

## (12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 44038 A1** (51) Cl. internationale : **A61K 31/00**
- (43) Date de publication : **30.06.2020**

---

(21) N° Dépôt : **44038**

(22) Date de Dépôt : **29.11.2018**

(71) Demandeur(s) :

- **UNIVERSITE EUROMED DE FES, ROND POINT BENSOUA, ROUTE DE MEKNES,, FES, 30000 (MA)**
- **UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE BENI MELLAL , AV IBN KHALDOUN? BP 591, BENI MELLAL, 23000 (MA)**

(72) Inventeur(s) : **El Kazzouli Said ; Ziad Abdelmajid ; El Brahmi Nabil ; El Abbouchi Abdelmoula ; Boujdi Khalid ; Bousmina Mostapha ; Ait Mouse Hassan ; Tilaoui Mounir**

(74) Mandataire : **BOUNOU SALIM**

---

(54) Titre : **ACTIVITES ANTITUMORALES D'UNE NOUVELLE FAMILLE DES DERIVES DE L'ACIDE ETHACRYNIQUE**

(57) Abrégé : La présente invention concerne des nouveaux analogues de l'acide ethacrynique ont été synthétisés puis, leurs activités cytotoxiques in vitro ont été évaluées sur la lignée cellulaire tumorale P815 en utilisant le test MTT. Le dérivé de l'acide ethacrynique, qui a présenté la meilleur cytotoxicité in vitro, a été ensuite testé in vivo en utilisant le modèle de souris DBA2/P815 (H2d). A 30 mg/kg, la dose effective, les animaux ont montré une tolérance générale avec un pourcentage de survie aux alentours de 80%, et aucune perte de poids significative n'a été observée.

**ACTIVITES ANTITUMORALES D'UNE NOUVELLE FAMILLE DES DERIVES DE  
L'ACIDE ETHACRYNIQUE**

Saïd El Kazzouli<sup>1</sup>, Abdelmajid Ziad<sup>2</sup>, Nabil El Brahmi<sup>1</sup>, Abdelmoula El Abbouchi<sup>1</sup>, Khalid Boujdi<sup>1</sup>, Mustapha Bousmina<sup>1</sup>, Hassan Ait Mouse<sup>2</sup>, Mounir Tilaoui<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Euromed Faculty of Engineering, Euromed University of Fes (UEMF), Route de Meknès, 30000 Fès, Morocco

<sup>2</sup>Team of Experimental Oncology and Natural Substances; Cellular & Molecular Immunopharmacology, Faculty of Sciences and Techniques, Sultan Moulay Slimane University, Beni Mellal, Morocco

**Abrégé**

La présente invention concerne des nouveaux analogues de l'acide ethacrynique ont été synthétisés puis, leurs activités cytotoxiques in vitro ont été évaluées sur la lignée cellulaire tumorale P815 en utilisant le test MTT. Le dérivé de l'acide ethacrynique, qui a présenté la meilleur cytotoxicité in vitro, a été ensuite testé in vivo en utilisant le modèle de souris DBA2/P815 (H2d). A 30 mg/kg, la dose effective, les animaux ont montré une tolérance générale avec un pourcentage de survie aux alentours de 80%, et aucune perte de poids significative n'a été observée.

**Domaine de l'invention :**

La présente invention concerne une nouvelle classe de petites molécules anticancéreuses dérivées de l'acide éthacrynique (symbolisé par **AE**). L'invention concerne les activités anticancéreuses *in vitro* et *in vivo* et les procédés de préparation de la nouvelle famille de l'AE. De nouveaux analogues de l'acide éthacrynique ont été synthétisés puis, leurs activités cytotoxiques *in vitro* ont été évaluées sur la lignée cellulaire tumorale P815 en utilisant le test MTT. Le dérivé de l'acide éthacrynique, qui a présenté la meilleur cytotoxicité *in vitro*, a été ensuite testé *in vivo* en utilisant le modèle de souris DBA2/P815 (H<sub>2</sub>d). A 30 mg/kg, la dose effective, les animaux ont montré une tolérance générale avec un pourcentage de survie aux alentours de 80%, et aucune perte de poids significative n'a été observée.

**Etat de la technique :**

Des avancées remarquables ont été réalisées dans le domaine de la chimiothérapie et ce, par l'introduction de nouvelles molécules telles que la thalidomide, le lénalidomide et le bortézomib. Malgré cela, le cancer reste toujours une maladie incurable. L'efficacité de la chimiothérapie reste à améliorer et ce, en réduisant la toxicité et les effets secondaires des traitements. De plus, la résistance intrinsèque ou acquise d'un grand nombre de tumeurs à la chimiothérapie est aussi un obstacle majeur devant l'efficacité des traitements anticancéreux. Plusieurs mécanismes de la résistance cellulaire à différentes substances actives ont été identifiés (Moscow and Cowan 1988). En prenant en considération ceci, la recherche de nouveaux agents efficaces en chimiothérapie capables de traiter les différents types de cancers est toujours indispensable.

D'après l'organisation mondiale de la santé, le cancer est l'une des principales causes de la mortalité dans le monde. Les cancers du poumon, du foie, de l'estomac, du colon et du sein sont les plus répandus dans le monde. Au vu de cette diversité des types de cancers, le développement de nouveaux agents anticancéreux prend une place très importante dans le domaine de l'oncologie. En plus, la mise au point de molécules spécifiques pour la lutte contre cette maladie tout en contournant l'obstacle de la résistance cellulaire est nécessaire.

La glutathion S-transférase microsomale 1 (mGST1) et la glutathion S-transférase pi (GSTpi) sont souvent surexprimées dans les tumeurs conférant ainsi une résistance à un certain nombre d'agents chimiothérapeutiques, tels que le cisplatine et la doxorubicine (DOX) [(Johansson et al. 2011)]. Ces enzymes catalysent la conjugaison de la glutathion et agissent comme des enzymes de détoxifications.

L'acide éthacrynique (**AE**) ou l'acide 2,3-dichloro-4-(2-méthylènebutryl)-phénoxyacétique, qui est un diurétique bien connu, est utilisé dans le traitement de l'hypertension et l'enflure causée par des maladies telles que l'insuffisance cardiaque congestive, l'insuffisance hépatique et l'insuffisance rénale [(Borne, Levi, and Wilson 2002; Koechel 1981)]. Il est également connu comme un bon inhibiteur de la glutathion S-transférase de classe pi. L'**AE** acide éthacrynique possède une fonction acide et une unité carbonyle  $\alpha,\beta$ -insaturée qui réagit avec des nucléophiles, tels que le thiol de la glutathion S-transférase P1-1 (GSTP1-1, GSTpi). De plus, Il a été confirmé récemment que **AE** inhibe la signalisation de Wnt/béta caténine qui joue un rôle important dans

la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose [(Liu et al. 2006; Lu et al. 2009; Janovská and Bryja 2017)].

Afin d'améliorer la capacité de l'acide éthacrynique (**AE**) à inhiber la croissance des cellules cancéreuses *in vivo* tout en conservant sa bonne activité d'inhibition de la glutathion S-transférase, nous proposons dans cette invention une nouvelle synthèse d'agents anticancéreux puissants et originaux. Ainsi, en se basant sur nos résultats très encourageants concernant les activités antitumorales de divers analogues de l'**EA** *in vitro* sur un panel de lignées cellulaires [(El Brahmi et al. Nanoscales, 2015; Mignani et al. Eur. J. Med. Chem. 2016)], nous proposons dans cette invention, la synthèse et l'évaluation *in vivo* des meilleurs analogues en effectuant des modifications structurales, sur le squelette de base de la molécule d'acide éthacrynique. Ces transformations chimiques aboutissent à la formation de liaisons amides entre la fonction acide carboxylique de l'**AE** et des amines primaires et secondaires. La partie acrylate quant à elle est restée intacte.

**Brève description des figures :**

Schéma 1. Synthèse des dérivés de l'AE, P3, P4 et P5.

Figure 1. Activité cytotoxique des dérivés de l'acide étacrynique (P3, P4 et P5) contre la lignée tumorale P815.

Table 1 Valeurs des IC<sub>50</sub> des composés P3, P4 et P5.

Figure 2. Effet de la molécule P4 sur l'évolution tumorale chez des souris DBA2 porteuses de tumeurs.

Figure 3. Evolution du poids corporel des souris DBA2 traitées par le composé P4.

Figure 4. Courbes de survie des souris traitées par le composé P4.

## Description de l'invention :

### Synthèse des molécules cibles

Les dérivés de l'acide éthacrynique **AE** sont préparés à partir de l'acide éthacrynique **AE** commercialement disponible. Le traitement de l'acide éthacrynique **AE** sous les conditions d'une réaction peptidique par différentes amines dans un mélange DCM/DMF en présence du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) et de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) à température ambiante fournit les produits recherchés avec des rendements modérés.

La présence de la fonction phénol sur l'acide éthacrynique **AE** modifié a été utilisée pour la substitution nucléophile avec des chlorophosphates. Ainsi, le traitement par différents chlorophosphates dans le dichlorométhane DCM en présence de la triméthylamine comme base organique permet d'obtenir les composés souhaités avec des rendements modérés.

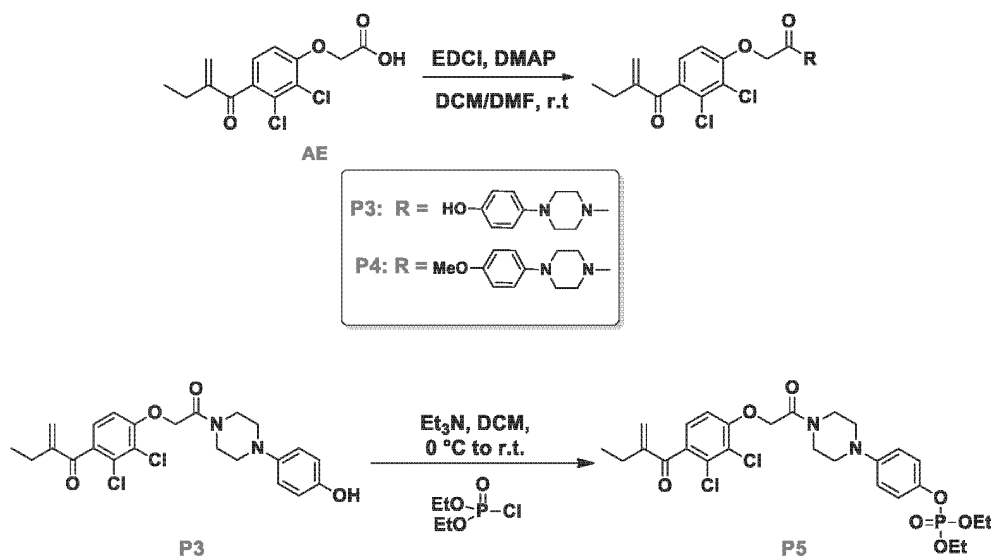


Schéma 1. Synthèse des dérivés de l'AE, **P3**, **P4** et **P5**

Méthode générale pour la préparation des molécules **P3** et **P4**. A un mélange de EDCI (1.2 équiv), DMAP (en quantité catalytique) et 1 équiv of **EA** dans DMF anhydre (5 mL), 1 équiv des amines (4-hydroxyphenyl pipérazine ou 4-méthoxyphenyl pipérazine) est ajouté à 0°C. Le mélange réactionnel est agité pendant une nuit à température ambiante, puis, l'acétate d'éthyle (100 mL) est ajouté et la phase organique est lavée par l'eau (2 × 50 mL) et l'eau salée (3 × 50

mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash.

**P3.** Rendement = 60 %. (DCM/EtOAc (9:1 à 8:2 (v/v))). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz), δ (ppm): 7.16 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.00 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 6.84 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 5.95 (s, 1H), 5.61 (s, 1H), 5.54 (s, 1H), 4.88 (s, 2H), 3.76-3.84 (m, 4H), 3.06-3.12 (m, 2H), 2.99-3.06 (m, 2H), 2.48 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.16 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 101 MHz); δ (ppm): 195.8 (C, C(=O)), 165.3 (C, C(=O)N), 155.2 (C, C<sub>ar</sub>), 150.7 (C, C<sub>ar</sub>), 150.2 (C, C<sub>ar</sub>), 144.9 (C, C<sub>ar</sub>), 133.8 (C, C<sub>ar</sub>), 131.4 (C, C<sub>ar</sub>), 128.8 (CH<sub>2</sub>, C=CH<sub>2</sub>), 127.1 (2CH, CH<sub>ar</sub>), 122.8 (C, C<sub>ar</sub>), 119.3 (CH, CH<sub>ar</sub>), 116.0 (2CH, CH<sub>ar</sub>), 110.37 (CH, CH<sub>ar</sub>), 68.7 (CH<sub>2</sub>), 51.5 (CH<sub>2</sub>), 50.7 (CH<sub>2</sub>), 45.7 (CH<sub>2</sub>), 42.4 (CH<sub>2</sub>), 23.4 (CH<sub>2</sub>), 12.4 (CH<sub>3</sub>). HRMS (+ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> calculer pour C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 463.1188, trouver, 463.1192. IR (neat): ν = 3325 (OH), 1654 (C=O), 1645 (C=C) cm<sup>-1</sup>.

**P4.** Rendement = 47%. (DCM/EtOAc (8:2 (v/v))). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz); δ (ppm): 7.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 6.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 6.93-6.82 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.93 (s, 1H), 5.59 (s, 1H), 4.86 (s, 2H), 3.83-3.73 (m, 7H), 3.08 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.03 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 2.46 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.14 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>; 101 MHz); δ (ppm): 195.9 (C, C(=O)), 165.3 (C, C(=O)N), 155.4 (C, C<sub>ar</sub>), 154.7 (C, C<sub>ar</sub>), 150.3 (C, C<sub>ar</sub>), 145.2 (C, C<sub>ar</sub>), 133.9 (C, C<sub>ar</sub>), 131.7 (C, C<sub>ar</sub>), 128.8 (CH<sub>2</sub>, C=CH<sub>2</sub>), 127.3 (2CH, CH<sub>ar</sub>), 123.0 (C, C<sub>ar</sub>), 119.3 (CH, CH<sub>ar</sub>), 114.7 (2CH, CH<sub>ar</sub>), 110.9 (CH, CH<sub>ar</sub>), 68.9 (CH<sub>2</sub>), 55.7 (OCH<sub>3</sub>), 51.6 (CH<sub>2</sub>), 51.0 (CH<sub>2</sub>), 45.8 (CH<sub>2</sub>), 42.6 (CH<sub>2</sub>), 23.7 (CH<sub>2</sub>), 12.6 (CH<sub>3</sub>).

HRMS (+ESI) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> calculer pour C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 477.1348, trouver, 477.1324. IR (neat): ν = 1661 (C=O) cm<sup>-1</sup>. Analyses élémentaires pour C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; calculer : C, 60.38; H, 5.49; N, 5.85, trouver: C, 60.42; H, 5.24; N, 5.69.

**P5.** A un mélange du **P3** (1 équiv) et triéthylamine (1.1 équiv) dans du DCM anhydre à 0 °C, diéthyl chlorophosphate est ajouté goutte à goutte (1 équiv). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit. Après, DCM (20 mL) est ajouté et la phase organique est lavée par l'eau (10 mL) et l'eau salée (10 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et puis concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le produit brut est purifié par chromatographie flash. Rendement = 46%. (DCM/EtOAc (2:1 à 1:1 (v/v))). RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>; 162 MHz), δ (ppm): -5.8 (s, P). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz), δ (ppm): 7.18-7.09 (m, 3H, H<sub>ar</sub>), 6.98 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 6.88-6.82



(m, 2H, H<sub>ar</sub>), 5.93 (t,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 5.58 (s, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.28-4.10 (m, 4H), 3.82-3.74 (m, 4H), 3.14 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H), 3.09 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H), 2.45 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.34 (td,  $J = 7.1, 1.0$  Hz, 6H), 1.13 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>; 101 MHz),  $\delta$  (ppm): 195.9 (C, C=O), 165.3 (C, C(=O)N), 155.3 (C, C<sub>ar</sub>), 150.3 (C, C<sub>ar</sub>), 148.2 (C, C<sub>ar</sub>), 144.9 (d,  $J = 7.0$  Hz, C, C<sub>ar</sub>), 133.9 (C, C<sub>ar</sub>), 131.6 (C, C<sub>ar</sub>), 128.8 (CH<sub>2</sub>, C=CH<sub>2</sub>), 127.2 (CH, C<sub>ar</sub>), 122.9 (C, C<sub>ar</sub>), 120.8 (d,  $J = 4.7$  Hz, 2CH, C<sub>ar</sub>), 118.2 (2CH, C<sub>ar</sub>), 110.8 (CH, C<sub>ar</sub>), 68.9 (CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>), 64.6 (d,  $J = 6.1$  Hz, 2CH<sub>2</sub>), 50.7 (CH<sub>2</sub>), 50.0 (CH<sub>2</sub>), 45.6 (CH<sub>2</sub>), 42.3 (CH<sub>2</sub>), 23.5 (CH<sub>2</sub>), 16.2 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2CH<sub>3</sub>), 12.5 (CH<sub>3</sub>). HRMS (+ESI)  $m/z$ : [M+H]<sup>+</sup> calculer pour C<sub>27</sub>H<sub>23</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>P: 599.1481, trouver, 599.1486. IR (neat):  $\nu = 1663$  (C=O) cm<sup>-1</sup>.

### Activité antitumorale

La lignée tumorale P815 du mastocytome murin (ATCC: TIB64) utilisée dans cette étude a été gracieusement fournie à notre laboratoire par Docteur Michel Lepoivre, UMR CNRS 9198, Bât.430, Université de Paris-saclay, France. Cette lignée est maintenue en culture dans le milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) complet supplémenté avec 5% de SVF (Gibco BRL, CergyPontoise, France), 100 UI/mL de pénicilline, 100 $\mu$ g/mL streptomycine et 0,2% de sodium bicarbonate (Sigma) dans une atmosphère humide à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>.

### Test de cytotoxicité

Avant de réaliser le test de cytotoxicité, on procède au comptage des cellules viables par exclusion au bleu de trypan. Le but étant d'obtenir une suspension de 4 x 10<sup>4</sup> cellules/mL à incuber dans 100  $\mu$ L de milieu de culture complet par puits à fond plat des plaques de micro-culture de 96 puits [(Bioster, Bastia di Rovolon, Italy)]. Cette micro-culture ainsi obtenue est mise en incubation 24 heures avant la réalisation des tests de cytotoxicité. Ce dernier est alors effectué en appliquant des doses décroissantes des molécules (**P1**, **P3** et **P4**) obtenues par des dilutions de demi en demi, dans 100  $\mu$ L de milieu DMEM. Chaque essai est réalisé en double et répété trois fois avec les témoins positifs et négatifs. Les trois molécules P1, P3 et P4 sont tout d'abord solubilisées dans du DMSO dont la concentration finale, lors du test, n'excédera pas 0,5% (cette concentration n'ayant pas d'effet sur la croissance cellulaire). Ces micro-cultures sont incubées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> pendant 48h.

La détermination de l'activité cytotoxique est réalisée en évaluant la concentration des molécules testées inhibant 50% de la croissance cellulaire (IC<sub>50</sub>) par rapport à un témoin cultivé dans les mêmes conditions en l'absence du composé étudié. Ce test simple et rapide permet de réaliser une sélection rapide des molécules présentant une activité susceptible de limiter ou stopper la croissance des cellules cancéreuses. La révélation de l'action cytotoxique est effectuée à l'aide du test MTT : 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide [(Mosmann 1983; Tilaoui et al. 2015)]. Ce test est réalisé comme décrit et modifié par Mosmann, 1983. Après 48 d'incubation dans les conditions de culture citées ci-dessous, on ajoute 20 µL d'une solution de MTT (5mg/mL de PBS). Après 4 heures d'incubation dans les mêmes conditions de culture, les cristaux violets formés suite à la réduction du MTT par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes sont solubilisés en rajoutant 100 µL d'une solution de HCl / Isopropanol (24 :1). On procède ensuite à la lecture de la densité optique (DO) à deux longueurs d'ondes 540 nm et 630 nm en utilisant le lecteur spectrophotométrique de microplaques Multiskan EX. Ainsi, l'effet de **P1**, **P3** et **P4** sur la viabilité cellulaire peut être mesuré en utilisant la formule suivante :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = (\text{DO}_{\text{molécules}} / \text{DO}_{\text{contrôle}}) \times 100$$

Avec :

DO : densité optique correspondant aux cellules traitées par les molécules (**P1**, **P3** et **P4**) et/ou le Méthotrexate MTX (utilisé comme contrôle positif)

DO<sub>con</sub> : densité optique correspondant au contrôle négatif (cellules non traitées).

### **Activité antitumorale *in vivo***

Le modèle choisi pour cette étude est constitué de la lignée tumorale P815 et la souche de souris DBA2 (H2<sup>d</sup>) syngénique achetées du centre d'élevage d'Orléans – France). Les cellules P815 sont capables d'induire des tumeurs solides chez les souris DBA2. Les souris DBA2 sont élevées en animalerie à une température de 25°C et une photopériode de 12 heures. L'alimentation et l'abreuvement des animaux sont fournis ad-libitum. Les souris utilisées dans nos expérimentations sont âgées de sept à huit semaines avec des poids corporels compris entre 20 et 24 g. Le sexe n'est pas pris en considération dans nos essais.

### ***Induction des tumeurs primaires***

Les cellules cancéreuses P815 sont recueillies par centrifugation à 1400 rpm pendant 10 mn à température ambiante. Les culots obtenus sont lavés deux fois avec du PBS et remis en suspension dans 1 mL de PBS et comptées. Environ  $10^7$  cellules vivantes en suspension dans un volume de 100  $\mu$ L de PBS sont injectées, sous anesthésie à l'éther, par voie sous cutanée de la région dorsolombaire de chaque souris. Une petite tumeur apparaît dans le lieu de l'injection au bout d'une semaine à 10 jours.

### ***Traitement des souris***

Lorsque les tumeurs deviennent palpables, les souris sont réparties en 4 lots à raison de 6 souris par lot (jours 0). Ensuite, chaque deux jours, les souris sont traitées par gavage de la façon suivante :

Les souris du lot A (témoin), B, C et D reçoivent respectivement 100  $\mu$ L d'huile végétale seule, 10, 20 and 30 mg/kg de la molécule P4 (la plus cytotoxiques par rapport autres molécules testées) dissoute dans 100  $\mu$ L d'huile végétale. Le traitement est effectué à l'ordre d'une seule administration orale toutes les 48h pendant 14 jours. Le poids et la survie des souris, ainsi que le volume tumoral sont mesurés tous les deux jours pendant 28 jours.

Le volume tumoral au jour n (TVn) est calculé de la façon suivante :

$TV = (L * W) / 2$  où L et W représentent la longueur et la largeur de la tumeur, comme décrit par Yoshikawa [(Yoshikawa et al. 1995)].

### ***Analyses statistiques***

Les expériences réalisées *in vitro* ont été effectuées en triplicate. Les données reflètent la moyenne de trois expériences différentes. L'analyse statistique pour ces études utilise un test de Student « Student Test ». Les données sont considérées comme statistiquement significatives pour un  $p < 0,05$ . Concernant l'étude *in vivo*, chaque condition comprend 6 souris,  $n=3$ , et l'analyse statistique a été réalisée en utilisant le test ANOVA à un facteur (one-way Anova) suivie du test post hoc de Tukey et de Scheffé. Les données sont considérées comme statistiquement significatives pour un  $p < 0,05$ .

été utilisées dans le but de tester l'effet antitumoral *in vivo* de la molécule **P4** qui a montré une activité cytotoxique très importante par rapport aux autres molécules testées **P1** et **P3**.

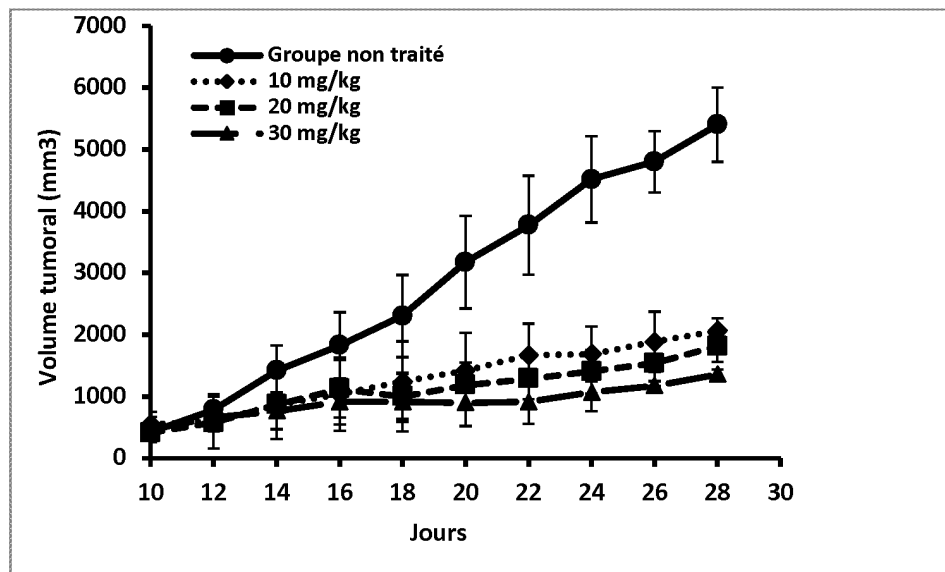


Figure 2. Effet de la molécule **P4** sur l'évolution tumorale chez des souris DBA2 porteuses de tumeurs

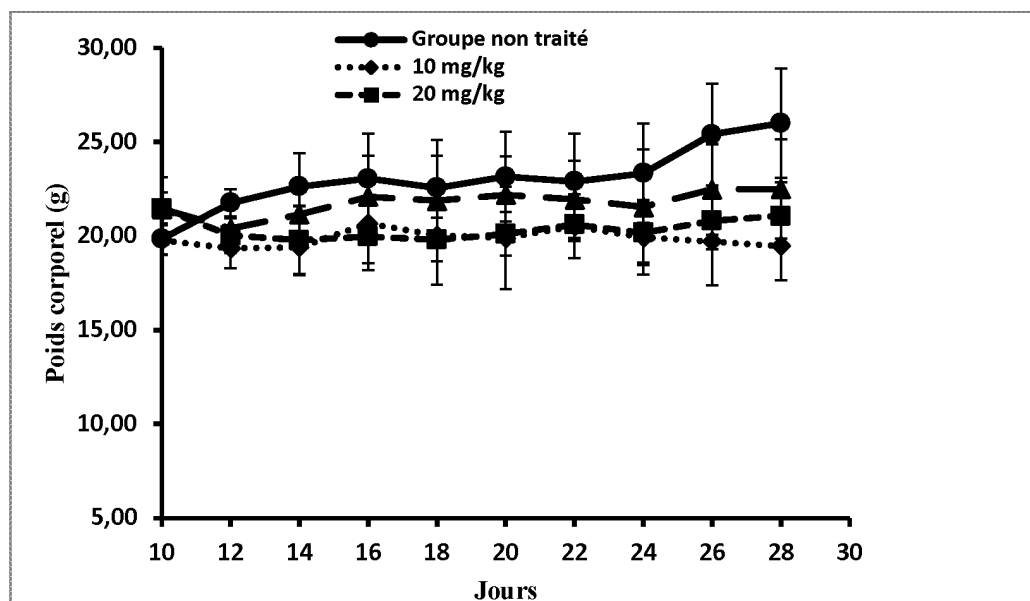


Figure 3. Evolution du poids corporel des souris DBA2 traitées par le composé **P4**.

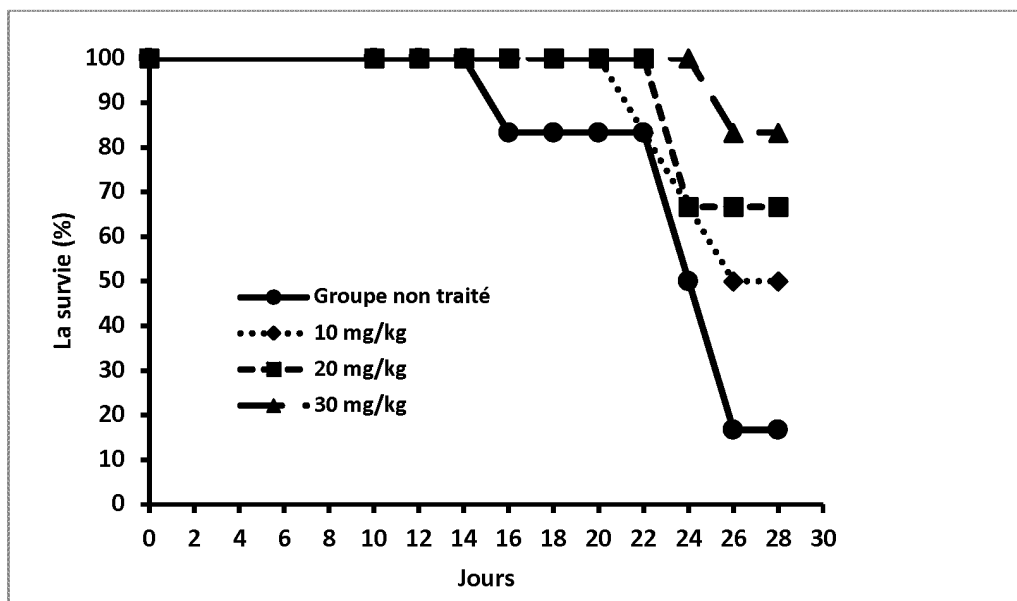


Figure 4. Courbes de survie des souris traitées par le composé **P4**.

Les essais ont été réalisés par administration orale (gavage) des molécules dissoute dans une huile végétale (huile de table) à des souris de 6-8 semaines toutes les 48 heures pendant une durée de 14 jours. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 2. A la lecture de cette figure, le traitement des souris par la molécule **P4** a induit une diminution significative du volume tumoral. L'administration par gavage de la molécule **P4** à des doses de 10, 20 et 30 mg / kg a induit une réduction significative du volume tumoral après 28 jours du traitement par rapport au souris témoins (Figure 2). En outre, aucune différence significative n'a été observée entre les doses utilisées. Cependant, on a noté que les souris traitées par la dose 30 mg / kg, ont montré une tolérance vis-à-vis de cette dose avec un taux de survie d'environ 80% (Figure 4), et pas d'impact significatif sur la perte de poids corporel (Figure 3) par rapport aux souris traitées par les doses 10 et 20 mg / kg ( $P < 0,05$ ). Aussi, on ne note aucune différence significative dans la diminution du volume tumoral après traitement par les trois doses (10, 20 et 30 mg / kg) ( $P < 0,05$ ). Ainsi, nous pourrions considérer de point de vue efficacité que la dose 30 mg/kg du composé **P4** est plus efficace par rapport autres doses testées.

## Revendications.

1. Nouvelle méthode de synthèse d'analogues de l'acide éthacrynique en quantité de gramme à partir de l'acide éthacrynique commercial. Chaque analogue contient une fonction amide.
2. Produits synthétisés selon la revendication 1, sont purifiés puis caractérisés par différentes méthodes d'analyse physicochimiques. Leurs solubilités dans différents solvants organiques ont été également vérifiées.
3. Produits purifiés et caractérisés selon la revendication 2, ont été préparés avec des quantités supérieures à un 1 gramme afin de satisfaire les besoins des tests sur l'animal.
4. Produits préparés avec des quantités supérieures à un 1 gramme selon la revendication 3, ont été testés *in vitro* sur une lignée cellulaire lignée tumorale P815 du mastocytome murin (ATCC: TIB64) afin de vérifier leurs activités avant de choisir les meilleurs ou le meilleur pour les tests sur l'animal. La révélation de l'action cytotoxique est effectuée à l'aide du test MTT : 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide. Le meilleur produit **P4** possède une IC<sub>50</sub> de 0,15 µM.
5. Le meilleur produit **P4** selon la revendication 4, a été testé *in vivo* sur un modèle de souris. Le modèle choisi est constitué de la lignée tumorale P815 et la souche de souris DBA2 (H2<sup>d</sup>) syngénique.
6. Le produit sélectionné selon la revendication 5. Au moins trois doses à savoir 10 mg/Kg, 20 mg/Kg et 30 mg/Kg ont été testées pour évaluer l'évolution du volume tumoral chez des souris DBA2 porteuses de tumeurs.
7. Procédé selon les revendications 5, et 6, au moins trois doses à savoir 10 mg/Kg, 20 mg/Kg et 30 mg/Kg ont été testées pour évaluer l'évolution du poids corporel des souris DBA2 traitées par le composé **P4**.
8. Procédé selon les revendications 5, 6 et 7, au moins trois doses à savoir 10 mg/Kg, 20 mg/Kg et 30 mg/Kg ont été testées pour évaluer la survie des souris traitées par le composé **P4**.
9. Procédé selon les revendications 5, 6, 7 et 8, au moins trois doses à savoir 10 mg/Kg, 20 mg/Kg et 30 mg/Kg ont été testées pour évaluer la dose du composé **P4**. Cette dose, de point de vue efficacité est de 30 mg/kg.
10. Procédé selon la revendication 9. Les souris traitées par la dose 30 mg / kg du composé P4 ont montré une tolérance vis-à-vis de cette dose avec un taux de survie d'environ 80% et pas d'impact significatif sur la perte de poids corporel par rapport aux souris traitées par les doses 10 et 20 mg / kg (P < 0,05). La dose 30 mg/kg, est considérée comme la dose effective.

## RESULTATS

### Activité cytotoxique

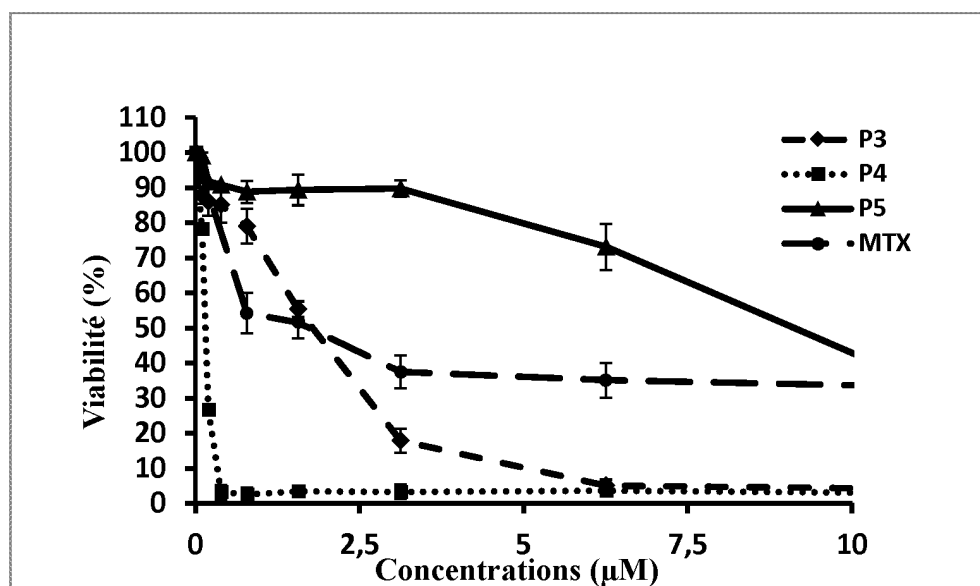


Figure 1. Activité cytotoxique des dérivés de l'acide étacrynique (**P3**, **P4** et **P5**) contre la lignée tumorale P815

Table 1 Valeurs des  $IC_{50}$  des composés **P3**, **P4** et **P5**

Molécules	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>MTX</b>
$IC_{50}$ (µM)	$1,8 \pm 0,3$	$0,15 \pm 0,01$	$9,2 \pm 2$	$2,4 \pm 0,5$

L'activité cytotoxique *in vitro* a été mesurée par le test MTT contre la lignée tumorale P815 (Figure 1). Cette cytotoxicité commence à de faibles concentrations et augmente d'une manière dose dépendante pour toutes les molécules testées. Ces dernières présentent une activité cytotoxique très importante avec une  $IC_{50}$  comprise entre 0,15 et 9,2 µM (Table 1), et c'est la molécule **P4** qui a montrée un effet cytotoxique très fort par rapport aux autres molécules **P3** et **P4** avec une  $IC_{50}=0,15\mu\text{M}$ . Ainsi, le composé **P4** a été évalué pour son effet antitumoral.

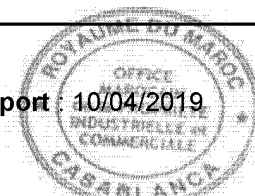
### Activité antitumorale: études précliniques

Les tests *in vivo* représentent une étape importante de l'étude de l'activité antitumorale de notre molécule. L'objectif est de passer à un test dans des conditions se rapprochant au mieux de la réalité de la maladie. A cet effet, des souris DBA-2 (H2<sup>d</sup>) porteuses de tumeurs solides P815 ont



**RAPPORT DE RECHERCHE  
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**  
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13)

<b>Renseignements relatifs à la demande</b>	
N° de la demande : 44038	Date de dépôt : 29/11/2018 ; Date d'entrée en phase nationale : 29/11/2018
Déposant : UNIVERSITE EUROMED DE FES and UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE BENI MELLAL	Date de priorité:
Intitulé de l'invention : ACTIVITES ANTITUMORALES D'UNE NOUVELLE FAMILLE DES DERIVES DE L'ACIDE ETHACRYNIQUE	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site <a href="http://worldwide.espacenet.com">http://worldwide.espacenet.com</a> , et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport <input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité <input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de forme et de clarté <input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
Examineur: Basma SADIKI	Date d'établissement du rapport : 10/04/2019
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	





**Partie 1 : Considérations générales****Cadre 1 : base du présent rapport**

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description  
13 Pages
- Revendications  
10

**Partie 2 : Rapport de recherche**

Classement de l'objet de la demande :

CIB : A 61K 31/00

Plateformes et bases de données électroniques de recherche :

EPOQUENET, WPI, ScienceDirect, ORBIT

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
X	US2018339987 ; SHENZHEN KANGJUZHENG PHARMACEUTICAL TECH CO LTD [CN], UNIV SHENZHEN [CN]; 2018/11/29 Tout le document	1-4
A		5-10
X	Lu D, Liu JX, Endo T, Zhou H, Yao S, et al : "Ethacrynic Acid Exhibits Selective Toxicity to Chronic Lymphocytic Leukemia Cells by Inhibition of the Wnt/b-Catenin Pathway » PLoS ONE 4(12): e8294. December 14, 2009 doi:10.1371/journal.pone.0008294 Tout le document	1-4
A		5-10

**\*Catégories spéciales de documents cités :**

-« 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  
-« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent  
-« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs  
-« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

### Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité

#### Cadre 4 : Remarques de forme et de clarté

1. Pour une bonne compréhension, les revendications 1-10 doivent être rédigées en deux parties: «Procédé/méthode de synthèse des analogue/produit...Caractérisé(e) par... ». Ainsi, elle doit être modifiée lors du dépôt du nouveau jeu de revendications.
2. La revendication 1 définit le produit par la méthode d'obtention ce qui laisse subsister une ambiguïté sur l'objet de la revendication.
3. Une revendication indépendante doit contenir toutes les caractéristiques techniques essentielles à la définition de l'invention. Les revendications 1, 2, 4 ne comporte pas certaines de ces caractéristiques (les étapes du procédé d'obtention du composé et les quantités utilisé) le déposant est amené à ajouter tous les éléments techniques nécessaires à la description de l'objet des revendications.
4. Les termes « meilleur » et « nouvelle » employés dans les revendications ont un sens relatif qui n'est pas bien établi, et ils laissent subsister un doute quant à la signification des caractéristiques techniques auxquelles il se rapporte, au point que l'objet desdites revendications n'est pas clairement défini.
5. La revendication 4 revendique un produit par procédé des essais in vitro et l'activité cytotoxique, or ces deux objets doivent être revendiqués dans deux revendications dépendantes séparées (procédé et utilisation).
6. La revendication 4 contiennent un renvoi à la description. Conformément à l'article 10 du décret d'application de la loi n° 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, les revendications ne doivent pas comporter de telles tel renvoi, à moins qu'un tel renvoi ne soit nécessaire à l'intelligence de la revendication ou qu'il ne contribue à la clarté ou à la concision de celle-ci. Le déposant doit introduire la structure du composé P4 dans la revendication.

#### Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle

Nouveauté	Revendications 4-10 Revendications 1-3	Oui Non
Activité inventive	Revendications 5-10 Revendications 1-4	Oui Non
Application Industrielle	Revendications 1-10 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 : US2018339987

D2 : Lu D, Liu JX, Endo T, Zhou H, Yao S, et al :  
"Ethacrynic Acid Exhibits Selective Toxicity to Chronic Lymphocytic Leukemia Cells by Inhibition of the Wnt/b-Catenin Pathway »

## 1. Nouveauté

Le document D1 divulgue des analogues de l'acide etacrynique et son procédé d'obtention pour leur utilisation dans le traitement des maladies hyperprolifératives. Par conséquent, l'objet des revendications 1-3 n'est pas nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Aucun des documents cités ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques faisant l'objet des revendications 4-10. Par conséquent, l'objet de celles-ci est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

## 2. Activité inventive

Le document D2 est considéré comme étant l'état de la technique la plus proche à l'objet des revendications 4-10. Il divulgue l'utilisation de l'acide etacrynique dans le traitement des maladies cancéreuse.

L'objet de la revendication 5 diffère de D2 en ce que l'analogue possède un méthylphényl piperazine à la place de la fonction alcool. L'effet de cette différence est l'amélioration de l'activité anticancéreuse de l'acide etacrynique.

Le problème technique est considéré comme la fourniture des analogues d'un composé connu (AE) pour obtenir des composés plus efficaces à des doses plus basses.

La solution proposée, la modification structurelle du composé de D2, est considérée inventive pour les raisons suivantes :

Les composés revendiqués dans la présente demande sont assez différents de l'AE en D2 (encombrement de la structure) que des analogues de D1. Alors, il n'est pas évident pour l'homme du métier, pour résoudre le problème d'obtenir le composé P4 toute en sachant que celui-ci aura une activité thérapeutique améliorée.

Par conséquent, l'objet de la revendication 5 ainsi que les revendications dépendantes 6 - 10 implique une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Par ailleurs, la revendication 4 décrit un procédé général des essais cliniques des analogues de l'AE. le choix d'un mode d'essai in vivo fait partie des pratiques courantes de

l'homme du métier. Alors celle-ci n'implique pas d'activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

### **3. Application industrielle**

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.