme de nanoparticules.

Enfin, elle concerne également l'utilisation de l'acide squalénique ou de l'un de ses dérivés pour formuler un principe actif de nature polaire avec un poids moléculaire supérieur ou égale à 100 Da, en particulier supérieur à 150 Da, plus particulièrement
15 supérieur à 200 Da, et notamment un nucléoside ou analogue à l'état de nanoparticules. Cette utilisation implique notamment le couplage, en particulier covalent, d'au moins une molécule d'acide squalénique ou de l'un de ses dérivés, à une molécule de principe actif considéré.

De manière inattendue, les inventeurs ont ainsi constaté que le couplage
20 covalent de la gemcitabine avec au moins une molécule d'un dérivé hydrocarboné, au moins en C₁₈, permettait, sous réserve que ce dérivé hydrocarboné possède une conformation apte à s'organiser sous une forme compactée dans un milieu solvant polaire, d'accéder à des nanoparticules à base de gemcitabine.

Les dérivés de gemcitabine sont avantageux à plusieurs titres.

25 De par leur caractère très hydrophobe et insoluble dans l'eau, ils sont capables de s'organiser spontanément à l'état de particules par nanoprécipitation.

Compte tenu de la faible taille de leurs particules, ils sont administrables sous la forme d'une suspension aqueuse par voie intraveineuse et donc compatibles avec la microcirculation vasculaire.

30 Les dérivés hydrocarbonés en C₁₈ considérés selon l'invention sont généralement fixés par une liaison covalente au niveau d'un groupement 3'- et/ou 5'-OH et/ou du groupement 4-amino de la gemcitabine.

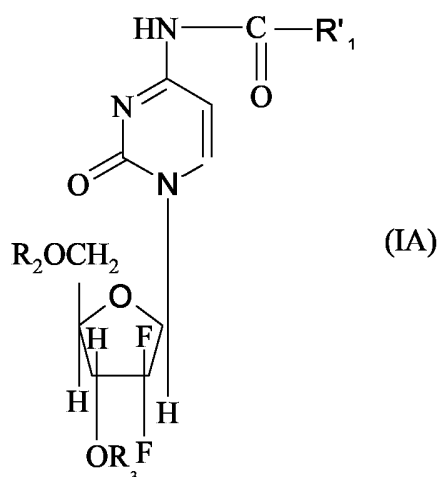
Conviennent tout particulièrement à l'invention, les dérivés hydrocarbonés acycliques, non linéaires et insaturés notamment à l'image des dérivés terpéniques comme par exemple le squalène et ses dérivés.

Avantageusement, ce dérivé hydrocarboné est un acide carboxylique. Auquel cas, cette liaison covalente est plus particulièrement de nature ester dans le cas des groupements 3' ou 5'-OH, et amide dans le cas du groupement 4-amino.

Bien entendu, les dérivés de gemcitabine selon la présente invention peuvent être des dérivés comprenant deux dérivatisations, voire trois dérivatisations, celles-ci pouvant être identiques ou différentes.

Selon une variante particulière de l'invention, les dérivés selon l'invention possèdent au moins un dérivé acyle hydrocarboné au niveau du groupement 4-amino. Il est alors figuré par le radical R_1 .

Plus particulièrement, les dérivés de gemcitabine de l'invention répondent à la formule générale (IA) :



dans laquelle R_2 et R_3 sont tels que définis précédemment et R'_1 représente un radical squalénoyle ou dérivé de celui-ci.

Au sens de l'invention, le terme dérivé de squalénoyle entend couvrir les dérivés de substitution du radical squalénoyle dans la mesure où la présence de ce ou ces substituant(s) n'a pas d'incidence significative sur la conformation d'origine du radical. En d'autres termes, le radical doit conserver son aptitude à se compacter ou encore à provoquer une diminution significative de la tension superficielle ou encore chute rapide de la tension superficielle, lorsqu'il est mis en présence, à partir d'une certaine

concentration, avec un solvant polaire. Ce phénomène est notamment illustré en figures 1 ou 2.

Plus particulièrement, R_2 et R_3 peuvent représenter alors un atome d'hydrogène.

5 La présente invention concerne tout particulièrement le dérivé 4-(N)-squalénoylgemcitabine (SQgem).

De manière inattendue, les inventeurs ont ainsi constaté que les dérivés conformes à la présente invention et comprenant, à titre de radical hydrocarboné un radical squalénoyle, s'avéraient particulièrement sensibles à la polarité des solvants, à l'image du squalène. Ils ont ainsi constaté que la mise en présence de ces dérivés de
10 gemcitabine avec un solvant polaire à l'image de l'eau par exemple, conduisait à la formation spontanée de particules à l'échelle du nanomètre et donc avantageusement compatibles avec une administration intraveineuse.

Les nanoparticules des dérivés de gemcitabine selon la présente invention
15 s'avèrent accessibles à l'aide de la technologie classique de nanopréciipitation telle que décrite dans Fessi H. *et al.*, Int. J. Pharm., 55 ; 1989, R1-R4.

Plus précisément, les nanoparticules selon l'invention sont obtenues par solubilisation d'un dérivé conforme à la présente invention dans un solvant organique à l'image de l'acétone et/ou de l'éthanol. L'ajout du mélange, ainsi obtenu, dans une phase
20 aqueuse sous agitation conduit instantanément à la formation des nanoparticules attendues en présence ou non de tensioactif(s).

De manière avantageuse, le procédé ne requiert pas la présence obligatoire de tensioactif(s) pour obtenir des nanoparticules conformes à l'invention. Cette propriété est particulièrement appréciable dans la mesure où un grand nombre de tensioactifs ne
25 s'avèrent pas compatibles avec une application in vivo.

Toutefois, il est entendu que l'usage de tensioactifs, généralement avantageusement dénués de toute toxicité, est envisageable dans le cadre de la présente invention. Ce type de tensioactif peut par ailleurs permettre d'accéder à des tailles encore plus réduites lors de la formation des nanoparticules.

30 A titre illustratif et non limitatif de ce type de tensioactifs susceptibles d'être utilisés dans la présente invention, on peut notamment citer des copolymères de polyoxyéthylène-polyoxypropylène, des dérivés phospholipidiques et des dérivés

lipophiles du polyéthylène glycol. Comme dérivé lipophile du polyéthylène glycol, on peut mentionner par exemple le polyéthylène glycol cholestérol.

Comme exemple des copolymères blocs polyocyéthylène-polyoxypropylène, on peut plus particulièrement citer les copolymères triblocs polyoxyéthylène-
5 polyoxypropylène-polyoxyéthylène, encore appelés Poloxamers[®], Pluronic[®] ou Synperonics[®], et qui sont commercialisés notamment par la société BASF. Apparentés à ces familles de copolymères, les Poloxamines[®], qui sont constituées de segments hydrophobes (à base de polyoxypropylène), de segments hydrophiles (à base de polyoxyéthylène) et d'une partie centrale dérivant du motif éthylène diamine, peuvent
10 également être employés.

La suspension colloïdale de particules peut être conservée telle quelle, voire évaporée de manière à concentrer les nanoparticules selon l'invention.

D'une manière générale, les nanoparticules ainsi obtenues possèdent une taille
15 moyenne en poids variant de 30 à 500 nm, et en particulier de 50 à 250 nm, notamment de 70 à 200 nm, et voire de 100 à 175 nm mesurée par diffusion de la lumière à l'aide du nanosizer Coulter[®] N4MD, Coulter Electronics, Hialeah, USA.

Cette aptitude des dérivés selon l'invention à conduire à la formation de nanoparticules, est de toute évidence le résultat d'un comportement spécifique de ces
20 dérivés en milieu aqueux. Ainsi, comme il ressort des exemples figurant ci-après, un dérivé 4-(N)-squalénoylgemcitabine s'avère posséder un comportement très différent de la gemcitabine ou d'un dérivé 4-(N)-stéaroylgemcitabine en milieu aqueux. Seul le dérivé selon l'invention conduit à une diminution significative de la tension superficielle de l'eau.

25 Les inventeurs ont en outre constaté qu'il était possible de contrôler la taille de ces particules à travers la quantité de dérivé de gemcitabine mise en œuvre pour la nanoprécipitation. En effet, l'augmentation de la concentration de la 4-(N)-squalénoylgemcitabine entraîne généralement une augmentation de la taille, et inversement, comme il ressort de l'exemple 2 ci-après. En outre, et comme mentionné
30 précédemment, cette taille peut être également contrôlée en conduisant la formation des nanoparticules en présence de tensioactif(s).

Les dérivés conformes à l'invention s'avèrent par ailleurs dotés d'une activité anti-tumorale très supérieure à celle de la gemcitabine. Ainsi, les résultats présentés ci-après montrent clairement que les nanoparticules de 4-(*N*)-squalenoylgemcitabine s'avèrent cinq à sept fois plus toxiques que la molécule de gemcitabine.

5 Comme précisé précédemment, les composés selon l'invention s'avèrent donc avantageux à plusieurs titres, tout d'abord la fonctionnalisation de la gemcitabine en position 4-amino permet de protéger efficacement la fonction amine de l'action de la désoxycytidine déaminase, qui est naturellement responsable de la demi-vie plasmatique réduite de la gemcitabine une fois administrée par voie intraveineuse.

10 Toutefois, cette protection peut être en parallèle efficacement levée *in vivo* grâce à l'action des enzymes cellulaires et conduire à la libération de la gemcitabine.

Par ailleurs, la conjugaison de la gemcitabine avec un dérivé hydrocarboné conforme à l'invention, et plus particulièrement avec l'acide squalénique, confère à la molécule de la gemcitabine des caractéristiques physico-chimiques suffisantes pour lui
15 conférer une aptitude à former des particules par nanopréciipitation, particules dont la taille s'avère compatible pour une administration parentérale et notamment par voie intraveineuse.

Les dérivés conformes à la présente invention peuvent également être administrés par toutes les voies conventionnelles. Toutefois, comme précisé
20 précédemment ces compositions sont particulièrement intéressantes notamment lorsqu'elles sont sous la forme nanoparticulaire pour une administration parentérale.

Un autre aspect de l'invention concerne donc une composition pharmaceutique comprenant au moins, au titre de matière active, un composé conforme à la présente invention notamment sous la forme de nanoparticules. Les dérivés conformes à la
25 présente invention peuvent y être associés avec au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

A titre d'exemples de formulations pharmaceutiques compatibles avec les compositions selon l'invention on peut notamment citer :

- les injections ou perfusions intraveineuses ;
- 30 - les solutions salines ou d'eau purifiée ;
- les compositions pour inhalation ;
- les compositions pour voie oculaire ;

- les capsules, dragées et cachets incorporant notamment à titre de véhicules de l'eau, du phosphate de calcium, des sucres, tels que lactose, dactrose ou mannitol, du talc, de l'acide stéarique, de l'amidon, du bicarbonate de sodium et/ou de la gélatine.

5 Lorsque les composés sont utilisés en dispersion dans une solution aqueuse, ils peuvent être associés à des excipients de type agent séquestrant ou chélatant, anti-oxydant, agents modifiant le pH et/ou agents tampons.

 Les nanoparticules selon l'invention sont bien entendu susceptibles de porter en surface une multitude de fonctions réactives, à l'image des fonctions hydroxyles ou amines par exemple. Il est donc envisageable de fixer à ces fonctions toutes sortes de
10 molécules, notamment par des liaisons covalentes.

 A titre illustratif et non limitatif de ce type de molécules susceptibles d'être associées aux nanoparticules, on peut notamment citer les molécules de type marqueur, les composés susceptibles d'assurer une fonction de ciblage, ainsi que tous composés
15 aptes à leur conférer des caractéristiques pharmacocinétiques particulières. En ce qui concerne ce dernier aspect, on peut ainsi envisager de fixer en surface de ces nanoparticules des dérivés lipophiles du polyéthylène glycol, comme par exemple le polyéthylène glycol cholestérol ou le polyéthylène glycol-phosphatidiléthanolamine. Un enrobage de surface à base d'un tel composé est en effet avantageux pour conférer une
20 rémanence vasculaire accrue en raison d'une réduction significative de la capture des nanoparticules par les macrophages hépatiques.

 Il est en outre possible d'envisager l'association par voie non covalente de composés conformes à la présente invention et/ou des nanoparticules correspondantes avec des molécules annexes telles que définies précédemment. Cette association peut par
25 exemple relever de phénomènes d'adsorption dus notamment à une affinité entre les composés selon l'invention et ces autres molécules.

 Ainsi, et comme illustré en exemple 4, le polyéthylène glycol sous une forme conjuguée avec du cholestérol peut être associé à une molécule conforme à la présente invention. En effet, compte tenu de l'affinité naturelle du squalène pour le cholestérol, le
30 conjugué polyéthylène glycol cholestérol s'associe, en l'espèce, avec un conjugué squalène-gemcitabine active, et conduit ainsi à la formation de nanoparticules revêtues en surface de polyéthylène glycol. Par ailleurs, et comme mentionné précédemment, le

conjugué polyéthylène glycol cholestérol agit avantageusement, lors du processus de formation des nanoparticules de squalène-gemcitabine comme un tensioactif du fait de son comportement amphiphile et stabilise donc la solution colloïdale réduisant ainsi la taille des nanoparticules formées.

5 Outre les composés précités, les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent contenir des agents de type conservateurs, des agents mouillants, des agents solubilisants, des agents de coloration, et les parfums.

 Pour des raisons évidentes, les quantités en dérivés selon l'invention susceptibles d'être mis en œuvre notamment à des fins anti-cancéreux sont susceptibles
10 de varier significativement selon le mode d'utilisation et la voie retenue pour leur administration.

 Par exemple pour un traitement par voie systémique, destiné à un patient de type adulte, on peut envisager d'administrer un dérivé conforme pour la présente invention à une dose d'environ 0,1 à 150 mg/kg de poids corporel et par jour et plus
15 particulièrement de 1 à 40 mg/kg par jour.

 En revanche pour une administration topique on peut envisager de formuler au moins un dérivé conforme à la présente invention à raison de 0,1 à 40 % en poids, voire plus, par rapport au poids total de la formulation pharmaceutique considérée.

 Il est également possible de co-administrer au moins un dérivé conforme à la
20 présente invention avec au moins une autre matière active susceptible d'être également bénéfique à l'égard de la pathologie considérée.

 A titre représentatif de ces matières actives, susceptibles d'être combinées aux dérivés conformes à la présente invention, on peut notamment citer d'autres molécules ou macromolécules anticancéreuses ou cytostatiques (par exemple sels de platine, antracyclines, poisons du fuseau mitotique, inhibiteurs de topoisomérases, de kinases ou
25 de métalloprotéases), des agents anti-inflammatoires de type corticoïde (par exemple dexamétasone) ou non corticoïde ou encore des molécules à activité immunoadjuvantes (par exemple anticorps à activité anticancéreuse). L'association avec l'hyperthermie utilisée dans certaines chimiothérapies peut être envisagée. Les dérivés conformes à la
30 présente invention peuvent également être combinés aux thérapies chirurgicales et/ou aux radiations pour le traitement du cancer.

Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation de l'acide squalénique ou de l'un de ses dérivés pour formuler un principe actif de nature polaire avec un poids moléculaire supérieur ou égale à 100 Da, en particulier supérieur à 150 Da, plus particulièrement supérieur à 200 Da, et notamment un nucléoside ou analogue à l'état de nanoparticules. En effet, les inventeurs ont montré que des nucléosides antiviraux associés de façon covalente à un dérivé squalénique pouvaient former des nanoparticules. Cet aspect est plus particulièrement illustré par les exemples 6, 7 et 8.

A titre illustratif et non limitatif des nucléosides antiviraux ou analogues structuraux susceptibles d'être formulés selon l'invention, on peut notamment citer la didanosine, la zidovudine et l'acyclovir mais aussi la zalcitabine, le gancyclovir, le valacyclovir, la stavudine, la lamivudine, l'abacavir, l'emtricitabine, l'amdoxovir, le dOTC ou même le sidophovir.

Les exemples et figures présentés ci-après sont soumis à titre illustratif et non limitatif du domaine de l'invention.

Figures

Figure 1 : Elle représente l'évolution de la tension superficielle (γ) de solutions de gemcitabine (Gem), 4-(N)-stéaroylgemcitabine (C18gem) et 4-(N)-squalénoylgemcitabine (SQgem) en fonction de la concentration des solutions.

Figure 2 : Elle représente l'évolution de la tension superficielle (γ) d'une suspension de nanoparticules de SQgem (NP SQgem) en fonction de la concentration.

Figure 3 : Elle représente la viabilité cellulaire en fonction du temps après incubation de nanoparticules de SQgem 100 μ M sur deux lignées cellulaires en présence et en absence d'inserts (test MTT) ($n = 3$).

Exemple 1 : Préparation de la 4-(N)-squalénoylgemcitabine (SQgem)**a) Synthèse de l'acide squalénique (SQCOOH)**

A 11 ml d'eau distillée sont ajoutés 1,16 ml d'acide sulfurique; ensuite, 0,615 g (2,06 mmol) de $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sont ajoutés doucement afin d'obtenir l'acide chromique. 0,794 g (2,06 mmol) de l'aldéhyde squalénique (SQCHO) (Ceruti M. *et al.*, J. Chem. Soc., Perkin Trans, 1 ; 2002, 1477-1486) sont dissous dans 16 ml d'éther diéthylique sous agitation magnétique et le ballon est ensuite refroidi à 0° C. Ensuite, à la solution de SQCHO est ajouté l'acide chromique goutte à goutte. La réaction est maintenue sous agitation magnétique à 0° C pendant deux heures. Le produit brut est ensuite purifié par lavage de la phase organique avec de l'eau et ensuite par flash-chromatographie sur gel de silice avec éther de pétrole/éther 95:5 comme éluant. Rendement: 35 % (0,286 g, 0,714 mmol).

^1H RMN (CD_3COCH_3 99.5% 300 MHz) δ : 5.11 (5H, m, CH vinyliques), 2,38 (2H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 2,26 (2H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 2,13-1,86 (16H, m, CH_2 allyliques), 1,65-1,59 (15H, m, CH_3 allyliques), 1.26 (3H, s, CH_3 allyliques).

CIMS (isobutane) m/z 401 (100).

EIMS m/z 400 (5), 357 (3), 331 (5), 289 (3), 208 (6), 136 (3), 81 (100).

b) Synthèse de la 4-(N)-squalénoylgemcitabine

Dans un ballon à trois cols muni d'un fluxmètre, 0,209 g (0,522 mmol) de SQCOOH obtenus en a) dissous dans 1 ml tétrahydrofurane (THF) anhydre et ensuite 0,053 g (0,522 mmol) de triéthylamine (TEA) dissous dans 0,5 ml THF anhydre sont ajoutés sous agitation magnétique et avec un flux d'argon. Le ballon est ensuite refroidi à -15°C. Au mélange de réaction, 0,057 g (0,522 mmol) d'éthylchloroformiate dissous dans 2,15 ml THF anhydre sont ajoutés goutte à goutte. Après 20 minutes à -15° C, 0,137 g (0,522 mmol) de gemcitabine dissous dans 2,72 ml de diméthylformamide (DMF) sont ajoutés et la température est augmentée jusqu'à +5°C et finalement à température ambiante. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (dichlorométhane/acétone 50:50) et elle est gardée sous agitation magnétique pendant plusieurs jours jusqu'à la formation de l'amide. Le produit brut est ensuite purifié par flash-chromatographie sur gel de silice avec un mélange dichlorométhane/acétone 95:5 comme éluant. Rendement: 55 % (0,185 g, 0,287 mmol).

^1H RMN (pyridine- d_5 99.5% 300 MHz) δ : 12,05 (1H, s, NHCO), 8,77 (1H, d, CH-6), 7,74 (1H, d, CH-5), 6,99 (1H, t, CH-1'), 5,30-5,02 (1H, m, CH-3' et 5H, m, CH vinyliques), 4,47-4,31 (3H, m, CH-4' et CH₂-5'), 2,81 (2H, t, NHCOCH₂), 2,53 (2H, t, NHCOCH₂CH₂), 2,18-2,00 (16H, m, CH₂ allyliques), 1,68-1,55 (18H, m, CH₃ allyliques).

5 CIMS (isobutane) m/z 646 (100).

EIMS m/z 645 (10), 577 (8), 523 (7), 509 (18), 494 (10), 454 (15), 429 (24), 372 (100).

10 c) Préparation des nanoparticules constituées de 4-(N)-squalénoylgemcitabine

Les particules constituées de SQgem sont obtenues selon la technique de la nanoprécipitation décrite dans Fessi H. *et al*, Int. J. Pharm., 55 ; 1989, R1-R4. Un échantillon d'une solution à 10 mg/ml de SQgem dans l'éthanol est prélevé et ajouté à de l'acétone selon la concentration désirée et d'une façon telle à obtenir un total de 2 ml de phase organique. Cette solution de SQgem dans le mélange éthanol/acétone est ensuite ajoutée à 4 ml d'eau MilliQ[®] sous agitation magnétique. Les particules se forment instantanément. Après évaporation sous vide des solvants organiques, une suspension de particules colloïdales stables de SQgem est obtenue. La suspension doit être conservée à +4° C.

20

Exemple 2 : Caractérisation physico-chimique des particules

a) Détermination de la taille des nanoparticules

Le contrôle de la taille des particules colloïdales obtenues en exemple 1 est effectué par diffusion quasi élastique de la lumière avec un nanosizer (Coulter[®] N4MD, Coulter Electronics, Hialeah, USA).

Les suspensions colloïdales sont diluées dans de l'eau MilliQ[®] afin que le nombre de particules par ml soit adapté à l'appareillage de mesure.

La taille des nanoparticules est comprise entre 100 et 200 nm. Elle est contrôlée par différentes concentrations en SQgem mises en oeuvre dans le procédé de nanoprécipitation décrit en exemple 1. Les résultats obtenus sont présents en tableau I ci-après.

30

Tableau I

Concentration de SQgem dans la suspension finale (mg/ml)	Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	Ecart-type	Index de polydispersité
1	126,2	43,5	0,26
2	150,4	37,7	0,09
4	171,3	40,8	0,08

b) Mesure de la tension superficielle de solutions de 4-(N)-squalénoylgemcitabine et étude de leur stabilité

5 La tension superficielle d'une solution aqueuse de SQgem à différentes concentrations est mesurée, à surface constante, à l'aide d'un tensiomètre à lame de Wilhelmy et comparée à celle d'une solution de gemcitabine (Gem) et de 4-(N)-stéaroylgemcitabine (C18gem) (Myhren F. *et al.*, Gemcitabine derivatives, US patent n° 2002/0042391).

10 Pour préparer les différentes dilutions de SQgem et de C18gem il est nécessaire de partir d'une solution éthanolique; le pourcentage d'éthanol dans la solution finale est de 10 % (la présence d'éthanol abaisse la tension superficielle de l'eau de 72 mN/m à environ 50 mN/m). Les résultats sont présentés en figure 1.

15 On note que seule la SQgem diminue la tension superficielle à une concentration de 4×10^{-6} M, ce qui correspond exactement à la formation des nanoparticules.

La stabilité des particules de SQgem à la dilution a également été évaluée par la mesure de la tension superficielle à aire constante de différentes dilutions d'une suspension de particules de SQgem. Elle est illustrée par la figure 2.

20

Exemple 3 : Détermination de l'activité antitumorale des particules de 4-(N)-squalénoylgemcitabine

L'activité cytotoxique de la SQgem est évaluée sur deux lignées cellulaires tumorales humaines (KB3-1, cancer du naso-pharynx et MCF-7, cancer du sein) par
25 exposition à la SQgem pendant 72 heures et comparée à l'activité de la gemcitabine.

Les lignées sont maintenues en milieu DMEM avec 10 % de sérum de veau fœtal, glutamine 2 mM, antibiotiques 50 mg/l, à 37° C, 5 % CO₂, 95 % d'humidité. Les cellules sont ensemencées dans une plaque à 96 puits à 1x10⁴/puits; après 24 heures, différentes dilutions de gemcitabine et de particules de SQgem sont ajoutées et incubées pendant 72 heures. La viabilité cellulaire est ensuite déterminée par le test MTT. Les résultats sont exprimés en CI₅₀, qui est la concentration de molécule à laquelle 50 % des cellules sont vivantes.

Les résultats obtenus sont présentés en tableau II ci-après. Ils montrent clairement que les nanoparticules de SQgem sont 5 à 7 fois plus cytotoxiques que la molécule de gemcitabine.

Tableau II

	CI ₅₀ (μM) après 72 h	
	KB3-1	MCF-7
Gemcitabine	50,8 ± 49,8	29,0 ± 13,9
SQgem	8,8 ± 4,1	4,8 ± 3,9

L'activité cytotoxique de la SQgem à temps différents a également été évaluée par incubation de nanoparticules de SQgem 100 μM sur deux lignées cellulaires en présence et en absence d'inserts (0,02 μm) (test MTT) (n = 3).

Les résultats obtenus sont présentés en figure 3. On note que l'activité anticancéreuse de la SQgem n'est pas réduite par rapport aux essais de cytotoxicité en l'absence d'insert.

Exemple 4 : Préparation de nanoparticules de 4-(N)-squalénoylgemcitabine peggylées

2 mg de 4-(N)-squalénoylgemcitabine et 1,4 mg de cholestérol couplé au polyéthylène glycol (Chol-PEG CHOLESTEROL PEGYLE, SUNBRIGHT CS-020) sont dissous dans 1 mL d'acétone. Cette phase organique est ajoutée à 2 mL d'eau MilliQ® sous agitation magnétique. Après évaporation sous vide de l'acétone, une suspension de nanoparticules stables est obtenue. La taille des nanoparticules, évaluée selon le protocole décrit dans l'exemple 2, est d'environ 75 nm et le potentiel zéta de -32,7 mV.

Exemple 5 : Préparation des nanoparticules constituées de 4-(N)-squalénoylcytarabine (SQara-C)

La 4-(N)-squalénoylcytarabine est synthétisée à partir de l'acide squalénique par réaction avec la cytarabine, selon la procédure décrite dans l'exemple 1 pour la 4-(N)-squalénoylgemcitabine. Les particules constituées de SQara-C sont obtenues selon la technique de la nanoprécipitation, comme décrit pour les particules de SQgem, et leur diamètre hydrodynamique moyen est de $110,4 \pm 34,1$ nm pour une concentration en SQara-C dans la suspension finale de 1 mg/ml (index de polydispersité : 0,168)

Exemple 6 : Synthèse des nanoparticules de la 5'-squalenoyl-didanosine; (2S, 5R)-((4,8,13,17,21-Pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaénoate de 5-(6-oxo-1,6-dihydro-purin-9-yl)-tétrahydro-furan-2-yl-méthyle

A une solution de 31 mg d'acide (4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaénoïque (SqCO₂H, 0,15 mmol) dans le diméthylformamide anhydre (1,2 mL) sont ajoutés 28 mg de N-hydroxybenzotriazol (0,18 mmol), 36 mg de didanosine (ddI, 0,15 mmol), 70 mg de O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetraméthyluronium hexafluoroborate (0,18 mmol) et finalement 62 mg de diisopropyléthylamine (0,5 mmol). Le mélange est agité 84 h à 20 °C sous atmosphère d'azote, puis concentré sous pression réduite (0,05 Torr). Le résidu est repris dans 5 mL d'une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium, et extrait à l'acétate d'éthyle (3 X 10 mL). La phase organique est lavée par une solution aqueuse de NaCl, séchée sur MgSO₄, et concentrée sous vide. Le résidu est chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH: 92/8) pour fournir 37 mg de 5'-squalenoyldidanosine (Rdt 58%) sous la forme d'un solide amorphe incolore.

IR (cm⁻¹) 3550-2700, 2921, 2856, 1734, 1691, 1590, 1548, 1449, 1380, 1261.

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) δ : 13.0 (s large, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 6.38 (t, J = 4,2 Hz, 1H), 5,17-5,00 (m, 5H), 4,40-4,20 (m, 3H), 2,60-1,90 (m, 24 H), 1,67 (s, 3H), 1.60 (s large, 15 H).

¹³C RMN (50MHz, CDCl₃) δ : 173.27 (CO₂), 159.20 (CO), 148.34 (C), 144.3 (CH) 138.60 (CH), 135.23 (C), 135.03 (C), 135.00 (C), 133.09 (C), 131.31 (C), 125.56 (CH), 125.38 (C), 125.54 (CH), 124.53 (CH), 124.40 (2 CH), 85.94 (CH), 79.60 (CH),

65.07 (CH₂), 39.86 (CH₂), 39.83 (CH₂), 39.68 (CH₂), 34.67 (CH₂), 33.12 (CH₂), 33.01 (CH₂), 28.39 (CH₂), 28.38 (CH₂), 29.9 (CH₂), 26.83 (CH₂), 26.79 (CH₂), 26.28 (CH₂), 25.77 (CH₃), 17.77 (CH₃), 16.51 (2 CH₃), 16.10 (CH₃), 16.00 (CH₃).

Le même composé peut être obtenu avec un rendement de 10% en utilisant l'EDCI comme agent de couplage alors que la condensation entre le chlorure de l'acide squaloyle et le ddI le donne avec un rendement de 15%.

La taille des particules est évaluée selon le protocole décrit dans l'exemple 2. Le diamètre hydrodynamique moyen est de 152 nm, mesuré avec un écart type de 34,4nm et un indice de polydispersité de 0,1.

10

Exemple 7 : Synthèse des nanoparticules de la 5'-squalenoyl-zidovudine; (2S,3S,5R)-4,8,13,17,21-Pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaénoate de 3-azido-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-tétrahydro-furan-2-yl-méthyle

15 A une solution de 50 mg d'acide (4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-pentaénoïque (SqCO₂H, 0,15 mmol) dans le diméthylformamide anhydre (2 mL) sont ajoutés 45 mg de N-hydroxybenzotriazol (0,29 mmol), 79 mg de zidovudine (AZT, 0,24 mmol), 113 mg de O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetraméthyluronium hexafluoroborate (0,29 mmol) et finalement 102 mg de diisopropyléthylamine (0,5 mmol).
20 Le mélange est agité 90 h à 20 °C sous atmosphère d'azote, puis concentré sous pression réduite (0,05 Torr). Le résidu est repris dans 10 mL d'une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium, et extrait à l'acétate d'éthyle (3 X 15 mL). La phase organique est lavée par une solution aqueuse de NaCl, séchée sur MgSO₄, et concentrée sous vide. Le résidu est chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH: 97/3) pour fournir 52 mg de
25 5'-squalenoyl-zidovudine (Rdt 43%) sous la forme d'un solide amorphe incolore.

IR (cm⁻¹) 3158, 2920, 2854, 2105, 1741, 1690, 1449, 1381, 1270 .

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) δ : 8.2 (s large, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.12 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 5,17-5,00 (m, 5H), 4,40 (dd, J = 12.2 Hz, 4.6 Hz, 1H), 4.30 (dd, 12.2 Hz, 3.8 Hz, 1H), 4.10-4.05 (m, 1H), 2,55-2.20 (m, 5 H), 2.10-1.90 (m, 18 H), 1.94 (s, 3H), 1,69 (s, 3H),
30 1.60 (s large, 15 H).

¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃) δ : 172.87 (CO₂), 163.57 (CO), 150.12 (CO), 135.31 (C), 135.27 (CH), 135.04 (C), 134.91 (C), 132.86 (C), 131.35 (C), 125.79 (CH),

124.67 (CH), 124.56 (CH), 124.40 (CH), 124.37 (CH), 111.43 (C), 85.64 (CH), 82.00 (CH), 63.36 (CH₂), 60.81 (CH), 39.88 (CH₂), 39.85 (CH₂), 39.68 (CH₂), 37.75 (CH₂), 34.62 (CH₂), 33.18 (CH₂), 29.81 (CH₂), 28.41 (CH₂), 28.39 (CH₂), 26.91 (CH₂), 26.82 (CH₂), 26.81 (CH₂), 25.80 (CH₃), 17.79 (CH₃), 16.17 (2 CH₃), 16.16 (CH₃), 16.12 (CH₃), 16.05 (CH₃), 12.73 (CH₃).

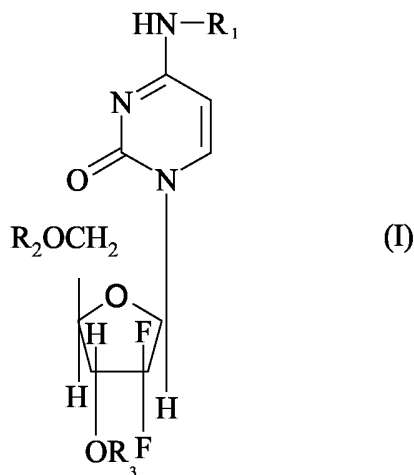
La taille des particules est évaluée selon le protocole décrit dans l'exemple 2. Le diamètre hydrodynamique moyen est de 150-170 nm.

Exemple 8 : Préparation des nanoparticules constituées de 4-(N)-squalénoylacyclovir (SQACV)

Le 4-(N)-squalénoylacyclovir est synthétique à partir de l'acide squalénique par réaction avec l'acyclovir. Selon la procédure utilisée, il est possible d'obtenir entre la chaîne squalénique et l'acyclovir soit une liaison ester, soit une amidique. Les particules constituées de SQACV sont obtenues selon la technique de la nanoprécipitation, comme décrit pour les particules de SQgem, et leur diamètre hydrodynamique moyen est de 217,5 + 37,9 nm pour une concentration en SQACV dans la suspension finale de 1 mg/ml (index de polydispersité : 0,038).

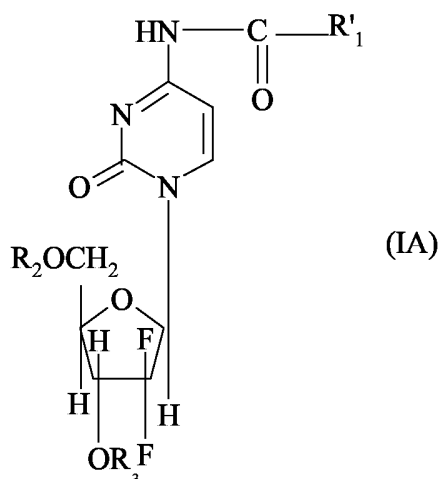
REVENDICATIONS

1. Dérivé de 2',2'-difluoro-2'-désoxycytidine de formule générale (I) :



dans laquelle :

- 5 R_1 , R_2 et R_3 , identiques ou différents, représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un radical acyle hydrocarboné au moins en C_{18} et de conformation telle qu'il est capable de conférer audit composé de formule générale (I), une forme compactée dans un milieu solvant polaire,
- l'un au moins des groupements R_1 , R_2 et R_3 étant différent d'un atome d'hydrogène.
- 10 2. Dérivé de 2',2'-difluoro-2'-désoxycytidine selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit radical acyle hydrocarboné est acyclique, non linéaire et insaturé.
3. Dérivé de 2',2'-difluoro-2'-désoxycytidine selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit radical est un radical squalénoyle ou dérivé de celui-ci.
- 15 4. Dérivé de 2',2'-difluoro-2'-désoxycytidine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend un dérivé hydrocarboné à titre de radical R_1 .
5. Dérivé de 2',2'-difluoro-2'-désoxycytidine selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale (IA) :



dans laquelle R_2 et R_3 sont tels que définis en revendications 1 à 4 et R'_1 représente un radical squalénoyle ou dérivé de celui-ci.

6. Dérivé selon la revendication 5, caractérisé en ce que R_2 et R_3 représentent tous deux un atome d'hydrogène.

7. Nanoparticules d'un dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

8. Nanoparticules de 4-(N)-squalénoylgemcitabine.

9. Nanoparticules selon la revendication 7 ou 8, caractérisées en ce qu'elles possèdent une taille moyenne en poids variant de 30 nm à 500 nm.

10. Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisées en ce qu'elles sont associées à au moins un dérivé lipophile du polyéthylène glycol.

11. Nanoparticules selon la revendication 10, caractérisée en ce que ledit dérivé lipophile du polyéthylène glycol est le polyéthylèneglycolcholestérol.

12. Procédé de préparation de nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

- la solubilisation d'au moins un dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 dans au moins un solvant organique à une concentration suffisante pour obtenir, lors de l'ajout du mélange correspondant, sous agitation, à une phase aqueuse, la formation instantanée de nanoparticules en suspension dans ladite phase aqueuse, et, le cas échéant,
- l'isolement desdites nanoparticules.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est conduit en absence de tensioactif.

14. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est conduit en présence d'un dérivé lipophile du polyéthylène glycol.

5 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit dérivé lipophile du polyéthylène glycol est le polyéthylène glycol cholestérol.

16. Composition pharmaceutique comprenant à titre de matière active au moins un dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou des nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 7 à 10 en association avec au moins un véhicule
10 pharmaceutiquement acceptable.

17. Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 7 à 11, à titre d'agents anticancéreux.

18. Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 7 à 11, à titre d'agents antiviraux.

15 19. Utilisation d'un dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou de nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 7 à 11 pour la préparation d'une composition pharmaceutique dotée d'une activité anticancéreuse ou antivirale.

20. Utilisation de l'acide squalénique ou d'un dérivé de celui-ci pour formuler au moins un principe actif de nature polaire et de poids moléculaire supérieur à 100 Da à
20 l'état de nanoparticules.

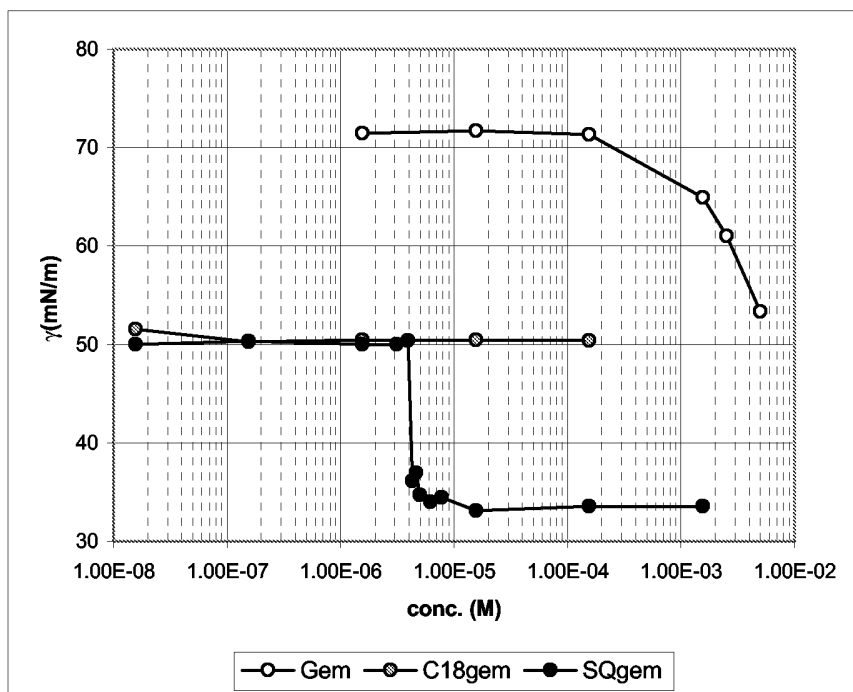
21. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisée en ce qu'elle met en œuvre le couplage covalent d'au moins une molécule dudit acide squalénique à au moins une molécule dudit principe actif.

22. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 20 ou 21, caractérisée en ce que ledit principe actif est au moins un nucléoside ou l'un de ses analogues.
25

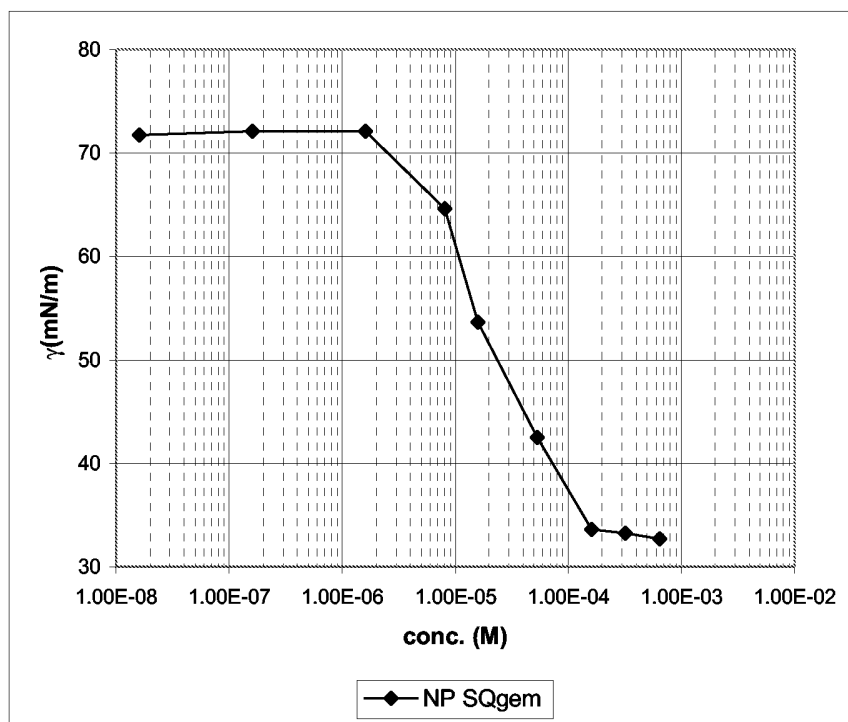
23. Utilisation selon la revendication 22, caractérisée en ce que ledit nucléoside est un dérivé 2',2'-difluoro-2'-désoxycytidine.

24. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 20 à 23, caractérisée en ce que ledit nucléoside est choisi parmi la gemcitabine, la cytarabine, la didanoside et la
30 zidovudine, l'acyclovir, la zalcitabine, le gancyclovir et le valacyclovir.

1/3

**FIGURE 1**

2/3

**FIGURE 2**

3/3

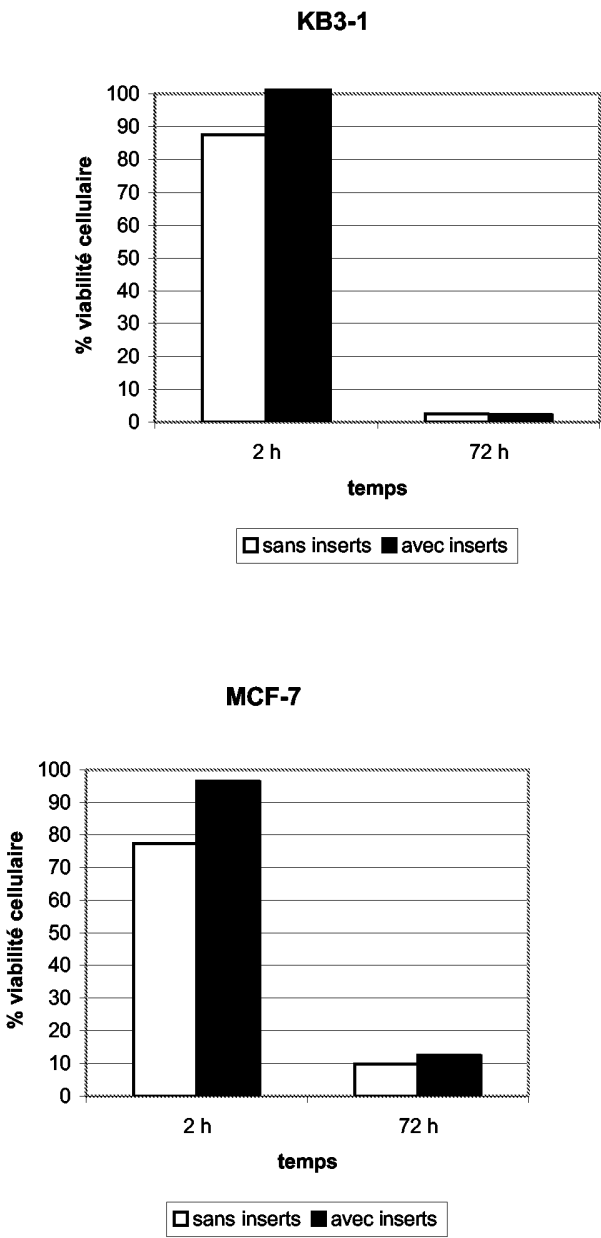


FIGURE 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2005/050488

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07H19/073 A61K31/706

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)
 C07H A61K

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/32762 A (SANDVOLD MARIT LILAND ; DALEN ARE (NO); MYHREN FINN (NO); NORSK HYDRO) 30 July 1998 (1998-07-30) the whole document	1,2,4,5, 7,9, 16-24
X	US 6 384 019 B1 (SANDVOLD MARIT LILAND ET AL) 7 May 2002 (2002-05-07) the whole document	1,2,4,5, 7,9, 16-19
X	US 6 524 595 B1 (PERRIER ERIC ET AL) 25 February 2003 (2003-02-25) the whole document	20
X	EP 0 693 077 A (NORSK HYDRO A/S) 24 January 1996 (1996-01-24) the whole document	20-24



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 document 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

25 April 2006

Date of mailing of the international search report

08/05/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Klein, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2005/050488

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9832762	A	30-07-1998	NONE	
US 6384019	B1	07-05-2002	AT 236188 T	15-04-2003
			AU 720451 B2	01-06-2000
			AU 5782798 A	18-08-1998
			CA 2278056 A1	30-07-1998
			CZ 9902479 A3	15-12-1999
			DE 69812934 D1	08-05-2003
			DE 69812934 T2	29-01-2004
			DK 986570 T3	28-07-2003
			EP 0986570 A1	22-03-2000
			ES 2196528 T3	16-12-2003
			GB 2321454 A	29-07-1998
			HU 0000721 A2	28-05-2001
			JP 2001509160 T	10-07-2001
			NZ 336676 A	28-01-2000
			PL 334856 A1	27-03-2000
			RU 2194711 C2	20-12-2002
			SK 102999 A3	16-05-2000
			TW 458981 B	11-10-2001
			UA 67736 C2	15-08-2000
			US 2002042391 A1	11-04-2002
			ZA 9800576 A	23-07-1998
US 6524595	B1	25-02-2003	DE 10033990 A1	22-11-2001
			FR 2808691 A1	16-11-2001
			GB 2362102 A	14-11-2001
			JP 3582583 B2	27-10-2004
			JP 2001323002 A	20-11-2001
EP 0693077	A	24-01-1996	AT 171457 T	15-10-1998
			AU 685104 B2	15-01-1998
			AU 6514194 A	24-10-1994
			CA 2158853 A1	13-10-1994
			CZ 9502593 A3	12-06-1996
			DE 69413529 D1	29-10-1998
			DE 69413529 T2	29-04-1999
			DK 693077 T3	14-06-1999
			ES 2124883 T3	16-02-1999
			FI 954727 A	04-10-1995
			HK 1003437 A1	07-07-2000
			HU 73659 A2	30-09-1996
			JP 3049258 B2	05-06-2000
			JP 8508477 T	10-09-1996
			WO 9422887 A1	13-10-1994
			NZ 263888 A	27-05-1998
			PL 310970 A1	22-01-1996
			RU 2139884 C1	20-10-1999
			SK 123395 A3	03-04-1996
			US 6153594 A	28-11-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2005/050488

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C07H19/073 A61K31/706

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)
C07H A61K

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, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98/32762 A (SANDVOLD MARIT LILAND ; DALEN ARE (NO); MYHREN FINN (NO); NORSK HYDRO) 30 juillet 1998 (1998-07-30) le document en entier -----	1,2,4,5, 7,9, 16-24
X	US 6 384 019 B1 (SANDVOLD MARIT LILAND ET AL) 7 mai 2002 (2002-05-07) le document en entier -----	1,2,4,5, 7,9, 16-19
X	US 6 524 595 B1 (PERRIER ERIC ET AL) 25 février 2003 (2003-02-25) le document en entier -----	20
X	EP 0 693 077 A (NORSK HYDRO A/S) 24 janvier 1996 (1996-01-24) le document en entier -----	20-24

☐ 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

25 avril 2006

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08/05/2006

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Klein, D

Cadre 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)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre 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 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 recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe 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. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée 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}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant
- ☒ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES 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: 1-19

Dérivés de type 2',2'-difluoro-2'-désoxycytidine

2. revendications: 20-24

Utilisation de l'acide squalénique pour formuler un principe actif.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2005/050488

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9832762	A	30-07-1998	AUCUN	
US 6384019	B1	07-05-2002	AT 236188 T	15-04-2003
			AU 720451 B2	01-06-2000
			AU 5782798 A	18-08-1998
			CA 2278056 A1	30-07-1998
			CZ 9902479 A3	15-12-1999
			DE 69812934 D1	08-05-2003
			DE 69812934 T2	29-01-2004
			DK 986570 T3	28-07-2003
			EP 0986570 A1	22-03-2000
			ES 2196528 T3	16-12-2003
			GB 2321454 A	29-07-1998
			HU 0000721 A2	28-05-2001
			JP 2001509160 T	10-07-2001
			NZ 336676 A	28-01-2000
			PL 334856 A1	27-03-2000
			RU 2194711 C2	20-12-2002
			SK 102999 A3	16-05-2000
			TW 458981 B	11-10-2001
			UA 67736 C2	15-08-2000
			US 2002042391 A1	11-04-2002
			ZA 9800576 A	23-07-1998
US 6524595	B1	25-02-2003	DE 10033990 A1	22-11-2001
			FR 2808691 A1	16-11-2001
			GB 2362102 A	14-11-2001
			JP 3582583 B2	27-10-2004
			JP 2001323002 A	20-11-2001
EP 0693077	A	24-01-1996	AT 171457 T	15-10-1998
			AU 685104 B2	15-01-1998
			AU 6514194 A	24-10-1994
			CA 2158853 A1	13-10-1994
			CZ 9502593 A3	12-06-1996
			DE 69413529 D1	29-10-1998
			DE 69413529 T2	29-04-1999
			DK 693077 T3	14-06-1999
			ES 2124883 T3	16-02-1999
			FI 954727 A	04-10-1995
			HK 1003437 A1	07-07-2000
			HU 73659 A2	30-09-1996
			JP 3049258 B2	05-06-2000
			JP 8508477 T	10-09-1996
			WO 9422887 A1	13-10-1994
			NZ 263888 A	27-05-1998
			PL 310970 A1	22-01-1996
			RU 2139884 C1	20-10-1999
			SK 123395 A3	03-04-1996
			US 6153594 A	28-11-2000