

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/006983 A1

(43) Date de la publication internationale
20 janvier 2011 (20.01.2011)

PCT

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 31/53 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2010/060290

(22) Date de dépôt international :
16 juillet 2010 (16.07.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0954976 17 juillet 2009 (17.07.2009) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
POXEL [FR/FR]; 200, avenue Jean Jaurès, F-69007
Lyon (FR). INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA
SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) [FR/
FR]; 101 rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
MESANGEAU, Didier [FR/FR]; 5, rue Auguste Renoir,
F-77380 Combs La Ville (FR). LEVERVE, Xavier [FR/
FR]; 226 rue de l'Eglise, F-38660 La Terrasse (FR).
CRAVO, Daniel [FR/FR]; 123, avenue Jules Ferry,
F-78500 Sartrouville (FR).

(74) Mandataires : TEZIER HERMAN, Béatrice et al.;
Becker & Associates, 25 rue Louis Le Grand, F-75002
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, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

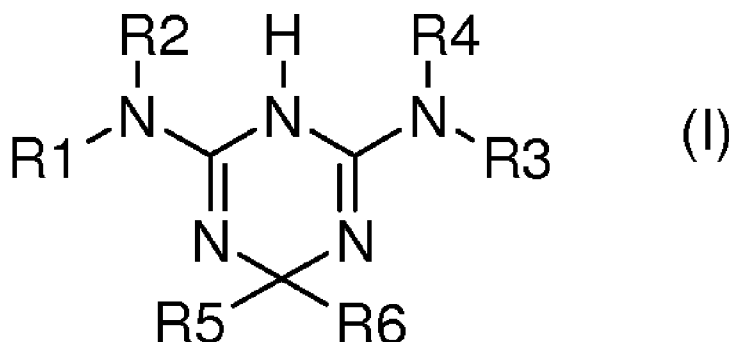
— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

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

(54) Title : AMINO DERIVATIVES OF DIHYDRO-1,3,5-TRIAZINE FOR TREATING OXIDATIVE STRESS

(54) Titre : DERIVES AMINES DE DIHYDRO-1,3,5-TRIAZINE POUR LE TRAITEMENT DU STRESS OXYDATIF



(57) Abstract : The present invention relates to amino derivatives of dihydro-1,3,5-triazine of formula (I), to be used for treating oxidative stress and diseases related thereto, in particular in persons suffering from hyperglycemia.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des dérivés aminés de dihydro-1,3,5- triazine de formule (I) pour leur utilisation dans le traitement du stress oxydatif et des maladies qui lui sont associées, notamment chez les individus hyperglycémiques.



WO 2011/006983 A1

Dérivés aminés de dihydro-1,3,5-triazine pour le traitement du stress oxydatif

Domaine de l'invention

- 5 La présente invention concerne des dérivés aminés de dihydro-1,3,5-triazine pour leur utilisation dans le traitement du stress oxydatif et des maladies qui lui sont associées, notamment chez les individus hyperglycémiques.

Arrière plan technique

- 10 Le stress oxydatif (ou stress oxydant) est reconnu comme étant un élément important du déclenchement ou de la progression de maladies comme les maladies cardiovasculaires, les neuropathies diabétiques, les maladies neurodégénératives, les cancers, ou encore de phénomènes tels que le vieillissement.
- 15 Le stress oxydatif trouve son origine dans l'action de composés pro-oxydants, notamment des radicaux libres, qui sont en général des espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces composés endommagent de nombreuses structures cellulaires, telles que les lipides membranaires, les protéines, ou les acides nucléiques.
- 20 Il apparaît en outre que les composés pro-oxydants peuvent être responsables du déclenchement de l'apoptose, c'est-à-dire de la mort cellulaire programmée. Les composés pro-oxydants, notamment les ROS, semblent ainsi provoquer l'ouverture du pore transitoire de perméabilité (PTP) mitochondrial, une des étapes précoces dans le processus d'apoptose.
- 25 La principale source de ROS de l'organisme est la mitochondrie. La mitochondrie est le siège de la phosphorylation oxydative, qui permet la synthèse d'ATP par l'ATP synthase grâce à la force protomotrice liée au gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Ce gradient est créé par l'action de la chaîne respiratoire, située dans la membrane
- 30 interne mitochondriale, qui catalyse, par l'intermédiaire de plusieurs complexes d'oxydoréduction, l'oxydation de coenzymes d'oxydoréductions (comme le NADH et le $FADH_2$) par l'oxygène moléculaire (O_2). Les coenzymes réduits proviennent quant à eux de l'oxydation de différents substrats énergétiques, tels que le

glucose par exemple. A l'heure actuelle, il apparaît que c'est au niveau de la chaîne respiratoire que les ROS sont produits, notamment au niveau des complexes I et III, et plus particulièrement au niveau du complexe I. De plus, il semble que ce soit lorsque le complexe I fonctionne en flux électronique inverse
5 que cette production soit la plus importante.

Les principaux tissus cibles du stress oxydatif sont ainsi généralement ceux présentant un métabolisme oxydatif important, comme le tissu nerveux, les tissus vasculaires, le cœur, les muscles et le foie. Par ailleurs, la part importante du métabolisme oxydatif dans le stress oxydatif permet d'expliquer que les troubles
10 hyperglycémiques, comme le diabète de type II, soient souvent à l'origine de maladies liées au stress oxydatif, du fait de l'augmentation du métabolisme oxydatif du glucose qui en découle.

Plusieurs stratégies sont envisagées à l'heure actuelle pour lutter contre le stress oxydatif et ses conséquences. L'une d'elle consiste à réaliser un apport en
15 composés anti-oxydants, tels que la vitamine C, la vitamine E, la N-acétyl-L-cystéine, ou encore en glutathion. L'efficacité de cette approche reste toutefois encore à démontrer.

Alternativement, il est proposé d'utiliser des composés permettant de limiter l'apoptose consécutive au stress oxydatif ou la production de ROS par la
20 mitochondrie.

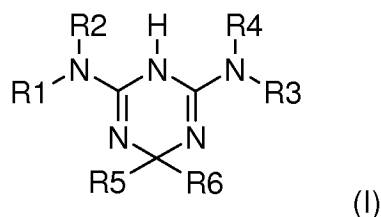
Ainsi, la cyclosporine A (CsA), l'inhibiteur de référence de l'ouverture du PTP, a été proposée comme agent de neuroprotection ou de cardioprotection (Mattson & Kroemer (2003) *Trends in Molecular Medicine* **9**:196-205). Toutefois, la CsA étant également un composé immunosuppresseur, de nombreux effets
25 secondaires limitent son utilisation clinique.

Il a par ailleurs été proposé d'utiliser la metformine, un agent anti-diabétique, pour limiter la production de ROS par la mitochondrie, et la mort cellulaire qui en découle, dans le cadre du traitement des maladies vasculaires et des troubles neuropathiques liés au diabète de type II (Detaille *et al.* (2005) *Diabetes* **54**:2179-2187 ; El-Mir *et al.* (2008) *J. Mol. Neurosci.* **34**:77-87). La metformine agit notamment par une inhibition du complexe I de la chaîne
30 respiratoire mitochondriale, à la fois sur le flux classique mais aussi sur le flux reverse des électrons, ce qui provoque une diminution de la production d'ATP par

la mitochondrie, et par voie de conséquence une diminution de la néoglucogenèse (*i.e.* la synthèse de glucose par le foie). Toutefois, l'inhibition du complexe I semble également être à l'origine de l'acidose lactique parfois associée à l'utilisation de ce composé, notamment du fait de la stimulation de la glycolyse et de la fermentation lactique qui compense la diminution de la production énergétique mitochondriale (Owen *et al.* (2000) *Biochem. J.* **348**:607-614).

Il reste donc encore à trouver un composé permettant de lutter contre le stress oxydatif dépourvu d'effets secondaires susceptibles de limiter son utilisation.

Par ailleurs, il est connu du brevet européen EP 1250 328, des dérivés aminés de dihydro-1,3,5-triazine de formule générale (I) suivante :

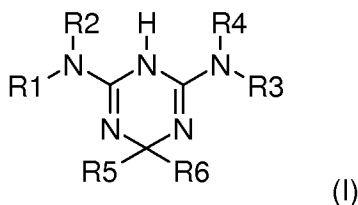


Il a pu être démontré que ces composés présentait une activité antidiabétique dans un modèle expérimental de diabète non insulino-dépendant, induit chez le rat par la Streptozotocine.

Résumé de l'invention

La présente invention découle de la mise en évidence inattendue, par les inventeurs, qu'un composé de formule générale (I), le composé E 0008 permettait de réduire l'apoptose, liée au stress oxydatif, de cellules endothéliales, ainsi que la production de ROS par le complexe I de la chaîne respiratoire de ces cellules, en inhibant exclusivement le flux électronique inverse, mais sans inhiber la respiration mitochondriale. L'action de ce composé ne s'accompagne donc pas d'une surproduction de lactate.

Ainsi, la présente invention concerne un composé de formule générale (I) suivante :



dans laquelle :

- R1, R2, R3, et R4 sont choisis indépendamment parmi les groupes :

- H,

- alkyle (C1-C20) substitué ou non par halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), cycloalkyle (C3-C8), alkényle (C2-C20) substitué ou non par halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkyne (C2-C20) substitué ou non par halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5),

- cycloalkyle (C3-C8) substitué ou non par alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5),

- hétérocycloalkyle (C3-C8) portant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, O, S et substitué ou non par alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5),

- aryl (C6-C14) alkyle (C1-C20) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

- aryl (C6-C14) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

- hétéroaryle (C1-C13) portant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, O, S et substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

R1 et R2, d'une part, et R3 et R4, d'autre part, pouvant former avec l'atome d'azote un cycle à n chaînons (n compris entre 3 et 8) comprenant ou non un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, O, S et pouvant être substitué par un ou plusieurs groupements suivants : amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-

C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

- R5 et R6 sont choisis indépendamment parmi les groupes :

- H,

5 - alkyle (C1-C20) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

10 - alkényle (C2-C20) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

15 - alkynyle (C2-C20) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

20 - cycloalkyle (C3-C8) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

25 - hétérocycloalkyle (C3-C8) portant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, O, S et substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

 - aryl (C6-C14) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

30 - hétéroaryle (C1-C13) portant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, O, S et substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-

C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

- aryl (C6-C14) alkyle (C1-C5) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5),
5 aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

R5 et R6 pouvant former avec l'atome de carbone sur lequel ils sont fixés un cycle à m chaînons (m compris entre 3 et 8) comprenant ou non un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, O, S et pouvant être substitué par amino, hydroxy,
10 thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

ou pouvant former avec l'atome de carbone un reste polycyclique en C10-C30 substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy
15 (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

R5 et R6 pouvant également représenter ensemble le groupement =O ou =S,

l'atome d'azote d'un groupe hétérocycloalkyle ou hétéroaryle pouvant être
20 substitué par un groupe alkyle (C1-C5), cycloalkyle (C3-C8), aryl(C6-C14), aryl(C6-C14)alkyle(C1-C5) ou acyle(C1-C6),

ainsi que les formes tautomères, énantiomères, diastéréoisomères et épimères et les sels pharmaceutiquement acceptables de celui-ci,

pour son utilisation dans la prévention ou le traitement du stress oxydatif ou des
25 pathologies associées au stress oxydatif.

La présente invention concerne également l'utilisation d'un composé de formule générale (I) telle que définie ci-dessus, ainsi que les formes tautomères, énantiomères, diastéréoisomères et épimères et les sels pharmaceutiquement
30 acceptables de celui-ci, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement du stress oxydatif ou des pathologies associées au stress oxydatif.

La présente invention concerne également une méthode de prévention ou de traitement du stress oxydatif ou des pathologies associées au stress oxydatif chez un individu, dans laquelle on administre à l'individu une quantité prophylactiquement ou thérapeutiquement efficace d'un composé de formule générale (I) telle que définie ci-dessus, ou un composé choisi parmi les formes tautomères, énantiomères, diastéréoisomères et épimères et les sels pharmaceutiquement acceptables de celui-ci.

Description détaillée de l'invention

Par « cycle à m chaînons formé par R5 et R6 », on entend en particulier un cycle saturé tel qu'un groupe cyclohexyle, pipéridinyle ou tétrahydropyrannyle.

Par « groupe polycyclique formé par R5 et R6 », on entend un groupe polycyclique carboné éventuellement substitué et en particulier un reste de stéroïde.

Un groupe particulier de composés de formule générale (I) est celui dans lequel R5 est l'hydrogène.

Un autre groupe particulier de composés de formule générale (I) est celui dans lequel R5 et R6 forment avec l'atome de carbone sur lequel ils sont fixés un cycle à m chaînons, (m compris entre 3 et 8) comprenant ou non un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, O, S et pouvant être substitué par un ou plusieurs groupements suivants:

alkyle (C1-C5), amino, hydroxy, alkylamino(C1-C5), alkoxy(C1-C5), alkylthio(C1-C5), aryl (C6-C14), aryl(C6-C14)-alkoxy(C1-C5),

ou forment avec l'atome de carbone un reste polycyclique en C10-C30 substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle.

Un autre groupe particulier de composés de formule générale (I) est celui dans lequel R5 et R6 sont choisis indépendamment parmi les groupes :

alkyle (C1-C20) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy,

aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle.

L'invention se rapporte également aux formes tautomères, aux énantiomères, diastéréoisomères, épimères et aux sels organiques ou minéraux des composés de formule générale (I).

Les composés de l'invention de formule générale (I) définis tels que précédemment possédant une fonction suffisamment acide ou une fonction suffisamment basique ou les deux, peuvent inclure les sels correspondants d'acide organique ou minéral ou de base organique ou minérale pharmaceutiquement acceptables.

En particulier, les composés de formule générale (I) possèdent des atomes d'azote basiques qui peuvent être monosalifiés ou disalifiés par des acides organiques ou minéraux.

De préférence, le composé selon l'invention est sous forme de chlorhydrate.

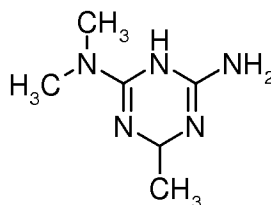
De préférence, R6 est un groupe alkyle (C1-C20), notamment un groupe méthyle.

De préférence, R1 et/ou R2 représente(nt) un groupe alkyle (C1-C20), notamment un groupe méthyle.

De préférence, R3 et/ou R4 représente(nt) un atome d'hydrogène.

De préférence, R1 et R2 sont un groupe méthyle et R3 et R4 représentent un hydrogène.

Parmi les composés de formule générale (I) préférés, on peut citer notamment le composé E 008 de formule (Ia) :



(Ia)

ainsi que ses formes tautomères, énantiomères, diastéréoisomères et épimères et/ou sels pharmaceutiquement acceptables.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le composé de formule générale (I) est la (+) 5,6-dihydro-4-diméthylamino-2-imino-6-méthyl-1,3,5-triazine ou son chlorhydrate.

5 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le composé de formule générale (I) est la (-) 5,6-dihydro-4-diméthylamino-2-imino-6-méthyl-1,3,5-triazine ou son chlorhydrate.

Selon la présente invention, les radicaux « alkyles » représentent des radicaux hydrocarbonés saturés, en chaîne droite ou ramifiée, de 1 à 20 atomes
10 de carbone, de préférence de 1 à 5 atomes de carbone. On peut notamment citer, lorsqu'ils sont linéaires, les radicaux méthyle, éthyle, propyle, butyle, pentyle, hexyle, octyle, nonyle, décyle, dodécyle, hexadécyle, et octadécyle. On peut notamment citer, lorsqu'ils sont ramifiés ou substitués par un ou plusieurs radicaux alkyles, les radicaux isopropyle, tert-butyle, 2-éthylhexyle, 2-méthylbutyle, 2-
15 méthylpentyle, 1-méthylpentyle et 3-méthylheptyle.

Les radicaux « alkoxy » selon la présente invention sont des radicaux de formule –O-Alkyle, l'alkyle étant tel que défini précédemment.

« Alkylthio » désigne un groupe alkyl-S-, le groupe alkyle étant tel que défini ci-dessus.

20 « Alkylamino » désigne un groupe alkyl-NH-, le groupe alkyle étant tel que défini ci-dessus.

Parmi les atomes d'halogène, on cite plus particulièrement les atomes de fluor, de chlore, de brome et d'iode.

Les radicaux « alkényles » représentent des radicaux hydrocarbonés, en
25 chaîne droite ou linéaire, et comprennent une ou plusieurs insaturations éthyléniques. Parmi les radicaux alkényles, on peut notamment citer les radical allyle ou vinylyle.

Les radicaux « alkynyles » représentent des radicaux hydrocarbonés, en chaîne droite ou linéaire, et comprennent une ou plusieurs insaturations
30 acétyléniques. Parmi les radicaux alkynyles, on peut notamment citer le radical acétylène.

Le radical « cycloalkyle » est un radical hydrocarboné mono-, bi- ou tri-cyclique saturé ou partiellement insaturé, non aromatique, de 3 à 10 atomes de

carbone, tel que notamment le cyclopropyle, cyclopentyle, cyclohexyle ou adamantyle, ainsi que les cycles correspondants contenant une ou plusieurs insaturations.

Les radicaux « hétérocycloalkyles » désignent les systèmes mono ou bicycliques, saturés ou partiellement insaturés, non aromatiques, de 3 à 8 atomes de carbone, comprenant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, O ou S.

« Aryl » désigne un système aromatique hydrocarboné, mono ou bicyclique de 6 à 10 atomes de carbone. Parmi les radicaux aryles, on peut notamment citer le radical phényle ou naphthyle, plus particulièrement substitué par au moins un atome d'halogène.

Les radicaux « arylalkyles » ou « aralkyles » sont des radicaux aryl-alkyl-, les groupes aryles et alkyles étant tels que définis ci-dessus. Parmi les radicaux arylalkyle, on peut notamment citer le radical benzyle ou phénéthyle.

« Aryloxy » désigne un groupe aryl-O-, le groupe aryle étant tel que défini ci-dessus.

« Arylalkoxy » désigne un groupe aryl-alkoxy-, les groupes aryle et alkoxy étant tels que définis ci-dessus.

Les radicaux « hétéroaryles » désignent les systèmes aromatiques comprenant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi l'azote, l'oxygène ou le soufre, mono ou bicyclique, de 5 à 10 atomes de carbone. Parmi les radicaux hétéroaryles, on pourra citer le pyrazinyle, le thiényl, l'oxazolyle, le furazanyle, le pyrrolyl, le 1,2,4-thiadiazolyle, le naphthyridinyle, le pyridazinyle, le quinoxalinyle, le phtalazinyle, l'imidazo[1,2-a]pyridine, l'imidazo[2,1-b]thiazolyle, le cinnolinyle, le triazinyle, le benzofurazanyle, l'azaindolyle, le benzimidazolyle, le benzothiényl, le thiénopyridyle, le thiénopyrimidinyle, le pyrrolopyridyle, l'imidazopyridyle, le benzoazaindole, le 1,2,4-triazinyle, le benzothiazolyle, le furanyle, l'imidazolyle, l'indolyle, le triazolyle, le tétrazolyle, l'indolizinyle, l'isoxazolyle, l'isoquinolinyle, l'isothiazolyle, l'oxadiazolyle, le pyrazinyle, le pyridazinyle, le pyrazolyle, le pyridyle, le pyrimidinyle, le purinyle, le quinazolinyle, le quinolinyle, l'isoquinolyle, le 1,3,4-thiadiazolyle, le thiazolyle, le triazinyle, l'isothiazolyle, le carbazolyle, ainsi que les groupes correspondants issus de leur fusion ou de la fusion avec le noyau phényle

« Carboxyalkyle » désigne un groupe HOOC-alkyl-, le groupe alkyle étant tel que défini ci-dessus. Comme exemple de groupes carboxyalkyles, on peut citer notamment le carboxyméthyle ou le carboxyéthyle.

L'expression « sels pharmaceutiquement acceptables » fait référence aux sels d'addition d'acide relativement non toxiques, inorganiques et organiques, et les sels d'addition de base, des composés de la présente invention. Ces sels peuvent être préparés *in situ* pendant l'isolement final et la purification des composés. En particulier, les sels d'addition d'acide peuvent être préparés en faisant réagir séparément le composé purifié sous sa forme épurée avec un acide organique ou inorganique et en isolant le sel ainsi formé. Parmi les exemples de sels d'addition d'acide on trouve les sels bromhydrate, chlorhydrate, sulfate, bisulfate, phosphate, nitrate, acétate, oxalate, valérate, oléate, palmitate, stéarate, laurate, borate, benzoate, lactate, phosphate, tosylate, citrate, maléate, fumarate, succinate, tartrate, naphthylate, mésylate, glucoheptanate, lactobionate, sulfamate, malonate, salicylate, propionate, méthylènebis-b-hydroxynaphtoate, acide gentisique, iséthionate, di-p-toluoyltartrate, méthanesulfonate, éthanesulfonate, benzènesulfonate, p-toluènesulfonate, cyclohexyl sulfamate et quaternaires laurylsulfonate, et analogues (Voir par exemple S.M. Berge et al. « Pharmaceutical Salts » *J. Pharm. Sci.*, 66 :p.1-19 (1977)). Les sels d'addition d'acide peuvent également être préparés en faisant réagir séparément le composé purifié sous sa forme d'acide avec une base organique ou inorganique et en isolant le sel ainsi formé. Les sels d'addition d'acide comprennent les sels aminés et métalliques. Les sels métalliques adaptés comprennent les sels de sodium, potassium, calcium, baryum, zinc, magnésium et aluminium. Les sels de sodium et de potassium sont préférés. Les sels d'addition inorganiques de base adaptés sont préparés à partir de bases métalliques qui comprennent hydruure de sodium, hydroxyde de sodium, hydroxyde de potassium, hydroxyde de calcium, hydroxyde d'aluminium, hydroxyde de lithium, hydroxyde de magnésium, hydroxyde de zinc. Les sels d'addition aminés de base adaptés sont préparés à partir d'amines qui ont une alcalinité suffisante pour former un sel stable, et de préférence comprennent les amines qui sont souvent utilisées en chimie médicinale en raison de leur faible toxicité et de leur acceptabilité pour l'usage médical : ammoniac, éthylènediamine, N-méthyl-glucamine, lysine, arginine, ornithine, choline, N,N'-

dibenzylethylenediamine, chloroprocaïne, diéthanolamine, procaïne, N-benzyl-phénéthylamine, diéthylamine, pipérazine, tris(hydroxyméthyl)-aminomethane, hydroxyde de tétraméthylammonium, triéthylamine, dibenzylamine, éphénamine, dehydroabiétylamine, N-éthylpiperidine, benzylamine, tétra-méthylammonium, 5 tétraéthylammonium, méthylamine, diméthylamine, triméthyl-amine, éthylamine, acides aminés de base, par exemple lysine et arginine, et dicyclohexylamine, et analogues.

Les composés de formule générale (I) peuvent être préparés par application ou adaptation de toute méthode connue en soi de et/ou à la portée de l'homme du 10 métier, notamment celles décrites par Larock dans *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Pub., 1989, ou par application ou adaptation des procédés décrits dans EP 1 250 328.

Les composés pharmaceutiques selon l'invention peuvent être présentés sous des formes destinées à l'administration par voie parentérale, orale, rectale, 15 permuqueuse ou percutanée.

Les compositions pharmaceutiques incluant ces composés de formule générale (I) seront donc présentées sous forme de solutés ou de suspensions injectables ou flacons multi-doses, sous forme de comprimés nus ou enrobés, de dragées, de capsules, de gélules, de pilules, de cachets, de poudres, de 20 suppositoires ou de capsules rectales, de solutions ou de suspensions, pour l'usage percutané, dans un solvant polaire, pour l'usage permuqueux.

Les excipients qui conviennent pour de telles administrations sont les dérivés de la cellulose ou de la cellulose microcristalline, les carbonates alcalinoterreux, le phosphate de magnésium, les amidons, les amidons modifiés, 25 le lactose pour les formes solides.

Pour l'usage rectal, le beurre de cacao ou les stéarates de polyéthylèneglycol sont les excipients préférés.

Pour l'usage parentéral, l'eau, les solutés aqueux, le sérum physiologique, les solutés isotoniques sont les véhicules les plus commodément utilisés.

30 La posologie peut varier dans les limites importantes (0,5 mg à 1000 mg) en fonction de l'indication thérapeutique et de la voie d'administration, ainsi que de l'âge et du poids du sujet.

Comme on l'entend ici l'expression « stress oxydatif » désigne un état dans lequel l'organisme est confronté à des quantités excessives de composés pro-oxydants, tels que des espèces réactives de l'oxygène (ROS), c'est-à-dire à des quantités dépassant les systèmes naturels de lutte de l'organisme contre ces composés. Le stress oxydatif est notamment défini par Cardoso Susana et coll. Dans *Radical Biology & Medecine*, (2008), 45, 1395. L'expression « maladies associées au stress oxydatif » désigne l'ensemble des maladies dont le déclenchement ou l'entretien trouve son origine, au moins partiellement, dans le stress oxydatif.

De préférence, les maladies associées au stress oxydatif sont sélectionnées dans le groupe constitué de l'athérosclérose, des maladies cardiovasculaires, des neuropathies diabétiques, des maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, de la maladie chronique du poumon (« Chronic Lung disease ») et des cancers.

De préférence, l'invention vise la prévention ou l'inhibition de l'apoptose liée au stress oxydatif, notamment l'apoptose de cellules des tissus nerveux, vasculaires, cardiaques, musculaires ou hépatiques.

De manière préférée également, l'invention vise la prévention ou le traitement du stress oxydatif, ou des maladies associées au stress oxydatif, qui sont liés à un trouble hyperglycémique.

Comme on l'entend ici l'expression « trouble hyperglycémique » désigne l'ensemble des maladies atteignant un individu, dans lesquelles la glycémie de l'individu en l'absence de traitement est supérieure à la normale, de façon chronique. Ces troubles sont généralement observés chez le sujet obèse, insulino-résistant en période postprandiale et chez le diabétique de type II en période de jeun et postprandiale. En particulier, le trouble hyperglycémique est un trouble de l'homéostasie glucidique et plus particulièrement le diabète de type II.

De manière particulièrement préférée, l'invention vise la prévention ou le traitement des maladies microvasculaires ou des neuropathies liées à un diabète de type II.

Les maladies microvasculaires et les neuropathies sont des conséquences bien connues du diabète de type II et sont notamment définies et évaluées à partir des tests de Ewing (Mestivier D, *American Journal of Physiology*, (1997), 272 ;

Gerritsen J, *Diabetologia*, (2000), 43, 561) et des approches cliniques par une évaluation de la neuropathie appelée « Michigan Score » (Ziegler Dan and al : *Diabetes Care* (2007), 30,664 ; Andrew J.M. Boulton, *Diabetes Care*, (2004), 27, 1458).

5

De préférence, le composé de formule générale (I) telle que définie ci-dessus exerce son activité préventive ou thérapeutique selon l'invention en inhibant la production d'espèce réactives de l'oxygène, notamment d'H₂O₂, par la mitochondrie et/ou en diminuant l'apoptose liée à un stress oxydatif ou à un trouble hyperglycémique. Plus particulièrement, le composé de formule générale (I) telle que définie ci-dessus exerce son activité préventive ou thérapeutique selon l'invention en inhibant le flux électronique inverse au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale.

15 Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients, la réduction de la souffrance, l'amélioration de la durée de vie, l'amélioration de la qualité de vie, ou le ralentissement de la progression de la maladie.

20 Description des figures

Figures 1, 2, 3, 4, 5 et 6

Effet de la CsA ou de l'E 008 sur l'apoptose des cellules endothéliales induite par le tBH (hydroperoxyde de tert-butyle)

25 Les figures 1 à 5 représentent la distribution en cytométrie de flux de cellules HMEC-1 marquée par l'annexine V (FL3-H) et l'iodure de propidium (IP) (FL1-H) cultivées dans un milieu sans drogue (contrôle) ou incubées avec 500 µM de tBH en l'absence ou en présence de CsA ou d'E 008 aux concentrations indiquées. Les cellules en début d'apoptose se trouvent dans le quart du bas à droite, les cellules en apoptose tardive se trouvent dans le quart en haut à droite, les cellules nécrotiques dans le quart du haut à gauche, et les cellules viables dans le quart du bas à gauche.

30

La figure 6 représente le pourcentage de mort cellulaire mesurée par l'annexine V (barres noires) ou par le test d'exclusion du bleu Trypan (barres hachurées) dans les conditions indiquées. Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM de cinq expériences indépendantes. Le symbole étoile (*) représente $p < 0,01$ par rapport au témoins.

Figures 7, 8, 9, 10, 11 et 12

Effet de la CsA, de la N-acétyl-cystéine, ou de l'E 008 sur l'apoptose des cellules endothéliales induite par une forte concentration en glucose

Les figures 7 à 11 représentent la distribution en cytométrie de flux de cellules HMEC-1 marquée par l'annexine V (FL3-H) et l'iodure de propidium (IP) (FL1-H) cultivées dans un milieu supplémenté par 5,5 mM de glucose (Fig. 7) ou 33 mM de glucose (Fig. 8-11), et en présence de CsA (Fig. 9), de N-acétyl-cystéine (Fig. 10) ou d'E 008. Les cellules en début d'apoptose se trouvent dans le quart du bas à droite, les cellules en apoptose tardive se trouvent dans le quart en haut à droite, les cellules nécrotiques dans le quart du haut à gauche, et les cellules viables dans le quart du bas à gauche.

La figure 12 représente le pourcentage de mort cellulaire mesurée par l'annexine V (barres noires) ou par le test d'exclusion du bleu Trypan (barres hachurées) dans les conditions indiquées. Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM de quatre expériences indépendantes. Le symbole étoile (*) représente $p < 0,05$ par rapport aux témoins.

Figure 13

Evaluation de la mort cellulaire induite par le tBH par détermination en marquage Western de la libération de cytochrome c

La figure 13 représente la quantification des niveaux mitochondriaux (barres noires) et cytosolique (barres blanches) en cytochrome c mesurés par densitométrie (axe des ordonnées, unités arbitraires). Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM de trois expériences indépendantes. Le symbole étoile (*) représente $p < 0,05$ par rapport aux témoins.

Figures 14 à 20**Effet de la CsA ou d'E 008 sur l'ouverture du PTP dans les cellules HMEC-1 perméabilisées**

Les figures 14 à 19 représentent la concentration en calcium externe (axe des ordonnées, en μM) en fonction du temps (axe des abscisses) pour des cellules HMEC-1 perméabilisées à la digitonine témoins (Fig. 14 et 17), directement exposées à 1 μM de CsA (Fig. 15 et 18) ou incubées avec 100 μM d'E 008 et en présence de 5 mM de succinate (Fig. 14-16) ou de 5 mM de glutamate/malate (Fig. 17-19). Les impulsions de 10 μM Ca^{++} ajoutées toutes les deux minutes sont représentées par des flèches.

La figure 20 représente la capacité de rétention de calcium (axe des ordonnées, en nmol pour 10^6 cellules) pour les conditions ci-dessus, les barres noires représentant les conditions en présence de succinate et les barres hachurées les conditions en présence de glutamate/malate. Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM pour cinq expériences séparées. Le symbole étoile (*) représente $p < 0,01$ par rapport au cellules témoins. Le symbole étoile (#) représente $p < 0,05$ par rapport à la condition en présence de 100 μM d'E 008.

Figures 21 et 22**Effet du pré-traitement par l'E 008 sur la production d' H_2O_2 par des cellules HMEC-1 perméabilisées et vivantes**

La figure 21 représente la production de ROS mesurée (H_2O_2) comme la fluorescence relative de l'Amplex Red (axe des ordonnées, unités arbitraires) en fonction du temps dans des cellules HMEC-1 perméabilisées et incubées pendant 4 h sans (témoins) ou avec 10 mM d'E 008 en présence de glutamate/malate (GM), succinate (S) ou les deux (GMS), avec l'ajout séquentiel des inhibiteurs roténone (Rot) et antimycine A (AA).

La figure 22 représente la fluorescence intracellulaire du DCF (axe des ordonnées, pourcentage d'unités de fluorescence relative (UFR)) pour des cellules vivantes préincubées avec 10 mM d'E 008 ou directement exposées à la roténone ou à l'antimycine A. Les résultats sont exprimés en prenant la fluorescence basale

des cellules témoins non traitées comme la référence 100%. Le symbole étoile (*) représente $p < 0,01$ par rapport aux cellules témoins.

Les exemples ci-après sont fournis pour illustrer l'invention et ne doivent en aucun cas être considérés comme une limite à la portée de l'invention.

EXEMPLE

Matériels et méthodes

Conditions de culture cellulaire

La lignée cellulaire endothéliale microvasculaire dermique humaine (HMEC-1) (CEA Grenoble, Angioinsem EM/0105) a été utilisée. Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence dans le milieu de culture MCB 131 supplémenté par 15% de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé par la chaleur, 2 mM de L-glutamine, 50 UI/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, 10 ng/ml de facteur de croissance endothélial (EGF), 1 µg/ml d'hydrocortisone, et maintenues dans une atmosphère humidifiée (5% CO₂) à 37°C. Les cellules ont été traitées à la trypsine puis récoltées par centrifugation à 1000 tpm pendant 10 min.

Dosage du complexe 1 mitochondrial isolé

Des monocouches confluentes de cellules HMEC-1 ont été incubées en absence et en présence de 10 mM ou 100 µM d'E 008, pendant 4 h ou 24 h respectivement. L'E 008 peut être préparé notamment selon EP 1 250 328. Les cellules ont été récoltées puis immédiatement remises en suspension dans une solution froide constituée de 20 mM de Tris, pH 7.2, 40 mM de KCl, 250 mM de saccharose, 2 mM d'EGTA, et 200 µg/ml de digitonine. Après une incubation de 5 min sur de la glace, les cellules ont été culottées (10 000 tpm pendant 10 min) pour éliminer les activités enzymatiques cytosoliques contaminantes. Les culots cellulaires perméabilisés ont été lavés avec précaution puis remis en suspension dans le tampon ci-dessus sans digitonine avant de déterminer la vitesse d'oxydation du NADH par fluorimétrie (excitation-émission, 340-460 nm) comme décrit précédemment (Detaille et al, 2005).

Mesure de la vitesse de consommation d'oxygène dans des cellules endothéliales intactes

Après une préincubation en milieu MCDB-131 avec ou sans 10 mM d'E 008, des cellules intactes HMEC-1 ($1,5 \times 10^7$ cellules/ml) ont été placées dans le récipient d'un oxygraphe à agitation, maintenu thermostatiquement à 37°C et équipé d'une électrode à oxygène Clark. La vitesse de consommation d'oxygène a été tout d'abord mesurée en l'absence de tout ajout ; ensuite, 2 µg/ml d'oligomycine, 125 µM de dinitrophénol (DNP), 3,8 µM de myxothiazol, et 1 mM de tétraméthyl-p-phénylènediamine (TMPD) + 5 mM d'ascorbate ont été ajoutés successivement.

Evaluation du métabolisme énergétique

Après l'ajout d'E 008, la réaction a été arrêtée par l'addition de 105 µL d'acide perchlorique (PCA) à 70%, et les cellules ont été détachées du fond. Le milieu externe et le lysat cellulaire ont été centrifugés à 10,000 g pendant 8 min. Après neutralisation du surnageant avec un mélange KOH (2 M) / MOPS (0,3 M), les métabolites ont été mesurés enzymatiquement sur des aliquots de cette suspension déprotéinisée. Le lactate a été dosé en ajoutant du NAD⁺ et de la lactate deshydrogenase (LDH) puis en mesurant l'apparition de NADH à 340 nm. Le pyruvate a été mesuré en ajoutant du NADH et de la LDH puis en mesurant l'oxydation du NADH à 340 nm. Le rapport lactate/pyruvate, qui est proportionnel au rapport NADH/NAD⁺, a été pris comme index du potentiel redox des cellules. Pour la détermination du contenu nucléotidique total, les cellules ont été récupérée par centrifugation et incubées sur de la glace pendant 5 min dans un mélange PCA (2,5%) / EDTA (6,25 mM). Le matériel insoluble a été éliminé par centrifugation à 12 000 g pendant 5 min, et le surnageant résultant a été neutralisé avec le mélange KOH / MOPS. Après retrait du KClO₄ précipité par centrifugation (12 000 g pendant 10 min), l'extrait final a été conservé et analysé ultérieurement par HPLC. Les concentrations d'ATP, d'ADP, et d'AMP dans les échantillons ont été calculées par comparaison avec des étalons connus.

Détection de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

La vitesse de production de H_2O_2 dans des cellules perméabilisées a été déterminée en utilisant l'oxydation de l'indicateur fluorogénique Amplex Red en présence de peroxydase de raifort. Typiquement, $2,5 \times 10^7$ cellules perméabilisées ont été incubées à 30°C dans un milieu KCl supplémenté par 1 mM EDTA et oligomycine. La production de H_2O_2 a été démarrée en utilisant soit un mélange glutamate/malate (2,5 mM) soit du succinate (2,5 mM) comme substrats. De la roténone (2-5 μM) ou de l'antimycine A (0,25 μM) ont été ajoutées séquentiellement dans le milieu d'incubation pour inhiber les activités du complexe I et du complexe III respectivement. La fluorescence a été enregistrée sur un fluorimètre à double rayon PTI Quantamaster C61 à une longueur d'onde d'excitation de 560 nm et d'émission à 582 nm. Par ailleurs, des aliquots de cellules témoins ou de cellules traitées ont été retirés puis analysés pour la production de ROS intracellulaires par la méthode au colorant diacétate de 2,7'-dichlorofluorescéine (DCF-DA). Cette méthode de mesure de l'oxydation cellulaire est basée sur la conversion, par les ROS, d'un composé non fluorescent (DCF-DA) en un composé fortement fluorescent (DCF). Après exposition à la metformine ou à l'E 008, les cellules (5×10^6) ont été récoltées, incubées dans 2 ml de NaCl 110 mM, KCl 4 mM, MgCl_2 10 mM, glucose 5,5 mM, CaCl_2 1,6 mM, NaHCO_3 14 mM, HEPES-Na 20 mM, pH 7,4, puis laissées incorporer 5 μM de DCF-DA à 37°C pendant 10 min. Après incorporation, la fluorescence du DCF fluorescence est mesurée par excitation à 503 nm et émission à 521 nm.

Détermination de la transition de perméabilité dans des cellules perméabilisées

Des cellules HMEC-1 (1×10^7) ont été incubées avec ou sans E 008 comme décrit précédemment. Les cellules ont ensuite été centrifugées et remises en suspension dans un milieu contenant 250 mM de saccharose, 10 mM de MOPS, 1 mM de Pi-Tris et 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de digitonine (pH 7,35) puis placées dans une cuve de spectrofluorimètre en quartz, sous agitation continue puis maintenue thermostatiquement à 25°C. Après 2 min, les cellules ont été perméabilisées et 1 μM de CsA ou un véhicule a été ajouté au milieu comme indiqué. Après stabilisation du signal, des pulses de 5 μl de Ca^{2+} à 4 mM ont été appliqués successivement à des intervalles de deux minutes jusqu'à l'ouverture du PTP,

comme indiqué par la libération de Ca^{2+} dans le milieu. Les mesures de Ca^{2+} ont été effectuées en fluorimétrie à l'aide d'un spectrofluorimètre PTI Quantamaster C61. Le Ca^{2+} libre a été mesuré en présence de 0,25 μM de Calcium Green-5N avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission réglées à 506 et 532 nm respectivement.

Détermination de la transition de perméabilité dans des cellules intactes

La coloration à la calcéine sur cellules vivantes a été réalisée après que les cellules (8×10^4) ont été cultivées pendant 48 heures sur des lamelles en verre circulaires de 22 mm de diamètre et exposées pendant 15 minutes à 37°C à un milieu tampon salin phosphate (PBS) supplémenté par 5 mM de glucose, 0,35 mM de pyruvate, 1 mM de CoCl_2 et 1 μM d'ester de calcéine-acétométhoxyl. Après incorporation, les cellules ont été lavées pour les débarrasser de la calcéine et du CoCl_2 puis incubées pour encore 20 minutes à 37°C dans le milieu PBS/glucose/pyruvate. Les lamelles ont alors été montées sur le champ d'un microscope inversé et l'ouverture des PTP a été réalisée par l'ajout de 100 μM d'hydropéroxyde de *tert*-butyl (tBH). Les prises de vue des cellules ont été effectuées à l'aide d'un microscope confocal LEICA TCS SP2 à laser argon émettant à 488 nm et deux lasers hélium-néon émettant à 543 et 633 nm, respectivement. Les images de cellules ont été enregistrées toutes les minutes avec un temps d'exposition constant à l'aide d'un objectif à immersion en eau 63X/1.20 Plan Apo.

Quantification de la mort des cellules endothéliales

Les cellules HMEC-1 ont été préincubées soit avec 10 mM soit avec 100 μM d'E 008 comme décrit précédemment. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS avant d'être exposées à 0,5 mM de tBH pendant 45 minutes dans un milieu de culture dépourvu de SVF et de facteurs de croissance. Les cellules ont à nouveau été lavées par du PBS puis incubées à 37°C pendant 24 heures dans un milieu MCDB complet. Pour l'induction de la mort cellulaire par le glucose, les cellules ont été exposées à 5,5 mM glucose (cellules témoins) ou à 33 mM glucose pendant 48 h. La cytotoxicité a été évaluée soit par le test d'exclusion du bleu trypan (5%) soit par cytométrie de flux à l'aide du kit Annexin V-Fluoprobe.

Etude de la libération du cytochrome c par marquage Western et immunohistochimie

Le cytochrome c a été évalué à la fois dans les espaces mitochondriaux et cytoplasmiques après que les cellules HMEC-1 ont été fractionnées à l'aide de digitonine comme décrit auparavant pour le dosage du complexe I. Les protéines cytosoliques (15 µg) et mitochondriales (25 µg) ont été séparées par SDS/PAGE (gel à 10%) en tampon MES, puis analysées par marquage Western. Les membranes ont été marquées par l'anticorps monoclonal clone 7H8.2C12 dirigé contre le cytochrome c (1 µg/ml), et révélées à l'aide d'un anticorps de chèvre anti-souris secondaire marqué à la peroxydase de raifort et d'une détection chimioluminescente.

Pour la visualisation de la libération du cytochrome c par immunohistochimie, les cellules ont été fixées dans un mélange paraformaldéhyde 3,7% / PBS pendant 20 min, perméabilisées dans 0,2 % de Triton X-100 pendant 5 min, puis bloquées dans 2% de sérum albumine bovine (SAB) / PBS (tampon de blocage) pendant 1 h. Les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps monoclonal de souris anti-cytochrome c (clone 6H2.B4,) pendant 2 h, puis exposées à un anticorps secondaire anti-souris marqué à l'Oregon Green pendant 1 h à température ambiante dans le noir. Après des lavages finaux, un mélange composé de 0,2 M de Tris-HCl, pH 7,8, 90% de glycérol, et 2,3% de 1,4-diazobicyclo-[2.2.2]-octane (DABCO, agent antidécoloration) a été appliqué et les préparations cellulaires ont été visualisées à l'aide d'un microscope confocal avec l'objectif à immersion en eau 63X/1.20 Plan Apo. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission pour l'Oregon Green étaient de 488 et 525 nm, respectivement. Des images de cellules, choisies au hasard en microscopie inversée à contraste de phase, ont été numérisées à une résolution de 512 x 512 pixels. Généralement, huit champs de vue distincts ont été numérisés par lamelle de verre.

Résultats

Prévention de la mort cellulaire par l'E 008

L'effet de l'E 008 sur la mort cellulaire endothéliale due au tBH (Fig. 1-6) ou par exposition à une concentration élevée de glucose (Fig. 7-12) a été étudiée par cytométrie de flux et le test d'exclusion du bleu trypan.

L'exposition de cellules HMEC-1 au tBH a conduit à une augmentation
5 conséquente de l'apoptose/nécrose tardive dans la mesure où la plupart des cellules endothéliales endommagées étaient positives à la fois à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Des pourcentages semblables de coloration ont été obtenus avec le bleu trypan, indiquant que les cellules mortes étaient pour l'essentiel nécrotiques. De façon intéressante, l'effet délétère du tBH a été complètement
10 empêché par l'E 008, de façon indépendante de la durée et de la concentration utilisée (10 mM ou 100 μ M, respectivement pendant 4 heures ou 24 heures). De plus, cette réponse n'était pas différente de celle de la cyclosporine A (CsA), l'inhibiteur de référence du PTP dont les effets bénéfiques vis-à-vis de la toxicité due au stress oxydatif ont été largement documentés (Bernadi P., Biochimica et
15 Biophysica Acta (1996), 1275, 5).

Par ailleurs, lorsque les cellules HMEC-1 ont été cultivées en présence de concentrations élevées de glucose (33 mM), une augmentation significative d'un facteur 2,5 de la mort cellulaire a été obtenue après une durée d'incubation de 48 heures. Comme cela a été démontré précédemment, l'effet délétère d'une grande
20 concentration de glucose est complètement supprimé par la N-acétyl-cystéine (un agent anti-oxydant) et la CsA. De manière remarquable, l'E 008 permet de diminuer de manière marquée la mort cellulaire endothéliale quelle que soit la dose.

Sur la base de ces résultats prometteurs, l'impact de l'E 008 sur la voie
25 mitochondriale contrôlant la mort cellulaire a été davantage étudié.

L'E 008 prévient la libération de cytochrome c liée au tBH et à une forte concentration de glucose

Afin de s'assurer de manière certaine de l'effet positif de l'E 008 sur la mort
30 cellulaire, les inventeurs ont étudié la distribution subcellulaire du cytochrome c dans des cellules HMEC-1 traitées ou non par cet agent antidiabétique, puis transitoirement exposées à 500 μ M de tBH.

En effet, il est reconnu que la libération de cytochrome c à partir de l'espace intermembranaire mitochondrial est une étape clef du processus d'engagement de la mort cellulaire (Shahzidi and al. ; *Toxicology and Oncology* (2006), 25, 159, Liu Yajun, Shandong Daxue Xuebao, Yixueban (2007), 45, 336).

5 Le contenu en cytochrome c des compartiments mitochondrial et cytosolique a été déterminé par une analyse en marquage Western. Les inventeurs ont remarqué que bien que le cytochrome c soit fortement détecté dans le cytoplasme des cellules témoins, le traitement au tBH a provoqué une augmentation significative des niveaux cytosoliques (Fig. 13). Cette augmentation
10 a été complètement empêchée par 10mM ou 100μM d'E 008, ainsi que par la CsA. Ni l'E 008 aux deux concentrations, ni la CsA n'ont modifié le contenu mitochondrial en cytochrome c, ce qui indique que seule une proportion très limitée a diffusé vers l'extérieur de la mitochondrie. De ce fait, la relation entre la cytotoxicité due à une forte concentration en glucose, la fuite du cytochrome c et
15 l'effet de l'E 008, a été contrôlée de façon différente, *i.e.* par imagerie confocale à fluorescence. Il est ainsi observé que le cytochrome c, dans les cellules HMEC-1 témoins, est localisé dans la mitochondrie, qui apparaît comme une fine structure filamenteuse autour du noyau. Après 48 h d'incubation, le glucose à 33 mM a induit une libération du cytochrome c dans certaines cellules endothéliales. De
20 façon remarquable, cet événement a été empêché par l'E 008 aux deux concentrations.

L'E 008 module l'ouverture du PTP dans les cellules HMEC-1 perméabilisées et vivantes

25 Comme l'E 008 produit un effet protecteur prononcé comparable à celui de la CsA, les inventeurs se sont ensuite demandé si l'E 008 modulait l'ouverture sensible à la CsA du PTP opening dans les cellules endothéliales.

Il a ainsi pu être montré qu'en présence de succinate comme substrat respiratoire, les cellules HMEC-1 perméabilisée à la digitonine, absorbent et
30 retiennent le Ca^{2+} jusqu'à ce que la charge de Ca^{2+} atteigne une valeur seuil induisant la transition de perméabilité mitochondriale, comme déterminé par une libération rapide de Ca^{2+} dans le milieu (Fig 14). De plus, les inventeurs on montré que (i) cet événement avait également lieu lorsque les mitochondries de ces

cellules perméabilisées avaient pour source d'énergie du glutamate/malate (Fig. 17, 20), et (ii) la CsA retardait pareillement l'ouverture du PTP dans les deux conditions expérimentales (Fig. 15, 18, 20). Il est notable que bien qu'il soit légèrement moins puissant que la CsA, l'inhibiteur de l'ouverture du PTP de référence, l'E 008 augmente de manière significative la quantité de calcium nécessaire pour l'ouverture du PTP, quelle que soit la nature des substrats respiratoires (Fig. 16, 19, 20).

Par comparaison, la roténone ou la metformine n'inhibent l'ouverture du PTP qu'en présence de succinate seul, une condition dans laquelle ces composés n'affectent pas la chaîne respiratoire.

Afin de mieux juger ce dernier résultat, les inventeurs ont également analysé l'effet de l'E 008 sur la modulation sensible à la CsA du PTP *in situ*, l'ouverture du pore induite par le tBH étant directement déterminée dans des cellules HMEC-1 en contrôlant la perméabilité mitochondriale à la calcéine et au cobalt comme décrit précédemment (Detaile *et al.* (2005) *Diabetes* 54:2179-2187 ; El-Mir *et al.* (2008) *J. Mol. Neurosci.* 34:77-87).

Il apparaît que 10 mM ou 100 μ M d'E 008 diminuent de manière conséquente l'effet du tBH sur le quenching de fluorescence liée à la calcéine. Ainsi, après un changement de perméabilité dû à une exposition des cellules endothéliales vivantes à du tBH seul, la fluorescence intracellulaire s'est progressivement décompartmentalisée et a subi un quenching en quelques minutes, toutefois l'hétérogénéité cellulaire et l'intensité de fluorescence ont persisté jusqu'à 10 min en présence de l'E 008. A partir de ces résultats, il convient de considérer ce composé comme un nouvel inhibiteur du PTP dans la mesure où il empêche, comme la CsA et la metformine, la transition de perméabilité mitochondriale à la fois dans les cellules endothéliales perméabilisées et intactes.

Impact de l'E 008 sur la respiration mitochondriale : absence d'effet sur le complexe I de la chaîne respiratoire

Il a pu être démontré ces dernières années que l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire empêchait la mort cellulaire induite par les ROS par

l'intermédiaire d'un processus dépendant de l'ouverture du PTP mitochondrial (Chauvin et al, 2001; Guigas et al, 2004; Demaille et al, 2005).

Comme l'E 008 diminue fortement la mort cellulaire des cellules endothéliales liée à l'ouverture du PTP, les inventeurs ont ensuite déterminé si les effets préventifs de l'E 008 pouvaient trouver leur origine dans une modulation de l'activité de la chaîne respiratoire.

Contrairement à la metformine, l'E 008, à 10 mM ou 100 μ M, n'inhibe pas l'activité du complexe I sensible à la roténone dans les cellules endothéliales (Tableau 1, partie A). De plus, ce composé, même à la concentration la plus élevée, n'inhibe pas de manière significative la consommation d'oxygène et le métabolisme énergétique cellulaire dans les cellules HMEC-1 intactes (Tableau 1, partie B).

Une conséquence majeure de cette absence d'effet est qu'aucune augmentation consécutive de la production de lactate n'a été enregistrée dans ces cellules. En parallèle, aucune modification significative du contenu en nucléotides de type adénine n'a pu être mise en évidence.

Ces dernières conclusions s'opposent fortement aux résultats obtenus à partir de plusieurs études conduites à partir de différents antidiabétiques bien connus comme la metformine et les thiazolidinediones (TZD).

Au-delà de son action protectrice sur la mort cellulaire induite par le stress oxydatif, la metformine est reconnue comme inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire dans différents types cellulaires. Ceci peut conduire à une stimulation de la glycolyse qui est caractérisée à la fois par une augmentation de la production de lactate et un rapport ATP/ADP diminué (Tableau 1). Ces réponses défavorables sont vraisemblablement responsables, au moins en partie, des effets secondaires de la metformine, notamment chez les patients diabétiques présentant des prédispositions au développement de différentes complications.

Effet de l'E 008 sur la production de ROS détectée par fluorescence dans des cellules endothéliales vivantes et après perméabilisation

Devant cette absence d'effet d'E 008 sur la respiration cellulaire *versus* son impact sur la transition de perméabilité mitochondriale (Fig. 14-20), les inventeurs se sont intéressés à la production de ROS. En effet, ce paramètre a été

récemment identifié comme étant beaucoup plus sensible à l'ouverture du PTP qu'à l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire (Batandier et al, 2004).

La production de ROS a été déterminée comme étant la fluorescence relative de l'Amplex Red ou de la sonde DCF, dans des cellules HMEC-1 perméabilisées ou intactes respectivement. Il convient de noter que les cellules perméabilisées ont dû être étudiées durant la respiration de stade 4, c'est à dire en présence d'oligomycine, pour détecter une production de départ d'H₂O₂ quels que soient les substrats respiratoires.

Comme cela est représenté dans la Fig. 21, Tableau 2, un unique ajout des substrats du complexe I glutamate-malate à des cellules témoins HMEC-1 perméabilisées a conduit à une production conséquente de ROS, qui a été encore augmentée par la roténone et l'antimycine ajoutées séquentiellement, bien qu'à un niveau moindre. De façon inattendue, la production basale de ROS n'a pas été exacerbée lorsque ces cellules ont été alimentée en succinate uniquement, comme c'est le cas pour les mitochondries isolées (Batandier et al, 2006).

Toutefois, l'ajout de roténone inhibe de manière marquée la formation d'H₂O₂ dans cette condition particulière, mais également lorsque le succinate est présent en même temps que le glutamate/malate, ce qui reflète de manière évidente l'existence d'un flux inverse d'électrons à travers le complexe I dans les cellules endothéliales perméabilisées. De façon particulièrement remarquable, l'E 008 ne modifie pas la production de ROS en présence de glutamate/malate mais diminue significativement la production de ROS liée au flux inverse d'électrons. Au contraire, la production de ROS liée à l'antimycine n'est pas modifiée par un pré-traitement à l'E 008. Ces résultats ont également été confirmés sur des cellules HMEC-1 vivantes pour lesquelles la production de ROS endogènes a été mesurée après avoir chargé des cellules intactes avec du DCF-DA (Fig. 22).

Par ailleurs, lorsque le succinate et le glutamate/malate sont ajoutés de manière séquentielle, la production de ROS est réduite de manière marquée par l'E 008. Ce dernier effet reflète vraisemblablement une situation physiologique car il se produit en présence d'un apport d'électron au deux sites 1 et 2, comme cela est le cas dans les cellules vivantes. Les résultats montrent que l'E 008 est capable de moduler la production intracellulaire de ROS dans les cellules HMEC-1

quiescentes. Comme la production de ROS due au flux inverse d'électrons au niveau du complexe I est également régulée par l'oxydation du glutamate/malate, la propriété unique de l'E 008 d'inhiber le flux inverse d'électron sans affecter l'activité du complexe I contribue vraisemblablement à son intérêt comme nouvel agent thérapeutique.

Tableau 1 : Effet de l'E 008 sur l'activité sensible à la roténone du complexe I, sur la vitesse de consommation de l'oxygène, et sur le métabolisme énergétique dans les cellules HMEC-1. **(A)** Les cellules endothéliales ont été incubées pendant 4 ou 24 h en l'absence (témoins) ou en présence de l'E 008 aux concentrations indiquées. Des cellules perméabilisées ont été utilisées pour la détermination de l'activité du complexe I. Les données sont la moyenne $\pm$ ESM de quatre préparations différentes. **(B)** Après l'incubation des cellules HMEC-1 avec 10mM d'E 008, la vitesse de respiration cellulaire (JO_2) a été mesurée avant et après les différents ajouts représentés. Par ailleurs, la production de lactate, le rapport lactate/pyruvate, le contenu en nucléotide, et le rapport ATP/ADP ont été déterminés. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ ESM de cinq préparations différentes.

(A)

	TémoinsI	E 008 (10mM – 4 h)	E 008 (100μM – 24 h)
Activité totale J NADH (nmol NADH/min/ 10^7 cellules)	1,43 $\pm$ 0,034	1,39 $\pm$ 0,049	1,44 $\pm$ 0,042
Après l'ajout de roténone (10μM) (nmol NADH/min/ 10^7 cellules)	0,39 $\pm$ 0,035	0,39 $\pm$ 0,043	0,38 $\pm$ 0,049
Activité du complexe I sensible à la roténone (nmol NADH/min/ 10^7 cells)	1,035 $\pm$ 0,027	0,99 $\pm$ 0,033	1,056 $\pm$ 0,022

(B)

JO_2 (Natome O/min/mg protéine)	Métabolisme énergétique cellulaire
--------------------------------------	------------------------------------

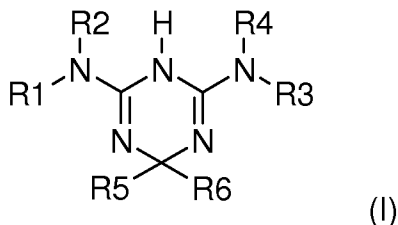
	Témoins		E 008		Témoins		E 008
				<i>J</i> lactate			
Sans ajout	4,95 ± 0,14		4,63 ± 0,22	($\mu\text{molNADH}/30\text{min}/\text{mg}$	3,65 ± 0,27		3,81 ± 0,30
				protéine)			
+ Oligomycine	1,62 ± 0,04		1,57 ± 0,03	Rapport	1,59 ± 0,11		1,65 ± 0,13
				Lactate/Pyruvate			
+ DNP	9,1 ± 0,76		9,18 ± 0,41	Contenu en ATP	83,9 ± 4,37		81,6 ± 1,7
				(nmol/mg prot)			
+ myxothiazol	0,92 ± 0,13		0,92 ± 0,13	Cotenu en ADP	17,28 ±		17,38 ±
				(nmol/mg prot)	3,07		1,38
+ TMPD-a	18,97 ± 1,43		19,20 ± 1,11	Rapport ATP/ADP	5,09 ± 0,70		4,8 ± 0,25

Tableau 2 : Production d'H₂O₂ dans des cellules HMEC-1 perméabilisées et incubées pendant 4 h sans (témoins) ou avec 10 mM d'E 008 en présence de glutamate/malate, succinate, ou les deux, avec l'ajout séquentiel des inhibiteurs roténone et antimycine A. Les résultats sont exprimés come la moyenne de cinq expérience distinctes. Le symbole étoile (*) représente $p < 0,01$ par rapport aux cellules témoins alimentées par du succinate seul ou en association avec du glutamate/malate.

H ₂ O ₂ (pmol/min/10 ⁶ cellules HMEC-1)						
	Glutamate + Malate		Succinate		Glutamate + Malate + Succinate	
Ajouts	Témoins	E 008	Témoins	E 008	Témoins	E 008
Aucun	32,3 ± 2,4	28,4 ± 2,2	25,7 ± 3,0	14,5 ± 1,3*	22,3 ± 1,5	15,7 ± 1,4*
Roténone	38,3 ± 3,2	37,5 ± 1,5	10,7 ± 1,8	11,4 ± 2,7	7,8 ± 0,9	6,9 ± 1,1
Roténone + antimycine A	51 ± 4,8	51,4 ± 8,7	20,1 ± 3,3	19,1 ± 3,2	20,5 ± 1,4	18,6 ± 1,3

Revendications

1. Composé de formule générale (I) suivante :



dans laquelle :

- R1, R2, R3, et R4 sont choisis indépendamment parmi les groupes :

- H,

- alkyle (C1-C20) substitué ou non par halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), cycloalkyle (C3-C8), alkényle (C2-C20) substitué ou non par halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkyne (C2-C20) substitué ou non par halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5),

- cycloalkyle (C3-C8) substitué ou non par alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5),

- hétérocycloalkyle (C3-C8) portant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, O, S et substitué ou non par alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5),

- aryl (C6-C14) alkyle (C1-C20) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

- aryl (C6-C14) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

- hétéroaryle (C1-C13) portant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, O, S et substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

R1 et R2, d'une part, et R3 et R4, d'autre part, pouvant former avec l'atome d'azote un cycle à n chaînons (n compris entre 3 et 8) comprenant ou non un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, O, S et pouvant être substitué par un ou plusieurs groupements suivants : amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5),
5 alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

- R5 et R6 sont choisis indépendamment parmi les groupes :

-H,

10 -alkyle (C1-C20) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

-alkényle (C2-C20) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène,
15 alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

-alkynyle (C2-C20) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-
20 C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

-cycloalkyle (C3-C8) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-
C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy,
25 carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

-hétérocycloalkyle (C3-C8) portant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, O, S et substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou
30 carboxyéthyle,

-aryl (C6-C14) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy,

aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

-hétéroaryle (C1-C13) portant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, O, S et substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5),
5 alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

- aryl (C6-C14) alkyle (C1-C5) substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5),
10 aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

R5 et R6 pouvant former avec l'atome de carbone sur lequel ils sont fixés un cycle à m chaînons (m compris entre 3 et 8) comprenant ou non un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, O, S et pouvant être substitué par amino, hydroxy,
15 thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

ou pouvant former avec l'atome de carbone un reste polycyclique en C10-C30 substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy
20 (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,

R5 et R6 pouvant également représenter ensemble le groupement =O ou =S, l'atome d'azote d'un groupe hétérocycloalkyle ou hétéroaryle pouvant être
25 substitué par un groupe alkyle (C1-C5), cycloalkyle (C3-C8), aryl(C6-C14), aryl(C6-C14)alkyle(C1-C5) ou acyle(C1-C6),

ainsi que les formes tautomères, énantiomères, diastéréoisomères et épimères et les sels pharmaceutiquement acceptables de celui-ci,
pour son utilisation dans la prévention ou le traitement du stress oxydatif ou des
30 maladies associées au stress oxydatif.

2. Composé de formule générale (I) selon la revendication 1, dans laquelle R5 est l'hydrogène.

3. Composé de formule générale (I) selon la revendication 1, dans laquelle R5 et R6 :

- forment avec l'atome de carbone sur lequel ils sont fixés un cycle à m chaînons (m compris entre 3 et 8), comprenant ou non un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, O, S et pouvant être substitué par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle,
- ou forment avec l'atome de carbone un reste polycyclique en C10-C30 substitué ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle.

4. Composé de formule générale (I) selon la revendication 1, dans laquelle R5 est un groupe alkyle (C1-C20) substitué par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle.

5. Composé de formule générale (I) selon la revendication 1, dans laquelle R5 et R6 sont choisis parmi des groupes alkyles (C1-C20) substitués ou non par amino, hydroxy, thio, halogène, alkyle (C1-C5), alkoxy (C1-C5), alkylthio (C1-C5), alkylamino (C1-C5), aryl (C6-C14) oxy, aryl (C6-C14) alkoxy (C1-C5), cyano, trifluorométhyle, carboxy, carboxyméthyle ou carboxyéthyle.

6. Composé selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle R6 est un groupe alkyle (C1-C20).

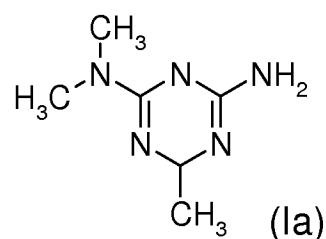
7. Composé de formule générale (I) selon la revendication 6, dans laquelle R6 est un groupe méthyle.

8. Composé de formule générale (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans laquelle R1 et/ou R2 représente(nt) un groupe alkyle (C1-C20).

9. Composé de formule générale (I) selon la revendication 8, dans laquelle R1 et
5 R2 représentent un groupe méthyle.

10. Composé de formule générale (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans laquelle R3 et/ou R4 représente(nt) un atome d'hydrogène.

10 11. Composé de formule générale (I) selon la revendication 1, caractérisé en ce que le composé de formule générale (I) est le composé de formule (Ia):



ou une de ses formes tautomères, énantiomères, diastéréoisomères et épimères
et/ou sels pharmaceutiquement acceptables.

15

12. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le composé est la (+)
5,6-dihydro-4-diméthylamino-2-imino-6-méthyl-1,3,5-triazine ou son chlorhydrate.

13. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le composé est la (-)
20 5,6-dihydro-4-diméthylamino-2-imino-6-méthyl-1,3,5-triazine ou son chlorhydrate.

14. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé
en ce que le composé est sous forme de chlorhydrate.

25 15. Composé de formule générale (I) selon l'une des revendications 1 à 14, dans
lequel les maladies associées au stress oxydatif sont sélectionnées dans le
groupe constitué de l'athérosclérose, des maladies cardiovasculaires, des
neuropathies diabétiques, des maladies neurodégénératives, telles que la maladie

d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, de la maladie chronique du poumon (« Chronic Lung disease ») et des cancers.

16. Composé de formule générale (I) selon l'une des revendications 1 à 14, pour
5 la prévention ou l'inhibition de l'apoptose liée au stress oxydatif.

17. Composé de formule générale (I) selon l'une des revendications 1 à 16, dans lequel le stress oxydatif est lié à un trouble hyperglycémique.

10 18. Composé de formule générale (I) selon l'une des revendications 1 à 17, pour la prévention ou le traitement des maladies microvasculaires ou des neuropathies liées à un diabète de type II.

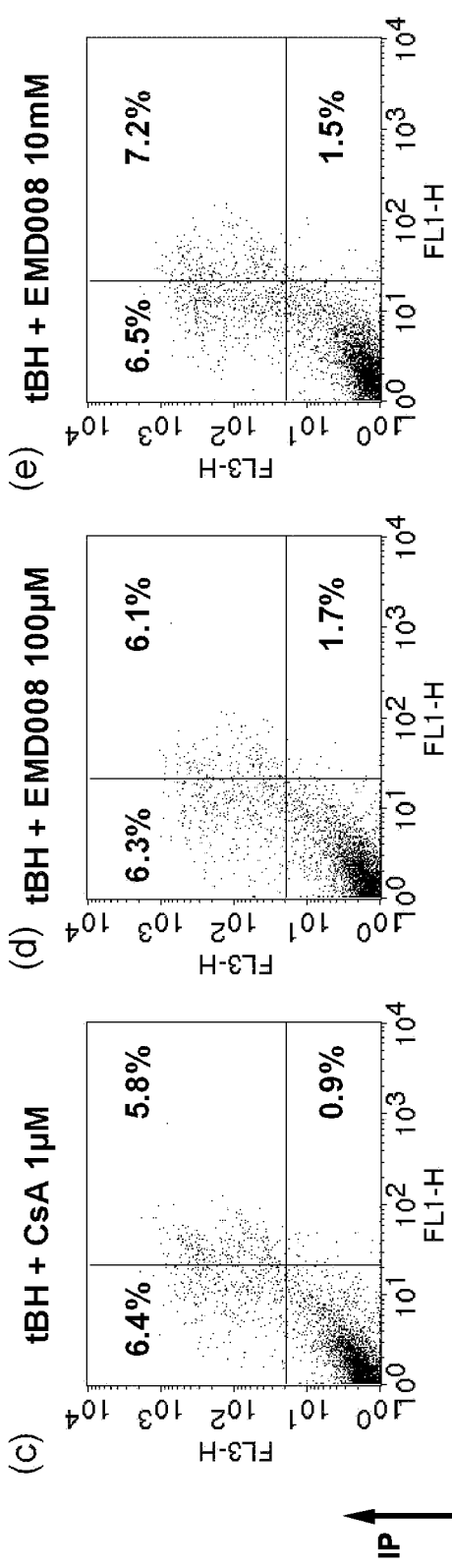
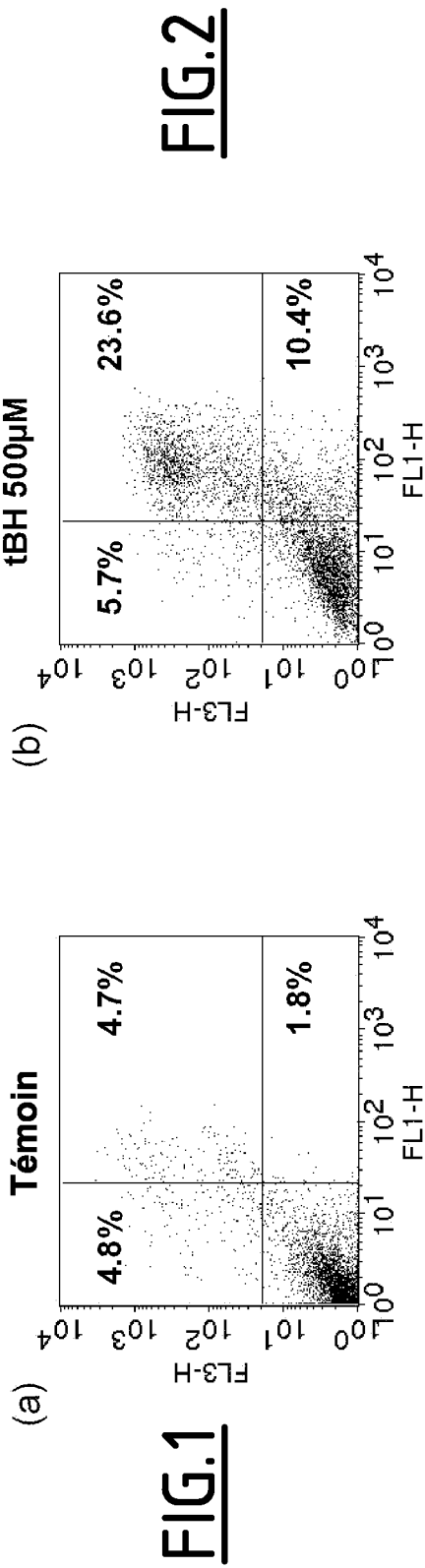
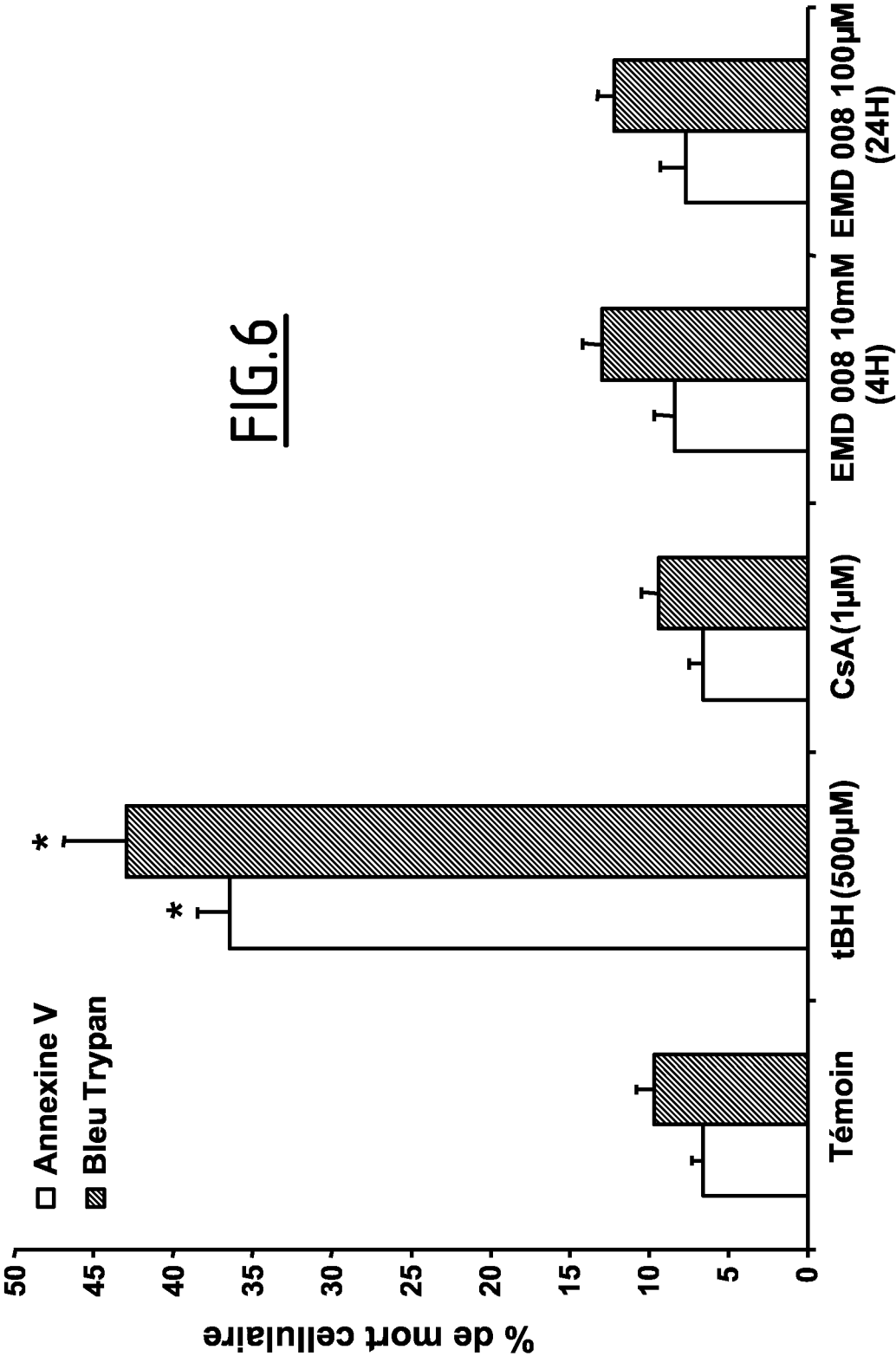


FIG.5

FIG.4

FIG.3

IP
Annexine V



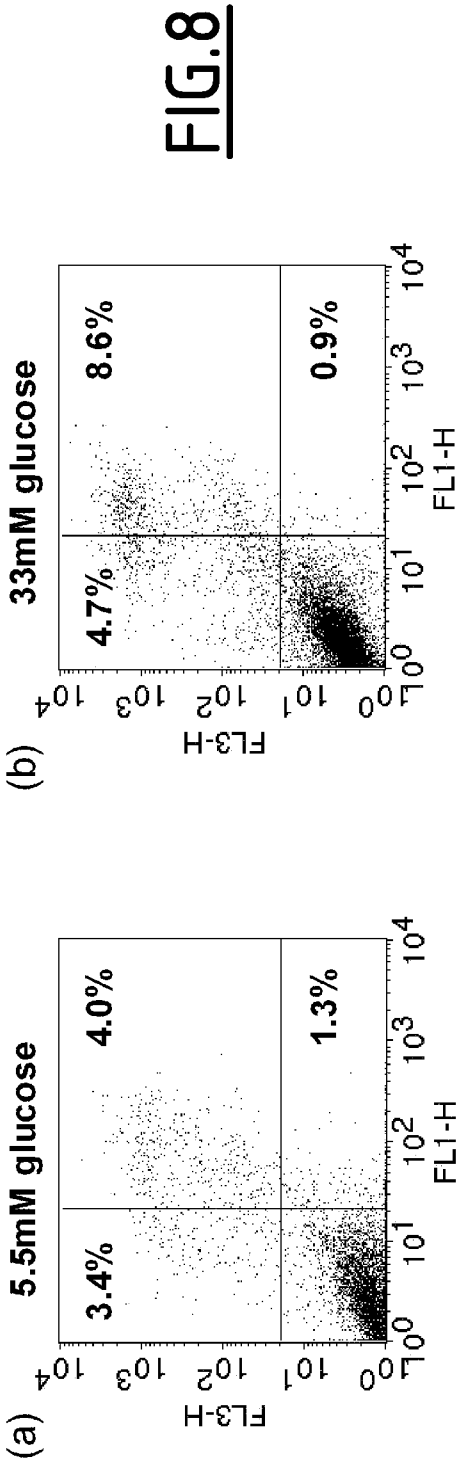


FIG.7

FIG.8

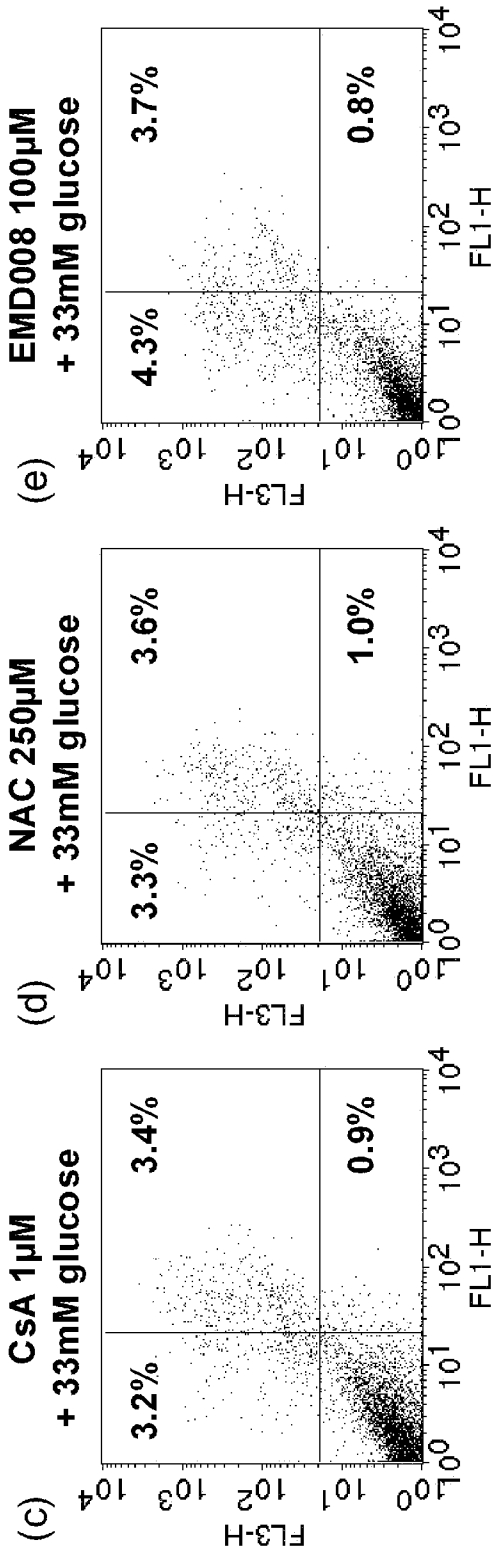


FIG.9

FIG.10

FIG.11

IP

Annexine V

FIG.12

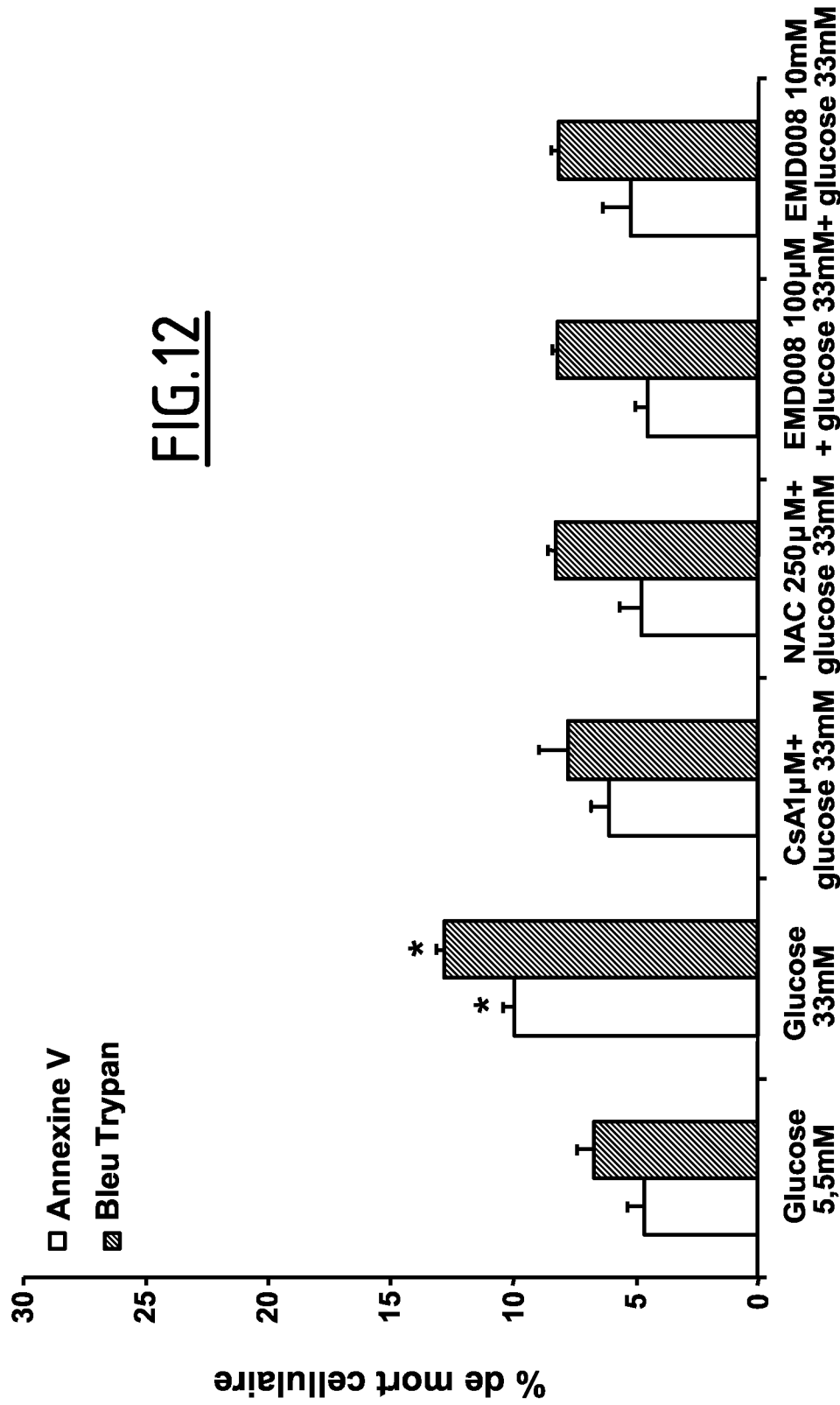
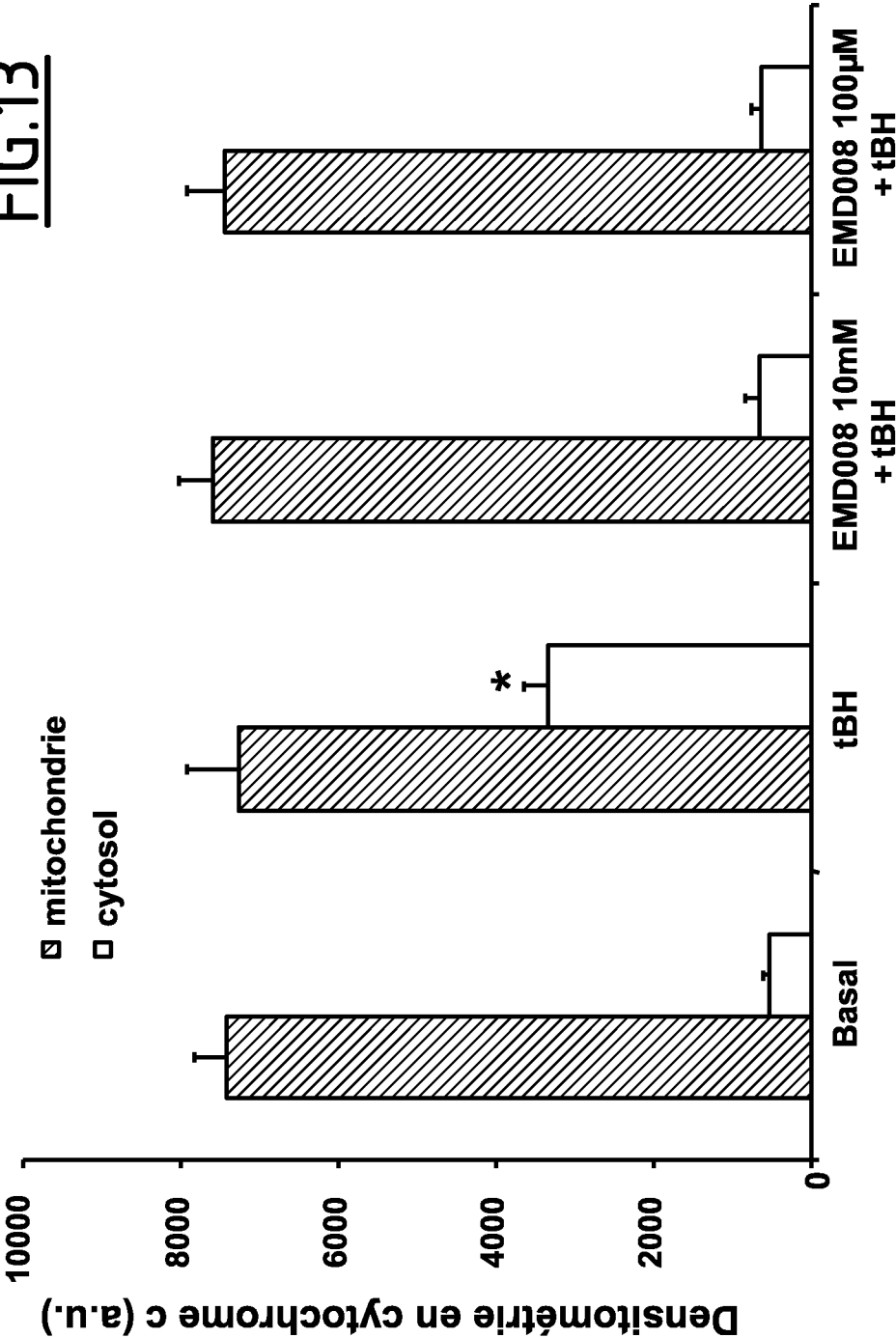


FIG.13



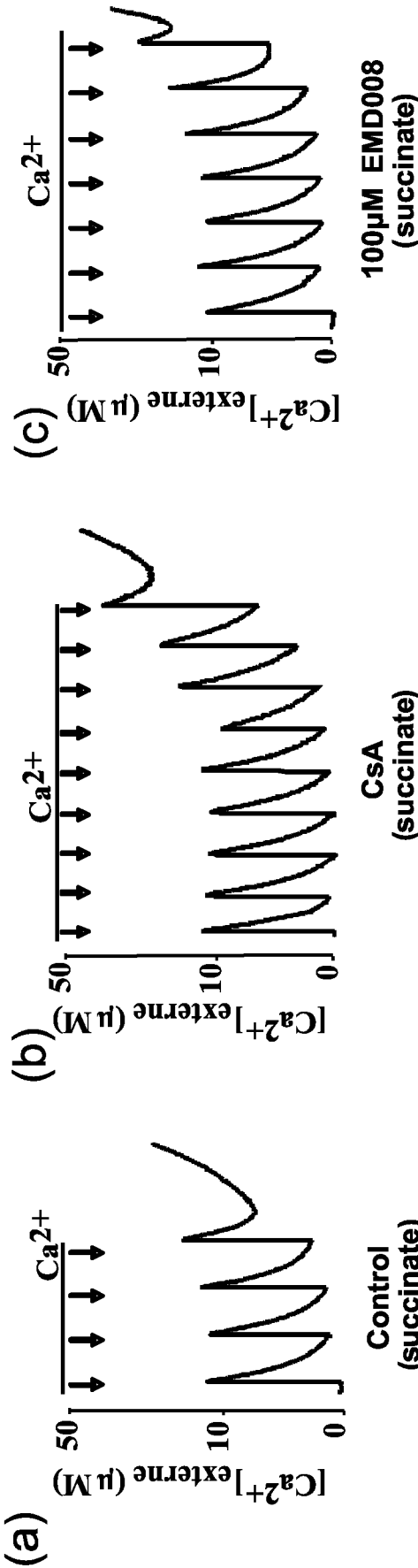


FIG.14

FIG.15

FIG.16

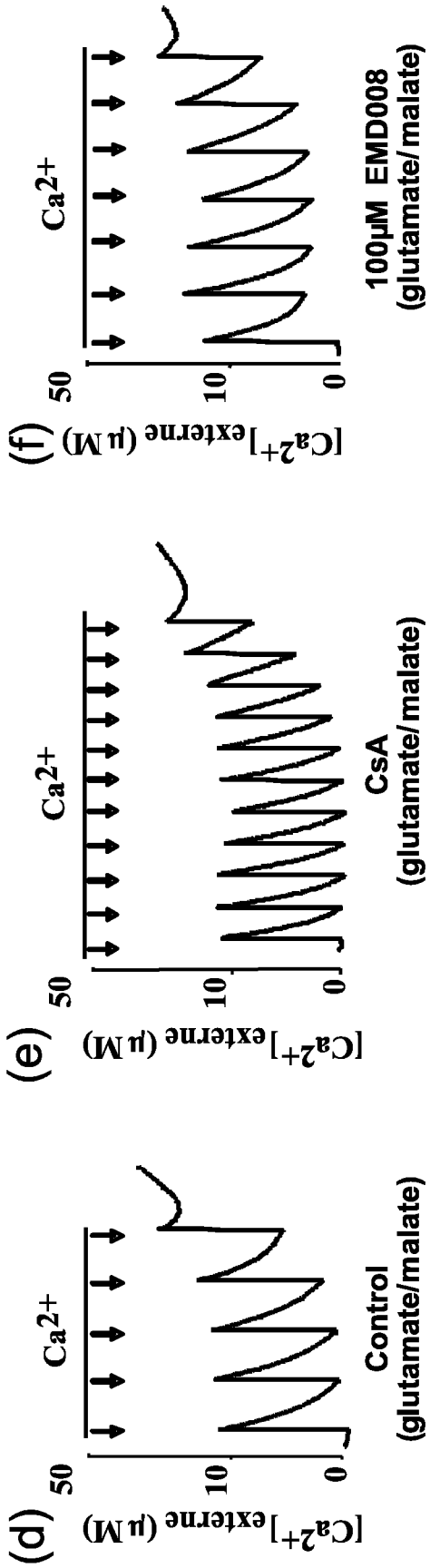
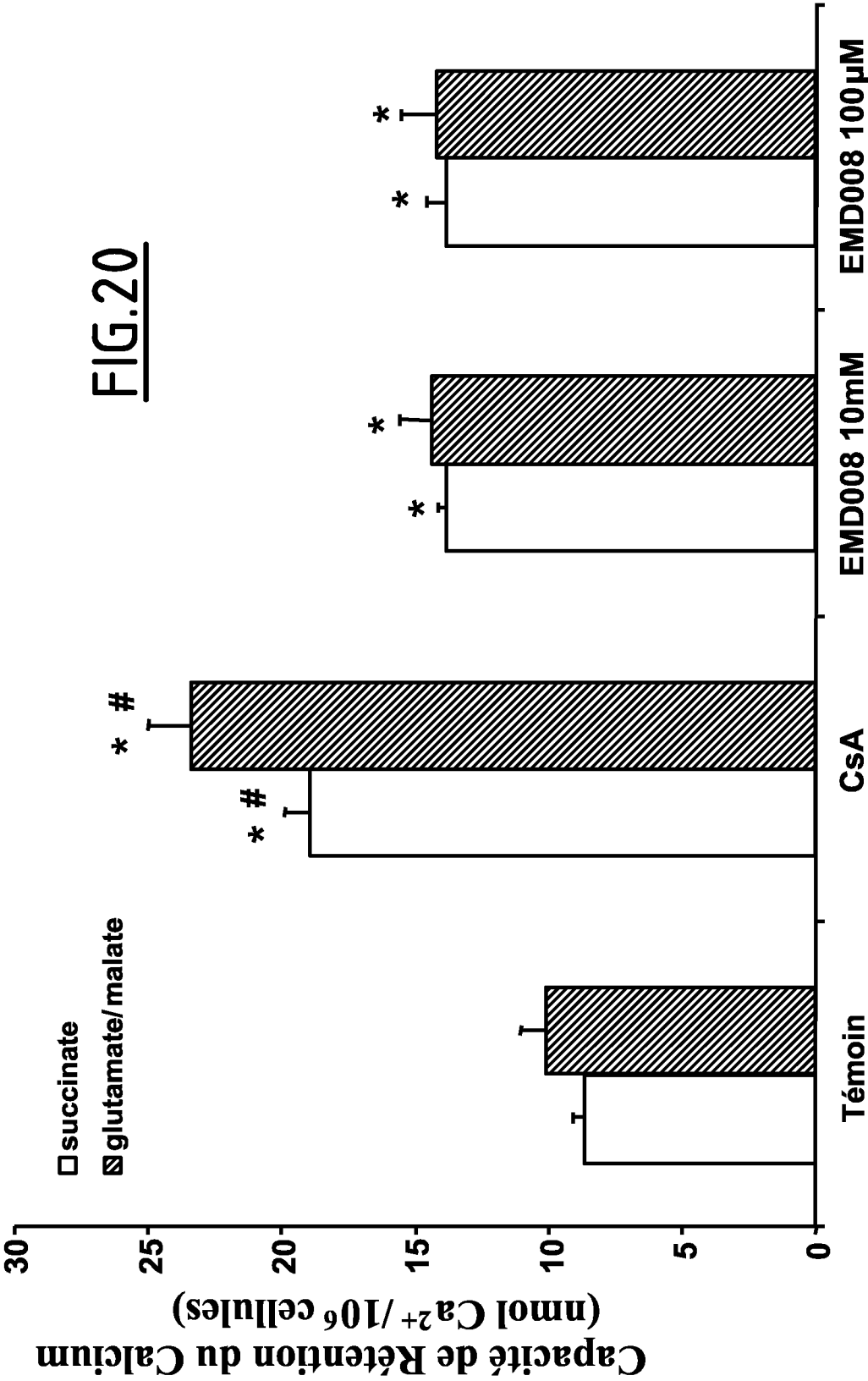


FIG.17

FIG.18

FIG.19



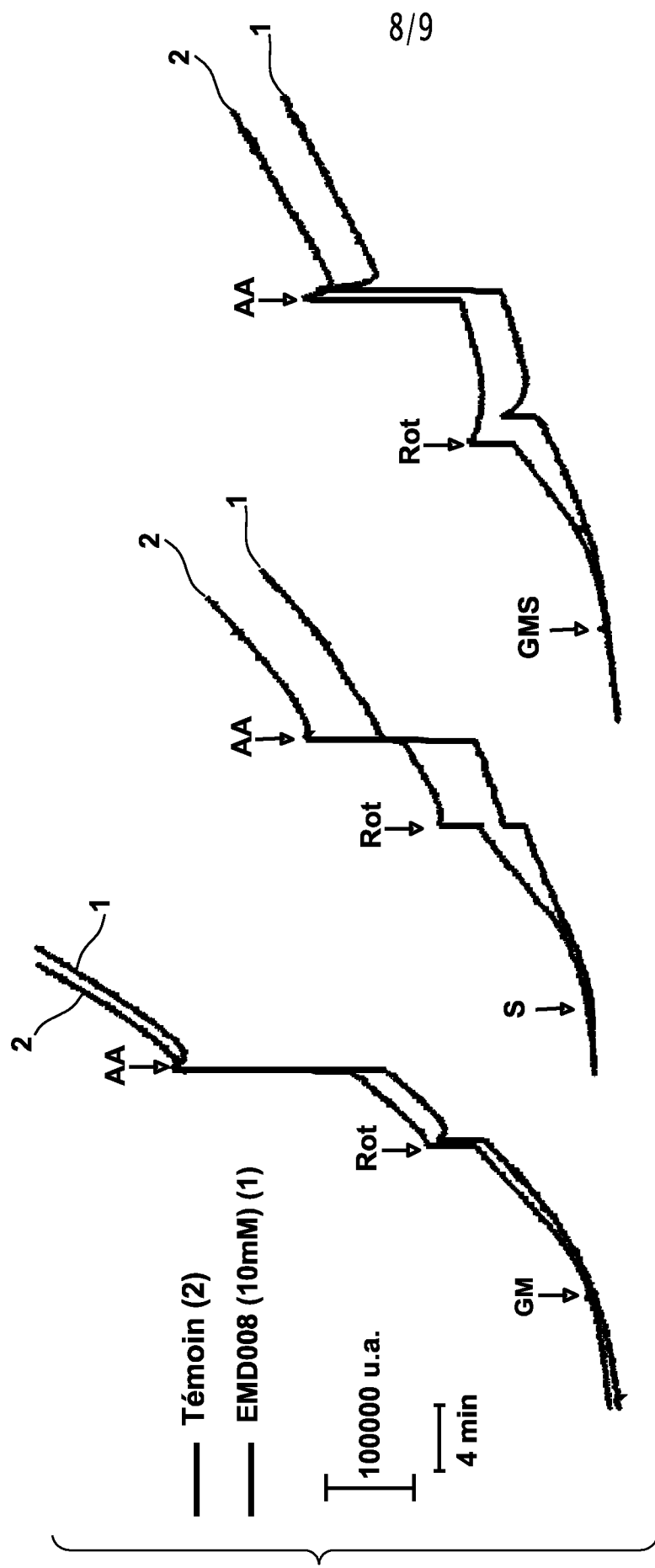


FIG.21

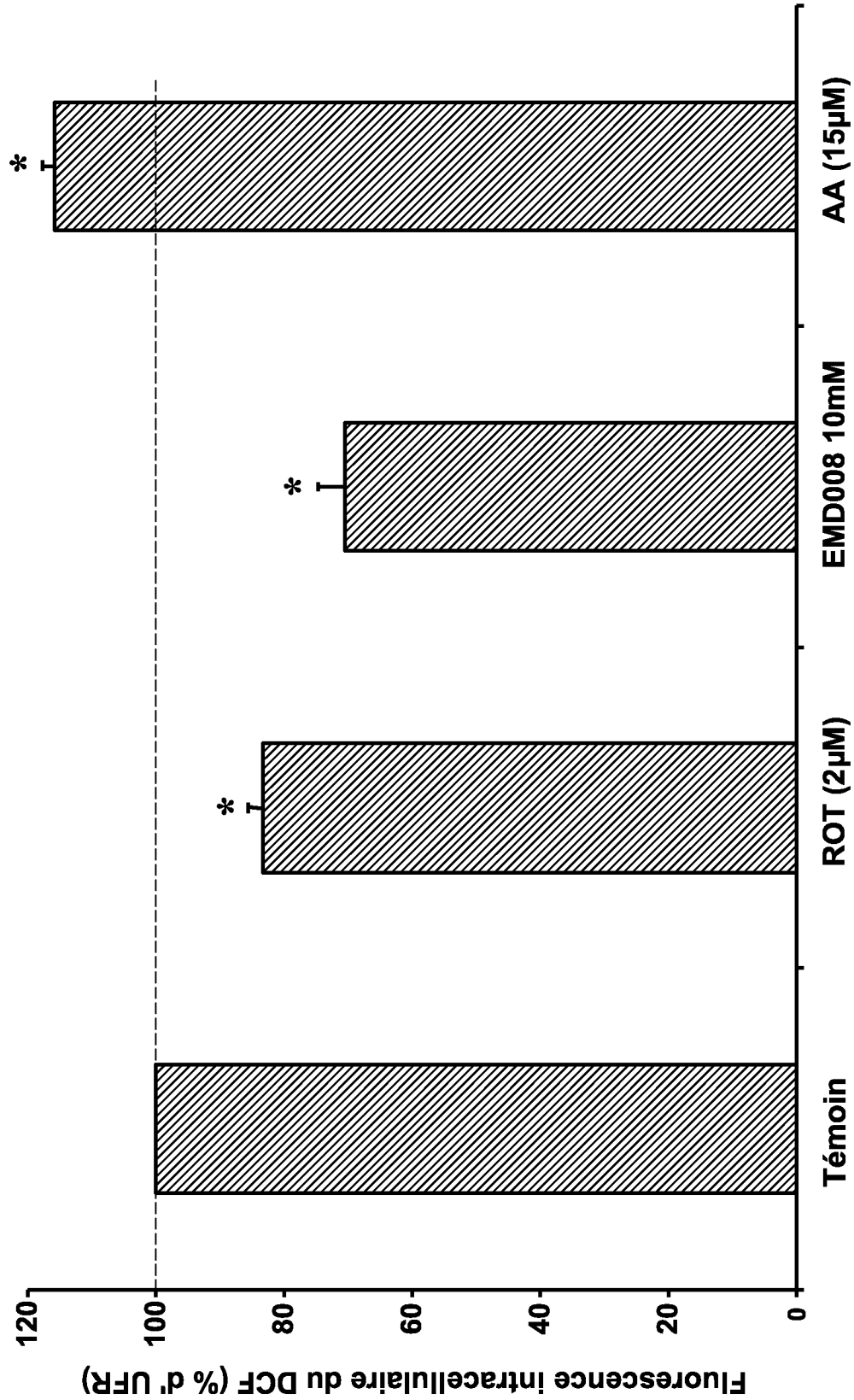


FIG.22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/060290

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/53 A61P9/10 A61P25/28 A61P35/00
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

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, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/55122 A1 (LIPHA [FR]; MOINET GERARD [FR]; CRAVO DANIEL [FR]; DOARE LILIANE [FR];) 2 August 2001 (2001-08-02) claims 1-7, 10-13 page 6, line 3 - page 7, line 4 -----	1-18
X	FR 2 896 159 A1 (MERCK SANTE SOC PAR ACTIONS SI [FR]) 20 July 2007 (2007-07-20) claims 1, 7-9, 24-26 -----	1-18
X	FR 2 853 650 A1 (MERCK SANTE SAS [FR]) 15 October 2004 (2004-10-15) claims 14-17 page 6, lines 11-19 ----- -/--	1-18

☒ 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

13 October 2010

Date of mailing of the international search report

21/10/2010

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Renard, Delphine

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/060290

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/087153 A2 (CHIRON CORP [US]; VALIANTE NICHOLAS [US]) 14 October 2004 (2004-10-14) paragraph [0080]; claim 35; compounds 5405-65-2 paragraphs [0020], [192]; claims 1, 20 -----	1-18
X	DATABASE CA [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; 1 January 1993 (1993-01-01), ZHAO, WEIZHANG ET AL: "Antitumor activity of pyrido[2,3-d]pyrimidine antifolates" XP002563103 retrieved from STN Database accession no. 1993:594900 * abstract -----	1-18
X,P	WO 2010/066901 A2 (POXEL [FR]; CRAVO DANIEL [FR]; HALLAKOU-BOZEC SOPHIE [FR]; MESANGEAU D) 17 June 2010 (2010-06-17) claims 1-3, 6-12 page 28, lines 26-34 examples 3-4 page 26, lines 11-24 -----	1-18
A	GAJEWSKI FELIKS ET AL: "Derivatives of diamino-1,3,5- triazine . VI. Synthesis and hypoglycemic properties of some 6-amino-2-aryl-1,2-dihydro-4-(3,5,5- trimethyl-2-pyrazolino)-1,3,5- triazines" HCAPLUS, 1 January 1984 (1984-01-01), XP002426492 * abstract -----	1-18
A	WO 2008/024893 A2 (US GOVERNMENT [US]; GREIG NIGEL H [US]; MATTSON MARK P [US]; HABERMAN) 28 February 2008 (2008-02-28) paragraph [0011]; claims 1-16 -----	1-18
A	EP 1 749 552 A1 (NEUROPHARMA S A [ES]; INST BIOMAR SA [ES]) 7 February 2007 (2007-02-07) paragraph [0003]; claims 1-11 -----	1-18
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/060290

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	YAZDANPARAST R ET AL: "Protective effect of a triazine-derivative (AA3E2) on beta-amyloid-induced damages in SK-N-MC cells" TOXICOLOGY IN VITRO, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 23, no. 7, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 1277-1283, XP026654237 ISSN: 0887-2333 [retrieved on 2009-07-22] the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/060290

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0155122	A1	02-08-2001	AT 332294 T 15-07-2006
			AU 782307 B2 21-07-2005
			AU 3560301 A 07-08-2001
			BG 106933 A 31-07-2003
			BR 0107815 A 29-10-2002
			CA 2397636 A1 02-08-2001
			CN 1404472 A 19-03-2003
			CZ 20022462 A3 16-04-2003
			DE 60121294 T2 30-08-2007
			DK 1250328 T3 30-10-2006
			EE 200200414 A 15-10-2003
			EP 1250328 A1 23-10-2002
			ES 2267715 T3 16-03-2007
			FR 2804113 A1 27-07-2001
			HK 1050529 A1 29-09-2006
			HR 20020625 A2 31-10-2003
			HU 0204087 A2 28-04-2003
			IS 6467 A 11-07-2002
			JP 2003520858 T 08-07-2003
			MA 25650 A1 31-12-2002
			MX PA02007232 A 15-10-2003
			NO 20023532 A 25-09-2002
			OA 12165 A 08-05-2006
			PL 357191 A1 26-07-2004
			PT 1250328 E 31-10-2006
			SK 9762002 A3 02-05-2003
			US 2003109530 A1 12-06-2003
			ZA 200205314 A 18-05-2005
FR 2896159	A1	20-07-2007	AR 059032 A1 12-03-2008
			AT 476179 T 15-08-2010
			AU 2006334734 A1 19-07-2007
			CA 2640897 A1 19-07-2007
			CN 101355933 A 28-01-2009
			EA 200801676 A1 30-12-2008
			EP 1971330 A2 24-09-2008
			WO 2007079917 A2 19-07-2007
			JP 2009523142 T 18-06-2009
			KR 20080088630 A 02-10-2008
FR 2853650	A1	15-10-2004	ZA 200806947 A 25-11-2009
			AR 044511 A1 14-09-2005
			AT 425151 T 15-03-2009
			AU 2004228125 A1 21-10-2004
			BR PI0409258 A 28-03-2006
FR 2853650	A1		CA 2521879 A1 21-10-2004
			CN 1771233 A 10-05-2006
			DK 1611111 T3 18-05-2009
			EP 1611111 A2 04-01-2006
			WO 2004089917 A2 21-10-2004
			ES 2321718 T3 10-06-2009
			HK 1088002 A1 02-01-2009
			JP 2006522753 T 05-10-2006
			KR 20050120791 A 23-12-2005
			MX PA05010764 A 12-12-2005
			PT 1611111 E 18-06-2009
			RU 2344131 C2 20-01-2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/060290

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		SI 1611111 T1	31-08-2009
		US 2006223803 A1	05-10-2006
		ZA 200509071 A	25-04-2007
WO 2004087153 A2	14-10-2004	CA 2520124 A1	14-10-2004
		EP 1608369 A2	28-12-2005
WO 2010066901 A2	17-06-2010	NONE	
WO 2008024893 A2	28-02-2008	AU 2007286630 A1	28-02-2008
		CA 2661553 A1	28-02-2008
		EP 2056833 A2	13-05-2009
		JP 2010501590 T	21-01-2010
		US 2010105707 A1	29-04-2010
EP 1749552 A1	07-02-2007	WO 2007017146 A2	15-02-2007
		JP 2009502847 T	29-01-2009
		US 2008275088 A1	06-11-2008

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2010/060290

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. A61K31/53 A61P9/10 A61P25/28 A61P35/00
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

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 01/55122 A1 (LIPHA [FR]; MOINET GERARD [FR]; CRAVO DANIEL [FR]; DOARE LILIANE [FR];) 2 août 2001 (2001-08-02) revendications 1-7, 10-13 page 6, ligne 3 - page 7, ligne 4	1-18
X	FR 2 896 159 A1 (MERCK SANTE SOC PAR ACTIONS SI [FR]) 20 juillet 2007 (2007-07-20) revendications 1, 7-9, 24-26	1-18
X	FR 2 853 650 A1 (MERCK SANTE SAS [FR]) 15 octobre 2004 (2004-10-15) revendications 14-17 page 6, ligne 11-19	1-18
	----- -/--	



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

13 octobre 2010

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/10/2010

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

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

Fonctionnaire autorisé

Renard, Delphine

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2004/087153 A2 (CHIRON CORP [US]; VALIANTE NICHOLAS [US]) 14 octobre 2004 (2004-10-14) alinéa [0080]; revendication 35; composés 5405-65-2 alinéas [0020], [192]; revendications 1, 20 -----	1-18
X	DATABASE CA [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; 1 janvier 1993 (1993-01-01), ZHAO, WEIZHANG ET AL: "Antitumor activity of pyrido[2,3-d]pyrimidine antifolates" XP002563103 extrait de STN Database accession no. 1993:594900 * abrégé -----	1-18
X,P	WO 2010/066901 A2 (POXEL [FR]; CRAVO DANIEL [FR]; HALLAKOU-BOZEC SOPHIE [FR]; MESANGEAU D) 17 juin 2010 (2010-06-17) revendications 1-3, 6-12 page 28, ligne 26-34 exemples 3-4 page 26, ligne 11-24 -----	1-18
A	GAJEWSKI FELIKS ET AL: "Derivatives of diamino-1,3,5- triazine . VI. Synthesis and hypoglycemic properties of some 6-amino-2-aryl-1,2-dihydro-4-(3,5,5- trimethyl-2-pyrazolino)-1,3,5- triazines" HCAPLUS, 1 janvier 1984 (1984-01-01), XP002426492 * abrégé -----	1-18
A	WO 2008/024893 A2 (US GOVERNMENT [US]; GREIG NIGEL H [US]; MATTSON MARK P [US]; HABERMAN) 28 février 2008 (2008-02-28) alinéa [0011]; revendications 1-16 -----	1-18
A	EP 1 749 552 A1 (NEUROPHARMA S A [ES]; INST BIOMAR SA [ES]) 7 février 2007 (2007-02-07) alinéa [0003]; revendications 1-11 -----	1-18
	----- -/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2010/060290

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	YAZDANPARAST R ET AL: "Protective effect of a triazine-derivative (AA3E2) on beta-amyloid-induced damages in SK-N-MC cells" TOXICOLOGY IN VITRO, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 23, no. 7, 1 octobre 2009 (2009-10-01), pages 1277-1283, XP026654237 ISSN: 0887-2333 [extrait le 2009-07-22] le document en entier -----	1-18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2010/060290

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0155122	A1	02-08-2001	AT 332294 T	15-07-2006
			AU 782307 B2	21-07-2005
			AU 3560301 A	07-08-2001
			BG 106933 A	31-07-2003
			BR 0107815 A	29-10-2002
			CA 2397636 A1	02-08-2001
			CN 1404472 A	19-03-2003
			CZ 20022462 A3	16-04-2003
			DE 60121294 T2	30-08-2007
			DK 1250328 T3	30-10-2006
			EE 200200414 A	15-10-2003
			EP 1250328 A1	23-10-2002
			ES 2267715 T3	16-03-2007
			FR 2804113 A1	27-07-2001
			HK 1050529 A1	29-09-2006
			HR 20020625 A2	31-10-2003
			HU 0204087 A2	28-04-2003
			IS 6467 A	11-07-2002
			JP 2003520858 T	08-07-2003
			MA 25650 A1	31-12-2002
			MX PA02007232 A	15-10-2003
			NO 20023532 A	25-09-2002
			OA 12165 A	08-05-2006
			PL 357191 A1	26-07-2004
			PT 1250328 E	31-10-2006
			SK 9762002 A3	02-05-2003
			US 2003109530 A1	12-06-2003
			ZA 200205314 A	18-05-2005
FR 2896159	A1	20-07-2007	AR 059032 A1	12-03-2008
			AT 476179 T	15-08-2010
			AU 2006334734 A1	19-07-2007
			CA 2640897 A1	19-07-2007
			CN 101355933 A	28-01-2009
			EA 200801676 A1	30-12-2008
			EP 1971330 A2	24-09-2008
			WO 2007079917 A2	19-07-2007
			JP 2009523142 T	18-06-2009
			KR 20080088630 A	02-10-2008
			ZA 200806947 A	25-11-2009
FR 2853650	A1	15-10-2004	AR 044511 A1	14-09-2005
			AT 425151 T	15-03-2009
			AU 2004228125 A1	21-10-2004
			BR PI0409258 A	28-03-2006
			CA 2521879 A1	21-10-2004
FR 2853650	A1		CN 1771233 A	10-05-2006
			DK 1611111 T3	18-05-2009
			EP 1611111 A2	04-01-2006
			WO 2004089917 A2	21-10-2004
			ES 2321718 T3	10-06-2009
			HK 1088002 A1	02-01-2009
			JP 2006522753 T	05-10-2006
			KR 20050120791 A	23-12-2005
			MX PA05010764 A	12-12-2005
			PT 1611111 E	18-06-2009
			RU 2344131 C2	20-01-2009

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2010/060290

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		SI 1611111 T1	31-08-2009
		US 2006223803 A1	05-10-2006
		ZA 200509071 A	25-04-2007
WO 2004087153 A2	14-10-2004	CA 2520124 A1	14-10-2004
		EP 1608369 A2	28-12-2005
WO 2010066901 A2	17-06-2010	AUCUN	
WO 2008024893 A2	28-02-2008	AU 2007286630 A1	28-02-2008
		CA 2661553 A1	28-02-2008
		EP 2056833 A2	13-05-2009
		JP 2010501590 T	21-01-2010
		US 2010105707 A1	29-04-2010
EP 1749552 A1	07-02-2007	WO 2007017146 A2	15-02-2007
		JP 2009502847 T	29-01-2009
		US 2008275088 A1	06-11-2008