

## (12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 51937 B1** (51) Cl. internationale : **A61K 36/72; A61K 36/72; A61P 31/04**
- (43) Date de publication : **31.10.2022**

- 
- (21) N° Dépôt : **51937**
- (22) Date de Dépôt : **09.12.2020**
- (71) Demandeur(s) :
- **Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Route d'immouzer BP 2626, FES, 30000 (MA)**
  - **Universidad de La Laguna, Universidad de La Laguna. OTRI, C/Pedro Zerolo, s/n. Edificio Central. Apartado 456, 38200 La Laguna. S/C de Tenerife, La Laguna. S/C de Tenerife, 38200 (ES)**
- (72) Inventeur(s) : **Bekhti Khadija ; Zeouk Ikrame ; Ouedrhiri Wessal ; Ignacio A. Jimenez ; Jacob Lorenzo-Morales ; José E. Piñero**
- (74) Mandataire : **ibnsouda saad**

- 
- (54) Titre : **Formulation médicale contre Staphylococcus aureus résistant à la méticilline responsable des infections invasives**
- (57) Abrégé : La présente invention est destinée au domaine pharmaceutique, elle vise l'élaboration d'une nouvelle formule qui peut être utilisée comme ingrédient de base d'un antibiotique contre Staphylococcus aureus résistante à la méticilline (SARM) dont l'indice de multirésistance est de 75 %. La nouvelle formulation se base sur le caractère synergétique entre l'émodine et le kaempférol, deux molécules isolées à partir d'une plante marocaine Rhamnus alaternus (Ra). Cette invention décrit l'effet de la synergie sur l'augmentation du potentiel inhibiteur contre SARM à des doses non cytotoxiques sur la ligné des macrophages. En testant les molécules séparément, l'émodine a donné une bonne concentration minimale inhibitrice (CMI) alors que le kaempférol était modérément actif. Or, le mélange de ces deux molécules à de très petites concentrations a pu augmenter de manière synergique la bioactivité.

**Titre**

Formulation médicale contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline responsable des infections invasives

**Abrégé**

La présente invention est destinée au domaine pharmaceutique, elle vise l'élaboration d'une nouvelle formule qui peut être utilisée comme ingrédient de base d'un antibiotique contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (SARM) dont l'indice de multirésistance est de 75 %. La nouvelle formulation se base sur le caractère synergétique entre l'émodine et le kaempférol, deux molécules isolées à partir d'une plante marocaine *Rhamnus alaternus (Ra)*. Cette invention décrit l'effet de la synergie sur l'augmentation du potentiel inhibiteur contre SARM à des doses non cytotoxiques sur la ligné des macrophages. En testant les molécules séparément, l'émodine a donné une bonne concentration minimale inhibitrice (CMI) alors que le kaempférol était modérément actif. Or, le mélange de ces deux molécules à de très petites concentrations a pu augmenter de manière synergique la bioactivité.

**Titre**

Formulation médicale contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline responsable des infections invasives

**Description**

**Domaine technique de l'invention** : La présente invention se rapporte au domaine médical et pharmaceutique, et plus particulièrement à une formulation contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

**Etat de l'art antérieur** :

La pathogénicité et la résistance des SARM constituent toujours un réel problème de la santé public. Les chercheurs intensifient les efforts pour lutter contre cette problématique. Dans ce contexte, on rappelle des brevets qui ont décrit leur démarche pour la mise en œuvre d'une alternative au traitement actuel contre les staphylocoques responsables des infections invasives en utilisant différentes approches comme la nanomédecine<sup>1</sup>, où l'invention Numéro WO 2019/162972 A1 a reporté l'élaboration de nanobiotiques de phage et leur gel doués d'une activité lytique importante contre les SARM *in vitro* et *in vivo*.

Le document N° WO 2017/113031 a démontré l'efficacité des dérivés pyrimido-isoquinoline-quinones dans une composition pharmaceutique contre les SARM<sup>2</sup>.

Plusieurs autres études ont entamé la recherche des molécules bioactives anti SARM d'origine naturelle à partir des plantes médicinales. Parmi les fameuses molécules, l'émodyne était largement étudiée. Il a été démontré que l'émodyne présente diverses activités biologiques, notamment l'activité anti-SARM<sup>3,4</sup>, c'est une molécule qui a présenté une activité antimicrobienne directe contre des souches cliniques et standard du SARM en réduisant les CMI de l'ampicilline et l'oxacilline, des  $\beta$ -lactamines utilisés en mélange avec l'émodyne<sup>5</sup>. Les essais *in vivo* de l'émodyne contre le SARM ont montré que ce composé peut causer une altération de la paroi et de la membrane cellulaire de la bactérie<sup>6</sup>. Cependant, malgré l'efficacité pharmacologique de cette molécule, l'émodyne est très connue par sa faible solubilité et stabilité<sup>7</sup>, sa cytotoxicité à des concentrations élevées ainsi que par son coût élevé. De ce fait, la recherche d'une approche qui pourrait augmenter en synergie sa bioactivité à des concentrations plus faibles est très importante, ce qui a souligné l'importance de tester l'émodyne en combinaison avec d'autres molécules comme le kaempférol appartenant à la famille des flavonoïdes.

### Problèmes techniques

- Malgré les efforts intensifiés pour la découverte des nouveaux agents antimicrobiens, la problématique des souches multirésistantes et surtout les SARM responsables des maladies invasives est toujours en évolution.
- Les traitements actuels ont certainement des effets indésirables non négligeables, et à certaines doses et durée de traitement, ils sont toxiques.
- Les produits d'origine naturelle peuvent constituer une source pertinente des molécules bioactives efficaces et non toxiques.
- L'émodine est une anthraquinone naturelle largement utilisée contre les staphylocoques mais très connue par sa faible solubilité, sa cytotoxicité à des concentrations élevées ainsi que son coût élevé.

### **Exposé de l'invention**

*Staphylococcus aureus* est la principale bactérie pathogène avec un large spectre clinique allant des infections cutanées et des tissus mous aux infections internes invasives telles que la pneumonie, l'endocardite, la bactériémie et la septicémie<sup>8</sup>. La pathogénicité de *S. aureus* est encore compliquée par l'émergence de souches résistantes telles que SARM. Récemment, SARM est devenu la bactérie pathogène prédominante non seulement des infections hospitalières, mais aussi de celles associées à la communauté entraînant une grande propagation et transmission, ce qui conduit à une morbidité et une mortalité élevée<sup>9,10</sup>.

La recherche des autres agents antimicrobiens efficaces, non toxiques et moins chers est devenue une exigence. L'élaboration d'une nouvelle formulation à base des plantes médicinales capable de tuer les bactéries pathogènes comme SARM devient donc une nécessité. A titre d'exemple, l'émodine qui appartient à la famille des anthraquinones est largement testé en pharmacologie et isolé à partir de différentes espèces de plantes.

A cet effet, la présente invention s'intéresse à une formulation qui peut être utilisée contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (SARM ATCC 29213) à base de l'effet synergique entre deux molécules kaempférol et l'émodine isolées de *Rhamnus alaternus*, une plante aromatique et médicinale utilisée au centre du Maroc dans le traitement traditionnel des maladies infectieuses.

### **Brève description des dessins**

**La figure 1** illustre les spectres de la résonance magnétique nucléaire (1H-RMN) de l'émodine (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) et le kaempférol (600 MHz, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O) isolés à partir de *Rhamnus alaternus*.

**La figure 2** présente les spectres de la spectrométrie de masse à ionisation électronique (EIMS) de l'émodyne et le kaempférol isolés à partir de *Rhamnus alaternus*.

**La figure 3** indique les spectres à impact électronique à haute résolution (HREIMS) de l'émodyne et le kaempférol isolés de *Rhamnus alaternus*.

**La figure 4** montre les structures chimiques de l'émodyne (**1**) et le kaempférol (**2**) isolés à partir de l'extrait actif éthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus*.

**La figure 5** illustre un histogramme montrant la différence entre les CMI des molécules seules et en combinaison. En combinaison la CMI de l'émodyne est de 3,9 µg/ml et celle de kaempférol est de 7,81 µg/ml.

### **Description détaillée de l'invention**

Cette intervention décrit une approche qui pourrait augmenter de manière synergique la bioactivité à des concentrations plus faibles des molécules d'origine naturelle contre *Staphylococcus aureus* résistante les antibiotiques et particulièrement la méticilline responsable des maladies invasives. Cette invention concerne particulièrement une formulation à base de l'émodyne et le kaempférol isolés de la plante marocaine *Rhamnus alaternus*. Ladite formulation comporte un mélange de 3,9 µg/ml de l'émodyne et 7,81 µg/ml de Kaempférol. Les dilutions ont été réalisées à partir d'une solution mère des deux molécules à une concentration de 10 mg/ml.

Selon la présente invention, la combinaison des deux molécules d'émodyne et le kaempférol présente un effet de synergie et diminue ainsi les concentrations minimales inhibitrices.

La formulation objet de l'invention peut être utilisée dans la composition d'un médicament contre les maladies et infections causées par *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

Dans une première étape, l'extrait éthanolique actif de *Rhamnus alaternus* a été fractionné par chromatographie sur colonne de gel de silice éluée avec différents gradients des solvants appropriés (Acétate d'éthyle-méthanol-eau distillée (80 :10 :10, 1L)). Quarante-six fractions ont été collectées, combinées sur la base de leurs profils par chromatographie sur couche mince (CCM) en douze fractions (F1-F12) et testées contre les souches de *S. aureus* résistant à la méticilline SARM (ATCC 29213). Comme résultats, trois sous-fractions F3 (175,9 mg), F5 (37,6 mg) et F6 (31,5 mg) étaient les plus actives, et ont fait l'objet d'une autre chromatographie sur colonne de silice éluée avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ Me<sub>2</sub>CO de polarité croissante. La sous-fraction F3 a donné le composé 1 (2,5 mg), la sous-fraction F5 a donné un mélange du composé 1 (0,7 mg) et du composé 2 (3,8 mg) alors que la sous-fraction F6 a donné le composé 2 (16,6 mg).

Dans la deuxième étape, des échantillons à partir de ces deux composés ont été solubilisés dans les solvants deutérés appropriés dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre pour être analysés par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN-1H) (Figure 1) complétée par la spectrométrie de masse (SM) afin de confirmer les structures des deux composés isolés de l'extrait éthanolique de *Rhamnus alaternus*. Par conséquent, les spectres de RMN ont été enregistrés avec un spectromètre de type Brüker Avance 600 (fréquence de 600.13 MHz (1H)), puis analysés par un logiciel de traitement des données Topspin 2.1. De plus, les analyses par spectrométrie de masse à savoir MS à ionisation électrique (EIMS) (Figure 2) et MS à impact électronique à haute résolution (HREIMS) (Figure 3) ont été réalisées à l'aide d'un "Micromass Autospec Spectrometer". La figure 4 montre les structures identifiées des deux composés où le composé 1 a été défini comme émodyne alors que le composé 2, le kaempférol.

Dans la troisième étape, les deux molécules ont été testées contre SARM (ATCC 29213), une souche de référence dont le profil antibiogramme a été déterminé. Cette souche a montré un indice de multirésistance de 75%. En plus de la résistance à la méticilline, SARM (ATCC 29213) était résistante à douze autres antibiotiques parmi seize testés. F5 ayant présentée l'activité la plus importante contenait un mélange de ces deux molécules ce qui nous a mené à évaluer l'effet synergique. De ce fait, l'évaluation de la synergie entre l'émodyne et le kaempférol a été réalisée dans une plaque à 96 puits en utilisant la méthode du damier comme décrit dans la littérature<sup>11,12</sup>. Pour se faire, dix concentrations d'émodyne et huit concentrations de kaempférol ont été préparées en dilutions en série 1/2 à partir des solutions mères de 10 mg/mL. Par la suite, l'émodyne à des concentrations décroissantes (62,5-0,1220 µg/mL) a été introduite horizontalement dans les microplaques à 96 puits et le kaempférol (250-1,953 µg/mL) a été introduit verticalement. Après cela, du milieu Luria-Bertani contenant la suspension bactérienne du SARM à une concentration de 5×10<sup>5</sup> UFC/mL a été ajouté, puis la microplaque a été incubée à 37 °C pendant 24 h. L'analyse de la combinaison a été obtenue en calculant la concentration inhibitrice fractionnaire (CIF) à savoir que la CIF de l'émodyne est la concentration minimale inhibitrice lorsqu'il est utilisé en combinaison avec le kaempférol, divisée par la concentration minimale inhibitrice de l'émodyne utilisé seul, qui mène au calcul de l'indice de CIF, qui est la somme des CIF des deux molécules en combinaison, et qui définit la nature de leur interaction comme suit :

$$\sum \text{ICIF} = \text{CIF}(\text{Emodyne}) + \text{CIF}(\text{Kaempferol}) \quad \text{Eq:1}$$

Où

$$\text{CIF (Emodine)} = \frac{\text{CMI (Emodine) en combinaison}}{\text{CMI (Emodine) seul}} \quad \text{Eq: 2}$$

Et

$$\text{CIF (Kaempférol)} = \frac{\text{CMI (Kaempférol) en combinaison}}{\text{CMI (Kaempférol) seule}} \quad \text{Eq: 3}$$

Les interprétations de cet indice selon la littérature<sup>11,12</sup> sont les suivantes :

S, synergie (CIF  $\leq 0,5$ ) ;

A, additif (CIF  $> 0,50$  et  $< 1$ ) ;

I, indifférent (CIF  $> 1$  et  $\leq 4$ ) ;

An, antagonisme (CIF  $> 4$ ) ;

Comme indique la figure 5, séparément la CMI de l'émodyne était de 15,63  $\mu\text{g/mL}$ , alors que celle du kaempférol était de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Alors que la CMI de l'émodyne en combinaison avec le kaempférol était 3,90  $\mu\text{g/mL}$  et du kaempférol 7,81  $\mu\text{g/mL}$ .  $\Sigma\text{ICIF}$  calculé dans la présente invention est de 0,27, ce qui confirme un effet synergique très remarquable entre les deux molécules contre le SARM. La formule a permis de réduire la CMI de l'émodyne 4 fois et celle de kaempférol 64 fois. Autrement dit, le mélange en plus de son activité plus importante, il nous a permis d'utiliser de très petites concentrations des deux molécules (surtout celle de l'émodyne) et donc d'économiser le cout, réduire la cytotoxicité causée par l'utilisation des concentrations élevées ainsi que d'augmenter la solubilité de l'émodyne utilisé en petites dose en comparaison avec celle de kaempférol.

Dans la dernière étape, nous avons testé la cytotoxicité des molécules afin de vérifier le profil de sécurité des deux molécules vis-à-vis de la ligné cellulaire des macrophages. Ce test a été effectué comme décrit dans la littérature<sup>13</sup>.  $2 \times 10^5$  de cultures de macrophages de la ligné J774A.1 ont été placées dans une microplaque à 96 puits pendant 2 h dans un incubateur à 5% de  $\text{CO}_2$  à 37 °C, puis des dilutions en série des 2 molécules ont été préparées en puits profond, puis transmises à la microplaque contenant la culture des macrophages donnant un volume final de 100  $\mu\text{L}$ . Enfin, la microplaque a été incubée dans une atmosphère à 5% de  $\text{CO}_2$  pendant 24 h. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été évalué à l'aide du réactif alamarBlue® (10%). Les valeurs  $\text{CC}_{50}$  (Concentration amenant une cytotoxicité de 50%) ont été été satisfaisantes avec

aucun effet cytotoxique à la dose testée ( $CC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ ) des deux molécules vis-à-vis de la lignée cellulaire des macrophages.

Selon l'invention, cette formule peut être utilisé pour fabriquer un médicament antibactérien destiné à tuer les SaRM.



## References

- (1) Rezai, M. S.; Rahimzadeh, G.; Gill, P.; Saeedi, M. Fabrication of Phage Nanobioparticles against Burn Wound Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Infections, 2019.
- (2) Velasquez, V.; Andrades, L.; Campanini, S. Pyrimido-Isoquinolin-Quinone Derivative Compounds, and Pharmaceutically Acceptable Salts, Isomers and Tautomers Thereof; Pharmaceutical Composition; Preparation Method; and Use Thereof in the Treatment of Diseases Caused by Bacteria and Multidrug-Resista, 2018.
- (3) Chalothorn, T.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Pannara, S.; Tansakul, C. Synthesis and Antibacterial Activity of Emodin and Its Derivatives against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60* (35), 151004. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.151004>.
- (4) Ye, P.; Wei, S.; Luo, C.; Wang, Q.; Li, A.; Wei, F. Long-Term Effect against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus of Emodin Released from Coaxial Electrospinning Nanofiber Membranes with a Biphasic Profile. *Biomolecules* **2020**, *10* (3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/biom10030362>.
- (5) Lee, Y. S.; Kang, O. H.; Choi, J. G.; Oh, Y. C.; Keum, J. H.; Kim, S. B.; Jeong, G. S.; Kim, Y. C.; Shin, D. W.; Kwon, D. Y. Synergistic Effect of Emodin in Combination with Ampicillin or Oxacillin against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *Pharm. Biol.* **2010**, *48* (11), 1285–1290. <https://doi.org/10.3109/13880201003770150>.
- (6) Liu, M.; Peng, W.; Qin, R.; Yan, Z.; Cen, Y.; Zheng, X.; Pan, X.; Jiang, W.; Li, B.; Li, X.; Zhou, H. The Direct Anti-MRSA Effect of Emodin via Damaging Cell Membrane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99* (18), 7699–7709. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6657-3>.
- (7) Qiu, N.; Zhao, X.; Liu, Q.; Shen, B.; Liu, J.; Li, X.; An, L. Inclusion Complex of Emodin with Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin: Preparation, Physicochemical and Biological Properties. *J. Mol. Liq.* **2019**, *289*, 111151. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111151>.
- (8) Tong, S. Y. C.; Davis, J. S.; Eichenberger, E.; Holland, T. L.; Fowler, V. G. Staphylococcus Aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28* (3), 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>.
- (9) Klevens, R. M.; Morrison, M. A.; Nadle, J.; Petit, S.; Gershman, K.; Ray, S.; Harrison, L. H.; Lynfield, R.; Dumyati, G.; Townes, J. M.; Craig, A. S.; Zell, E. R.; Fosheim, G. E.; McDougal, L. K.; Carey, R. B.; Fridkin, S. K. Invasive Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Infections in the United States. *J. Am. Med. Assoc.* **2007**, *298* (15), 1763–1771. <https://doi.org/10.1001/jama.298.15.1763>.
- (10) Naimi, T. S.; LeDell, K. H.; Como-Sabetti, K.; Borchardt, S. M.; Boxrud, D. J.; Etienne, J.; Johnson, S. K.; Vandenesch, F.; Fridkin, S.; O'Boyle, C.; Danila, R. N.; Lynfield, R. Comparison of Community- and Health Care - Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Infection. *J. Am. Med. Assoc.* **2003**, *290* (22), 2976–2984. <https://doi.org/10.1001/jama.290.22.2976>.

- (11) Papoutsaki, V.; Galani, I.; Papadimitriou, E.; Karantani, I.; Karaiskos, I.; Giamarellou, H. Evaluation of in Vitro Methods for Testing Tigecycline Combinations against Carbapenemase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Isolates. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2020**, *20*, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.028>.
- (12) White, R. L.; Burgess, D. S.; Manduru, M.; Bosso, J. A. Comparison of Three Different in Vitro Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E Test. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40* (8), 1914–1918. <https://doi.org/10.1128/aac.40.8.1914>.
- (13) Chiboub, O.; Sifaoui, I.; Lorenzo-Morales, J.; Abderrabba, M.; Mejri, M.; Fernández, J. J.; Piñero, J. E.; Díaz-Marrero, A. R. Spiralyde A, an Antikinetoplastid Dolabellane from the Brown Alga *Dictyota Spiralis*. *Mar. Drugs* **2019**, *17* (3), 1–11. <https://doi.org/10.3390/md17030192>.

**Bacillus pumilus strain X22**

Accession number (FJ763645.1)

Fd1 amorce

AGGAGGTGGCGCCGTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGG  
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGA  
TAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACCTTACAGATGGACCCGCGGCGCA  
TTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA  
CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCT  
GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGC  
GAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT  
GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA  
TTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA  
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT  
GAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  
CGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA  
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGAC  
AGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT  
GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGC  
TGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGT  
GAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCC  
CGTCACACCACGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGTGACA  
AGAGAG

R16 amorce

CTCTCTTGCTACTTCGGCGGCTGGCACCATAAAGGTTACCTCCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAACCTCTCGTG  
GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGAT  
TCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTATGGGATTGGCTAAACCTTG  
CGGTCTTGACAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGAC  
GTCATCCCCACCTTCTCCGTTTTGTACCGGCAGTCACCTTCAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGA  
TCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCT  
GTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTC  
GCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGC  
GACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAG  
CACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCA  
GTTACAGACCAGAGAGTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAA  
TTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGTTGAGCCGGGGGCTTTCACAT  
CAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCG  
CGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCGA

**Sphingobacterium suaedae strain T47**

**Accession number (NR\_145877.1)****Fd1 amorce**

TTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAATACATGCAAGTCGGACGGGATCCATCG  
GAGAGCTTGCTCGAAGATGGTGAGAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGAGCAACCTACCCATATCAGGG  
GGATAGCCCCGAGAAATCCGGATTAACACCGCATGAGACAGTATTACCGCATGGTATAGCTGTTAAATATTTA  
TAGGATATGGATGGGCTCGCGTGACATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGTCTAG  
GGGCTCTGAGAGGAGAATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAG  
GAATATTGGTCAATGGGCGGAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAA  
CTGCTTTTATCCGGGAATAAACCCAGTACGTGACTGGGCTGAATGTACCGGAAGAATAAGGATCGGCTAAC  
TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCGTAG  
GCGGCCCGTTAAGTCAGGAGTGAAAGACGGCAGCTCAACTGTCGCAGTGCTCTTGATACTGATGGGCTTGAAT  
CCAGTTGAAGTGGGCGGAATAAGACAAGTAGCGGTGAAATGCATAGATATGTCTTAGAACTCCGATTGCGAA  
GGCAGCTCACTAAAGTGGTATTGACGMTGATGCACGAAAGCGTGGGGATCGAACAGGATTAGATACCCTGGT  
AGTCCACGCCTTAAACGATGATGACTCGATGTTAGCGATATATTGTTAGCGTCCAAGCGAAAGCGTTAAGTCAT  
CCACCTGGGGAGTACGCCCGCAAGGGTGAAGTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGAGGAGCA  
TGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAAGTTAGTGAAGGATGCAGAGACGCATC  
CGTCCTTCGGGACACGAACTAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCC  
CGCAACGAGCGCAACCCCTATGTTTAGTTGCCAGCATGTTATGGTGGGGACTCTAACAGACTGCCTGCGCAA  
GCAGTGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTCGGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GACGGTACAACGGGACGCTACACAGCAATGTGATGCCAATCTTTAAAAGCCGTTACAGTTCGGATCGGGGTC  
TGCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGATTGCTAGTAATCGCGTATCAGCAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGG  
GCCTTGACACACCGCCCGTCAAGCCATGAAAGCTGGGGGTGCCTAAAGCATGTAACCGCAAGGAGCGTGTT  
AGGGCAAACCGGTAATTGGGGCTAAGTCGTAACAAGGTAACCAATC

**R16 amorce**

GATTGGTTACCTTGTTACGACTTAGCCCCAATTACCGGTTTTGCCCTAACACGCTCCTTGCGGTTACATGCTTTA  
GGCACCCCCAGCTTTCATGGCTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGTCATTGCTG  
ATACGCGATTACTAGCGAATCCAACCTCACGGGGTCGAGTTGCAGACCCCGATCCGAACGTGAACGGCTTTT  
AAAGATTGGCATCACATTGCTGTGTAGCTGCCCCTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCCGACGTA  
AGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCGCCCTCCTCACTGCTTGCAGGAGGAGGAGTCTGTTTAGAGTCCCC  
ACCATAACATGCTGGCAACTAAACATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACACCTCACGGCACGA  
GCTGACGACAGCCATGCAGCA

**Revendications modifiées**

1. Formulation pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comporte un mélange de deux molécules d'émodyne et le kaempférol.
2. Formulation pharmaceutique, selon la revendication 1, caractérisée en ce que le mélange comporte 0,39 % d'émodyne et 0,781 % de kaempférol.
3. Formulation pharmaceutique, selon la revendication 1, caractérisée en ce que les deux molécules d'émodyne et le kaempférol sont extraites à partir de la plante *Rhamnus alaternus*.
4. Formulation pharmaceutique, selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est utilisée contre *Staphylococcus aureus* résistantes aux antibiotiques.
5. Formulation pharmaceutique, selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est utilisée contre *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline.
6. Formulation pharmaceutique, selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la structure des deux molécules d'émodyne et de kaempférol comporte plusieurs sites d'interaction chimique permettant un effet synergique et améliorant l'effet antistaphylococcique.
7. Formulation pharmaceutique, selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la structure chimique de l'émodyne et de kaempférol ne comporte pas de groupements ou réactions chimiques toxiques sur la lignée cellulaire des macrophages.
8. Formulation pharmaceutique, selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle peut être utilisée dans la composition d'un médicament contre les maladies et infections causées par *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

Dessins

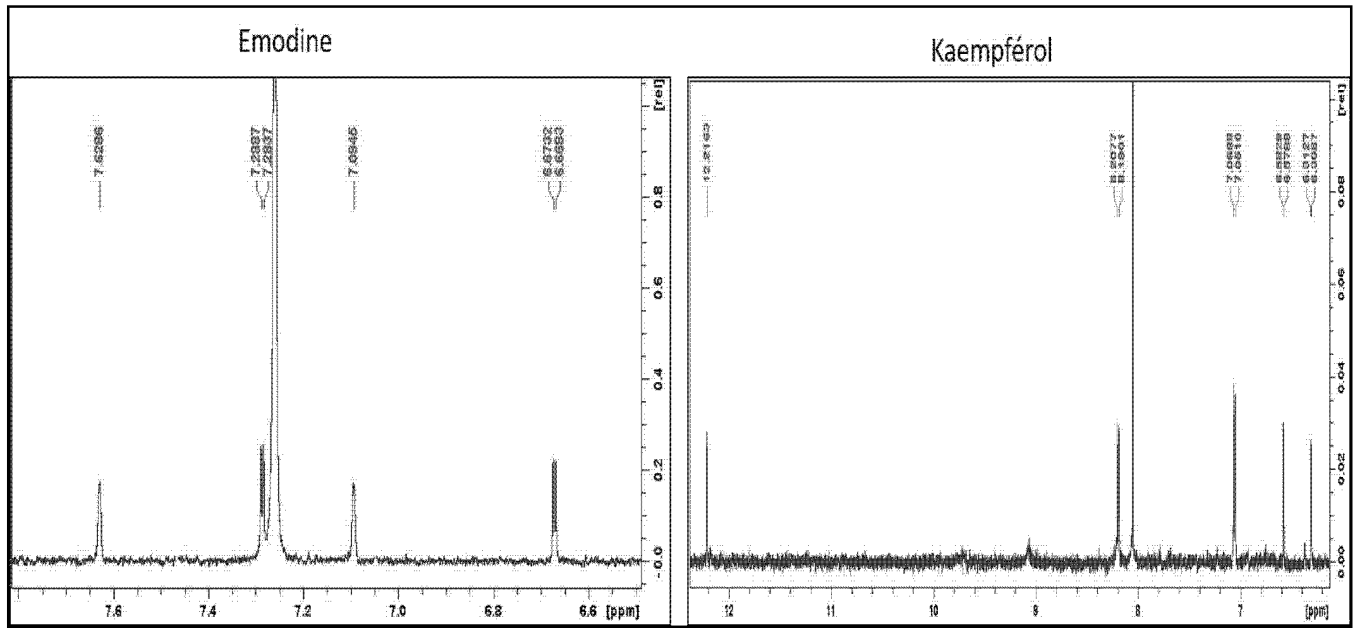


Figure 1

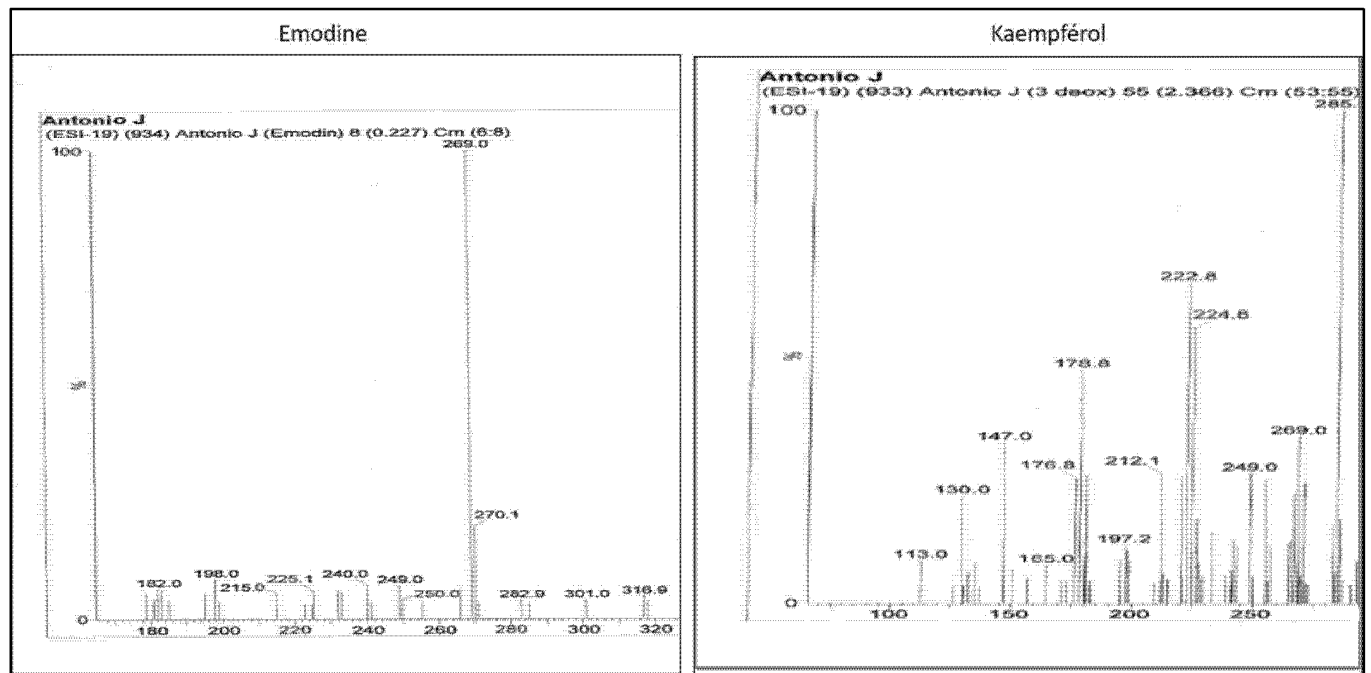


Figure 2

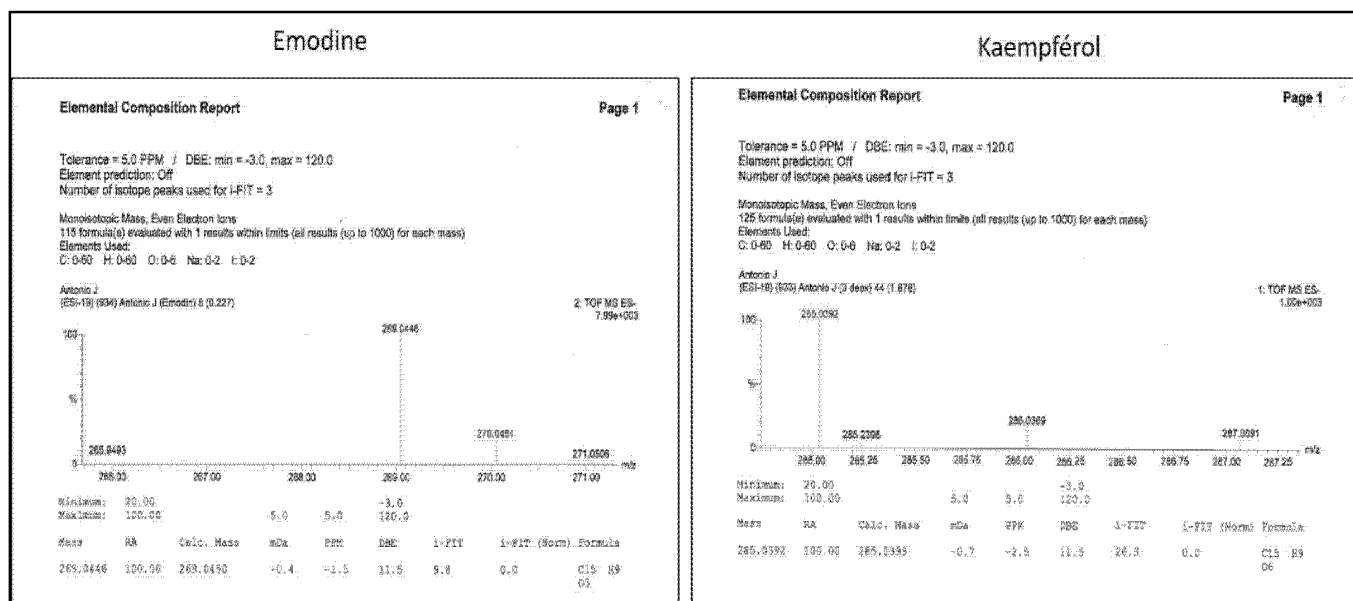


Figure 3

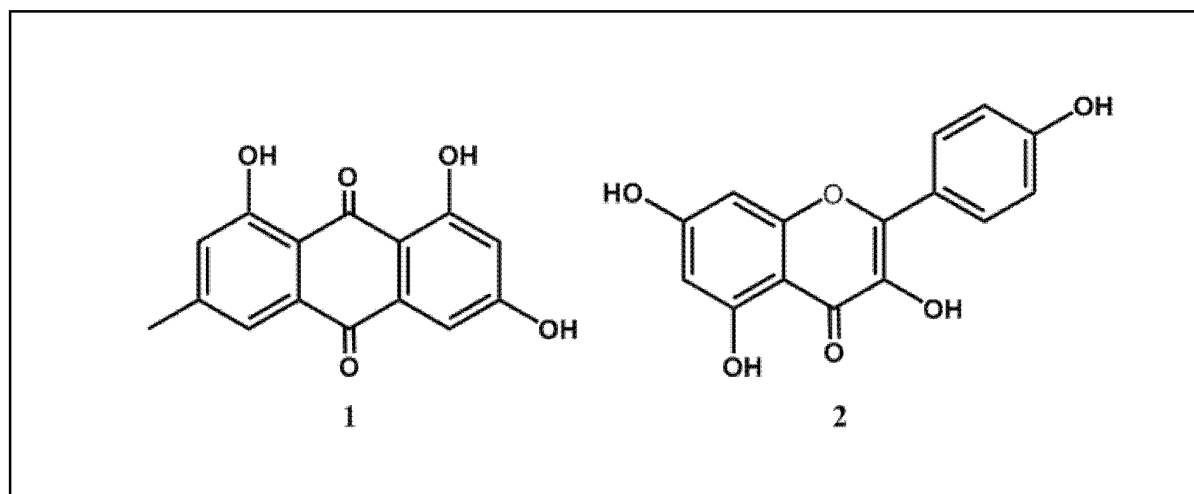


Figure 4

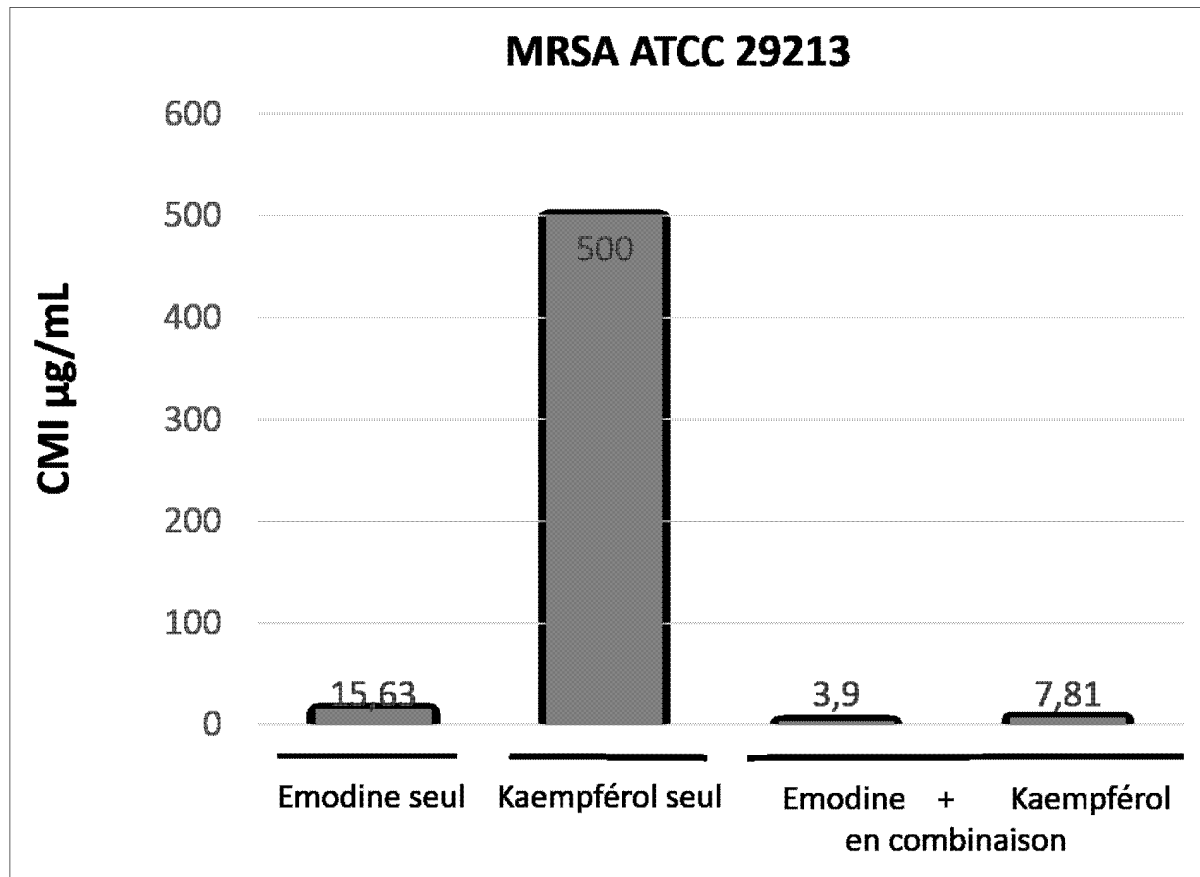
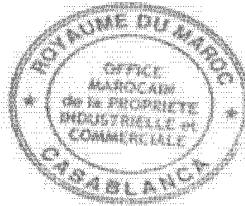


Figure 5



## RAPPORT DE RECHERCHE DEFINITIF AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE

Établi conformément à l'article 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 : 51937	Date de dépôt : 09/12/2020 ;
Déposant : Université Sidi Mohammed Ben Abdellah et Universidad de La Laguna	
Intitulé de l'invention : FORMULATION MÉDICALE CONTRE STAPHYLOCOCCUS AUREUS RÉSISTANT À LA MÉTICILLINE RESPONSABLE DES INFECTIONS INVASIVES	
<b>Classement de l'objet de la demande :</b> CIB: A61K36/72, A61P31/04 CPC: A61K36/72	
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	
Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Remarques de clarté <input type="checkbox"/> Cadre 4 : Observations à propos de revendications modifiées qui s'étendent au-delà du contenu de la demande telle qu'initialement déposée <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: Redouane TELLAA	Date d'établissement du rapport : 20/10/2022
Téléphone: (+212) 5 22 58 64 14	

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

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

- Demande telle qu'initialement déposée
- Demande modifiée suite à la notification du rapport de recherche préliminaire :
- Revendications  
8
- Observations à l'appui des revendications maintenues
- Observations des tiers suite à la publication de la demande
- Réponses du déposant aux observations des tiers
- Nouveaux documents constituant des antériorités :
- Suite à la recherche complémentaire (Couvrant les documents de l'état de la technique qui n'étaient pas disponibles à la date de la recherche préliminaire)
  - Suite à la recherche additionnelle (couvrant les éléments n'ayant pas fait l'objet de la recherche préliminaire)
- Observations à l'encontre de la décision de rejet

**Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité****Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté	Revendications 1 - 8	Oui
	Revendications aucune	Non
Activité inventive	Revendications 1 - 8	Oui
	Revendications aucune	Non
Application Industrielle	Revendications 1 - 8	Oui
	Revendications aucune	Non

Il est fait référence aux documents suivants:

D1 : SYNERGISTIC EFFECT OF EMODIN IN COMBINATION WITH AMPICILLIN OR OXACILLIN AGAINST METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS

**1. Nouveauté**

Aucun document de l'état de la technique ne divulgue une formulation pharmaceutique à base d'émodine et de Kaempférol telle que décrite dans la revendication 1 de la présente demande.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-8 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 D1 est considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 de la présente demande, il décrit l'activité antimicrobienne de l'émodine (EM) isolée de *Rheum palmatum* en combinaison avec l'ampicilline (AM) ou l'oxacilline (OX) contre plusieurs souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM). L'activité combinée de l'EM et de deux agents antimicrobiens (AM, OX) contre les souches a entraîné un indice de concentrations inhibitrices fractionnaires (FICI) allant de 0,37 à 0,5 et de 0,37 à 0,75, respectivement. L'effet de l'EM avec AM et OX s'est avéré être synergique ou partiellement synergique.

L'objet de la revendication 1 de la présente demande diffère de D1 en ce que la formulation comprend la Kaempférol en plus de l'émodine.

Le problème que la présente demande se propose de résoudre peut être considéré comme la fourniture d'une formulation alternative pour le traitement des infections dû au *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM).

La solution proposée dans la revendication 1 de la présente demande peut être considérée comme impliquant une activité inventive pour les raisons suivantes :

Aucun document de l'état de la ne divulgue ou suggère l'utilisation d'une formulation à base de Kaempférol en plus de l'émodine traitement des infections dû au *Staphylococcus aureus* résistant à la Méthicilline (SARM). Même si l'art antérieur décrit l'activité antibactérienne de ces deux composés d'une manière séparée, l'homme de métier ne s'attendrait à l'effet synergique résultant de leur association, le test des CMI's décrit dans la figure 5 de la présente demande prouve l'effet synergique revendiqué.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-8 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.

## **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.