

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
04 juin 2020 (04.06.2020)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2020/111921 A1

(51) Classification internationale des brevets :

C07F 9/6509 (2006.01) A61K 31/6615 (2006.01)
C07D 295/185 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)

Route De Meknes, Fes, 30000 (MA). **UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE BENI MELLAL** [MA/MA] ; AV Ibn Khaldoun BP 591, Beni Mellal, 23000 (MA).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/MA2019/000013

(22) Date de dépôt international :

29 novembre 2019 (29.11.2019)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

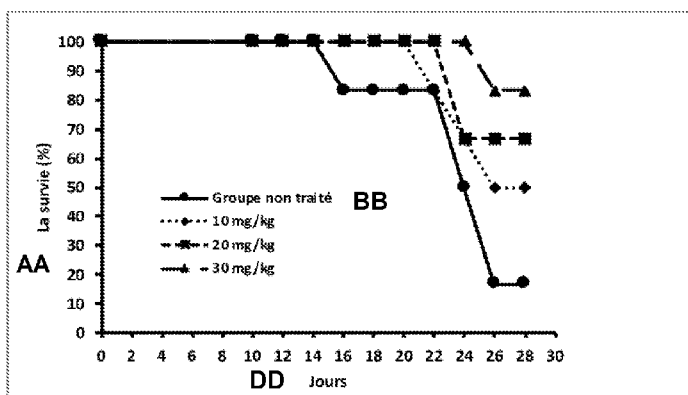
44038 29 novembre 2018 (29.11.2018) MA

(71) Déposants : **UNIVERSITE EUROMEDITERRANEE DE FES** [MA/MA] ; Rond Point Bensouda,

(72) Inventeurs : **EL KAZZOULI, Saïd** ; Rond Point Bensouda, Route De Meknes, Fes, 30000 (MA). **ZYAD, Abdelmajid** ; AV IBN Khaldoun BP 591, Beni Mellal, 23000 (MA). **EL BRAHMI, Nabil** ; Rond Point Bensouda, Route De Meknes, Fes, 30000 (MA). **EL ABOUCHI, Abdelmoula** ; Rond Point Bensouda, Route De Meknes, Fes, 30000 (MA). **BOUJDI, Khalid** ; Rond Point Bensouda, Route De Meknes, Fes, 30000 (MA). **BOUSMINA, Mostapha** ; Rond Point Bensouda, Route De Meknes, Fes, 30000 (MA). **AIT MOUSE, Hassan** ; Av Ibn Khaldoun BP 591, Beni Mellal, 23000 (MA). **TILAOU, Mounir** ; Av Ibn Khaldoun BP 591, Beni Mellal, 23000 (MA).

(54) Title: ANTI-CANCER ACTIVITIES OF A NEW FAMILY OF ETHACRYNIC ACID DERIVATIVES

(54) Titre : ACTIVITÉS ANTICANCÉREUSES D'UNE NOUVELLE FAMILLE DES DÉRIVÉS DE L'ACIDE ETHACRYNIQUE



CC Courbes de survie des souris traitées par le composé P4.

CC Survival curves for mice treated with compound P4

(57) Abstract: The present invention relates to a new class of small anti-cancer molecules derived from ethacrynic acid (symbolized by AE). The invention relates to the *in vitro* and *in vivo* anti-cancer activities and to the methods for producing the new AE family. New AE analogues were synthesized and then the *in vitro* cytotoxic activities thereof were evaluated on the P815 tumour cell line using the MTT test. The AE derivative which exhibited the best *in vitro* cytotoxicity was then tested *in vivo* using the DBA2/P815 (H₂d) mouse model. At 30 mg/kg, the effective dose, the animals showed general tolerance with a percentage survival of around 80%, and no significant weight loss was observed.

(57) Abrégé : 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'AE 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'AE, qui a présenté la meilleure cytotoxicité *in vitro*, a été ensuite testé *in vivo* en

(74) **Mandataire : BOUNOU, Salim** ; Rond Point Bensouda,
Route De Meknes, Fes, 30000 (MA).

(81) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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))*

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

Activités anticancéreuses d'une nouvelle famille des dérivés de l'acide ethacrynique

Saïd El Kazzouli¹, Abdelmajid Ziyad², Nabil El Brahmi¹, Abdelmoula El Abbouchi¹, Khalid Boujdi¹, Mustapha Bousmina¹, Hassan Ait Mouse², Mounir Tilaoui²

¹ Euromed Research Center, Euro-Mediterranean University of Fes (UEMF)

Fès-Shore, Route de Sidi Hrazem, 30070 Fès, Morocco

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

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'**AE** 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'**AE**, qui a présenté la meilleure 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.

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'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 possède une fonction acide et une unité carbonyle α,β -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 l'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'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'AE *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'AE. 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'AE (**P3**, **P4** et **P5**) contre la lignée tumorale P815.

Table 1 Valeurs des IC₅₀ 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'AE sont préparés à partir de l'AE commercialement disponible (schéma 1). Le traitement de l'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'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.

Méthode générale pour la préparation des molécules **P3** et **P4**. A un mélange de EDCI (1.2 équiv), DMAP (en quantité catalytique) et 1 équivalent de AE dans DMF anhydre (5 mL), 1 équivalent des amines (4-hydroxyphenyl pipérazine ou 4-methoxyphenyl 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 MgSO₄ 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 ^1H (CDCl_3 ; 400 MHz), δ (ppm): 7.16 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.00 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_{ar}), 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 ^{13}C (CDCl_3 , 101 MHz); δ (ppm): 195.8 (C, C(=O)), 165.3 (C, C(=O)N), 155.2 (C, C_{ar}), 150.7 (C, C_{ar}), 150.2 (C, C_{ar}), 144.9 (C, C_{ar}), 133.8 (C, C_{ar}), 131.4 (C, C_{ar}), 128.8 (CH_2 , C=CH $_2$), 127.1 (2CH, CH_{ar}), 122.8 (C, C_{ar}), 119.3 (CH, CH_{ar}), 116.0 (2CH, CH_{ar}), 110.37 (CH, CH_{ar}), 68.7 (CH_2), 51.5 (CH_2), 50.7 (CH_2), 45.7 (CH_2), 42.4 (CH_2), 23.4 (CH_2), 12.4 (CH_3). HRMS (+ESI) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculer pour $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4$: 463.1188, trouver, 463.1192. IR (neat): $\nu = 3325$ (OH), 1654 (C=O), 1645 (C=C) cm^{-1} .

P4. Rendement = 47%. (DCM/EtOAc (8:2 (v/v))). RMN ^1H (CDCl_3 ; 400 MHz) ; δ (ppm): 7.15 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_{ar}), 6.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_{ar}), 6.93-6.82 (m, 4H, H_{ar}), 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 ^{13}C (CDCl_3 ; 101 MHz); δ (ppm): 195.9 (C, C(=O)), 165.3 (C, C(=O)N), 155.4 (C, C_{ar}), 154.7 (C, C_{ar}), 150.3 (C, C_{ar}), 145.2 (C, C_{ar}), 133.9 (C, C_{ar}), 131.7 (C, C_{ar}), 128.8 (CH_2 , C=CH $_2$), 127.3 (2CH, CH_{ar}), 123.0 (C, C_{ar}), 119.3 (CH, CH_{ar}), 114.7 (2CH, CH_{ar}), 110.9 (CH, CH_{ar}), 68.9 (CH_2), 55.7 (OCH_3), 51.6 (CH_2), 51.0 (CH_2), 45.8 (CH_2), 42.6 (CH_2), 23.7 (CH_2), 12.6 (CH_3).

HRMS (+ESI) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculer pour $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4$: 477.1348, trouver, 477.1324. IR (neat): $\nu = 1661$ (C=O) cm^{-1} . Analyses élémentaires pour $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4$; 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_4 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 ^{31}P (CDCl_3 ; 162 MHz), δ (ppm): -5.8 (s, P). RMN ^1H (CDCl_3 ; 400 MHz), δ (ppm): 7.18-7.09 (m, 3H, H_{ar}), 6.98 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_{ar}), 6.88-6.82 (m, 2H, H_{ar}), 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 ^{13}C (CDCl_3 ; 101 MHz), δ (ppm): 195.9 (C, C=O), 165.3 (C, C(=O)N), 155.3 (C, C_{ar}), 150.3 (C, C_{ar}), 148.2 (C, C_{ar}), 144.9 (d, $J = 7.0$ Hz, C, C_{ar}), 133.9 (C, C_{ar}), 131.6 (C, C_{ar}), 128.8 (CH_2 , C=CH $_2$), 127.2 (CH, C_{ar}), 122.9 (C, C_{ar}), 120.8 (d, $J = 4.7$ Hz, 2CH, C_{ar}), 118.2 (2CH, C_{ar}), 110.8 (CH, C_{ar}), 68.9 (CH_2 , OCH_2), 64.6 (d, $J = 6.1$ Hz, 2CH $_2$), 50.7 (CH_2), 50.0 (CH_2), 45.6 (CH_2), 42.3 (CH_2), 23.5 (CH_2), 16.2 (d, $J = 6.7$ Hz, 2CH $_3$), 12.5 (CH $_3$). HRMS (+ESI) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculer pour $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_7\text{P}$: 599.1481, trouver, 599.1486. IR (neat): $\nu = 1663$ (C=O) cm^{-1} .

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 $\mu\text{g/mL}$ streptomycine et 0,2% de sodium bicarbonate (Sigma) dans une atmosphère humide à 37°C et à 5% de CO_2 .

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 4×10^4 cellules/mL à incuber dans 100 μL 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 (**P3**, **P4** et **P5**) obtenues par des dilutions de demi en demi, dans 100 μL de milieu DMEM. Chaque essai est réalisé en double et répété trois fois avec les témoins positifs et négatifs. Les trois molécules **P3**, **P4** et **P5** 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_2 pendant 48h.

La détermination de l'activité cytotoxique est réalisée en évaluant la concentration des molécules testées inhibant 50% de la croissance cellulaire (IC_{50}) par rapport à un témoin cultivé dans les mêmes conditions en 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 μ L 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 μ L 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 **P3**, **P4** et **P5** 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 (**P3**, **P4** et **P5**) et/ou le Méthotrexate MTX (utilisé comme contrôle positif)

DO_{con} : 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^d) 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 10⁷ cellules vivantes en suspension dans un volume de 100 μ 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 μ 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 μ 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 $p < 0,05$.

RESULTATS

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 μ M (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 $IC_{50}=0,15\mu$ M. Ainsi, le composé **P4** a été évalué pour son effet antitumoral.

Activité antitumorale: études précliniques

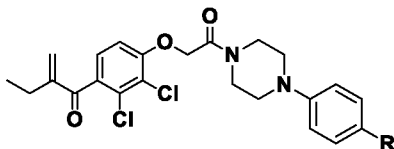
Les tests *in vivo* représentent une étape importante de l'étude de l'activité antitumorale de notre molécule. L'objectif est de passer à un test dans des conditions se rapprochant au mieux de la réalité de la maladie. A cet effet, des souris DBA-2 (H2^d) porteuses de tumeurs solides P815 ont été utilisées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

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.

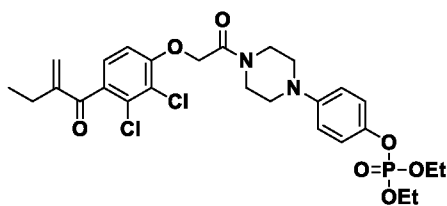
Revendications.

1. Procédé de synthèse de nouveaux dérivés amides de l'**AE** à partir de l'**AE** commercial et différentes amines primaires et secondaires comme précurseurs de départ, comprenant les étapes suivantes :

a) réaction de l'acide éthhacrynique **AE** avec les amines dans un mélange de dichlorométhane (DCM) et *N,N*-diméthylformamide (DMF) en présence de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) et de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) pour obtenir des composés **P** de formule R= OH ou OMe :



b) la réaction entre le diéthyl chlorophosphate et le composé **P3** (R= OH), formé à l'étape (a) dans le dichlorométhane (DCM) à température ambiante en présence de la triéthylamine abouti au composé de la formule **P5**



2. Procédé de synthèse selon la revendication 1, abouti aux dérivés amides de l'acide ethacrynique avec des groupements 4-(piperazin-1-yl)phenol pour le composé **P3**, 1-(4-methoxyphenyl)piperazine pour le composé **P4** et diéthyl (4-(piperazin-1-yl)phenyl)phosphate pour le composé **P5**.
3. Procédé pour inhiber ou traiter le cancer *in vitro* des composés de la revendication 2.
4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel le cancer est une lignée cancéreuse P815
5. Le composé **P4** selon la revendication 4, a été testé en études précliniques sur un modèle de souris. Le modèle choisi est constitué de la lignée tumorale P815 et la souche de souris DBA2 (H2^d) syngénique.
6. Selon la revendication 5, au moins trois doses du composé P4 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**.
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. La dose 30 mg/kg, est considérée comme la dose effective.

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

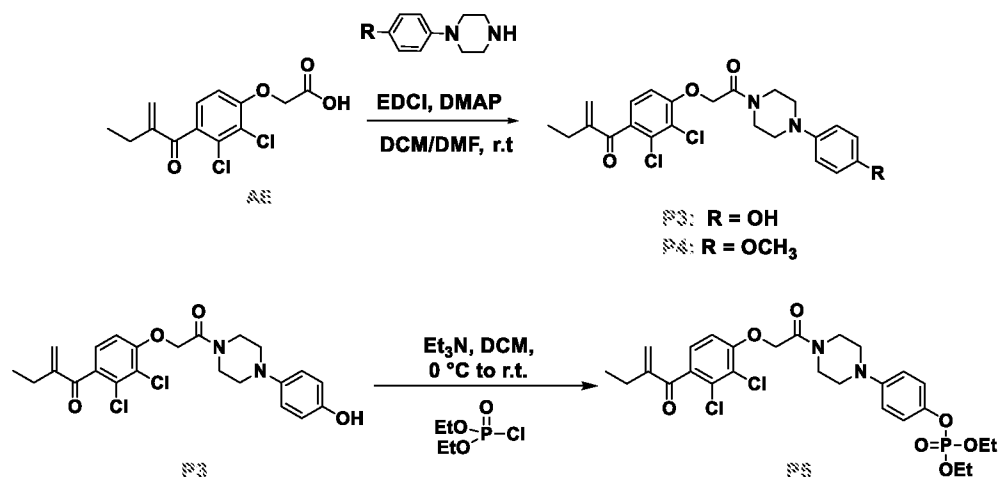


Schéma 1. Synthèse des dérivés de l'AE : P3, P4 et P5

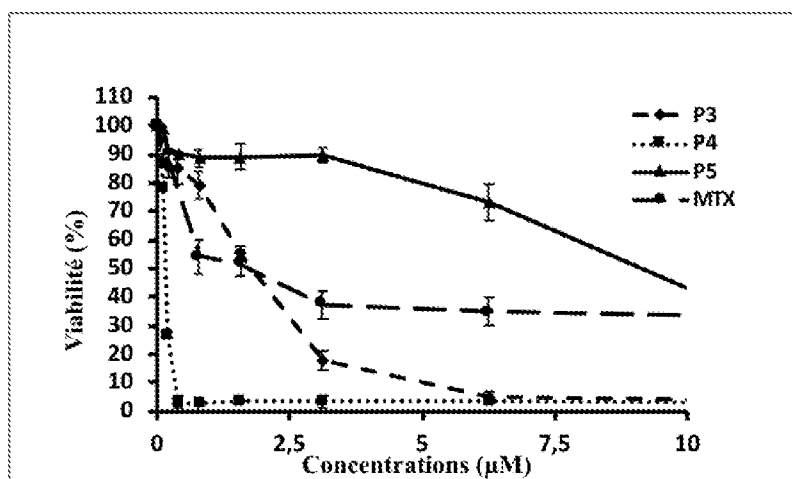


Figure 1. Activité cytotoxique des dérivés de l'AE (P3, P4 et P5) contre la lignée tumorale P815

Table 1 Valeurs des IC₅₀ des composés P3, P4 et P5

Molécules	P3	P4	P5	MTX
IC ₅₀ (μM)	1,8± 0,3	0,15±0,01	9,2±2	2,4 ± 0,5

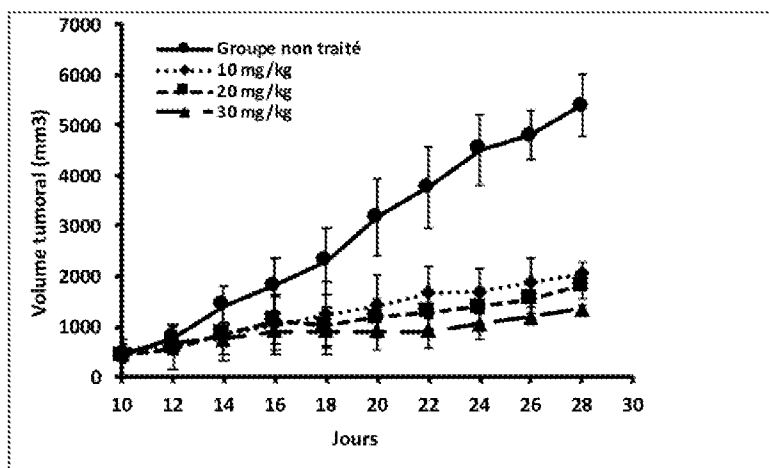


Figure 2. Effet de la molécule **P4** sur l'évolution tumorale chez des souris DBA2 porteuses de tumeurs

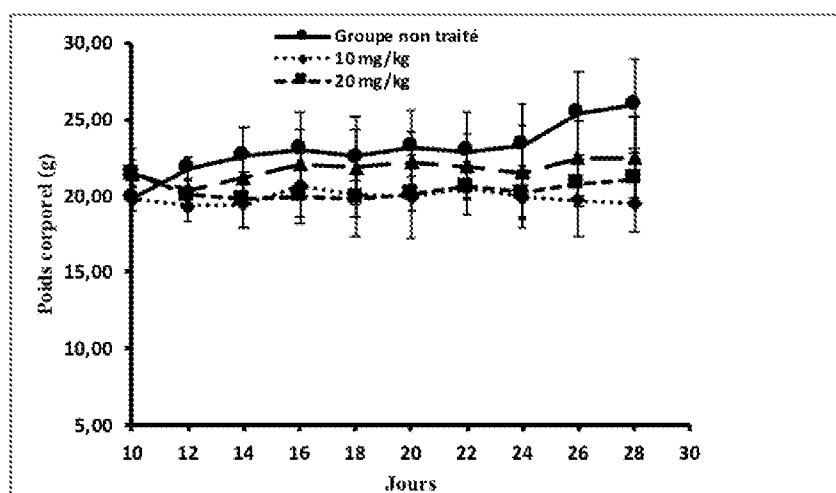


Figure 3. Evolution du poids corporel des souris DBA2 traitées par le composé **P4**.

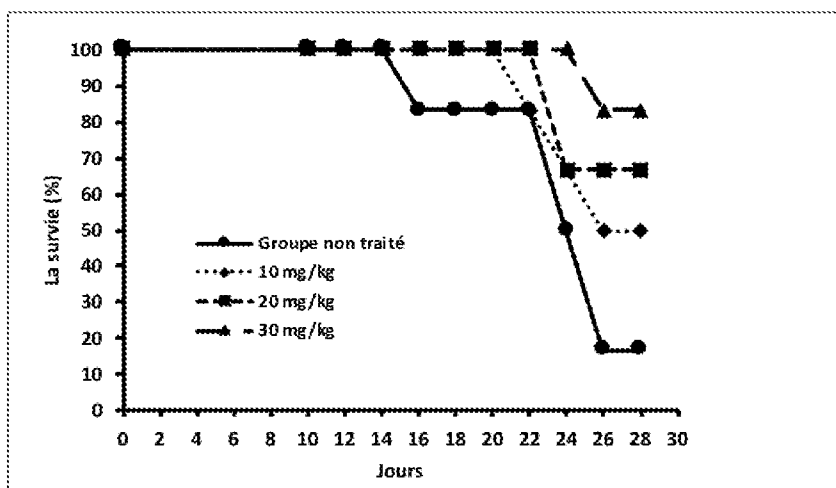


Figure 4. Courbes de survie des souris traitées par le composé **P4**.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MA2019/000013

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**C07F 9/6509**(2006.01)i; **C07D 295/185**(2006.01)i; **A61K 31/495**(2006.01)i; **A61K 31/6615**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i

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)

A61P; A61K; C07D; C07F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS 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	MIGNANI SERGE ET AL. "A novel class of ethacrynic acid derivatives as promising drug-like potent generation of anticancer agents with established mechanism of action" <i>EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL</i> , Vol. 122, 11 June 2016 (2016-06-11), pages 656-673 DOI: 10.1016/J.EJMECH.2016.05.063 ISSN: 0223-5234, XP029705911 the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 March 2020

Date of mailing of the international search report

16 March 2020

Name and mailing address of the ISA/EP

European Patent Office
p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk
Netherlands

Telephone No. (+31-70)340-2040

Facsimile No. (+31-70)340-3016

Authorized officer

Diederer, Jeroen

Telephone No.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/MA2019/000013

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. C07F9/6509 C07D295/185 A61K31/495 A61K31/6615 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)

A61P A61K C07D C07F

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, 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	MIGNANI SERGE ET AL: "A novel class of ethacrynic acid derivatives as promising drug-like potent generation of anticancer agents with established mechanism of action", EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 122, 11 juin 2016 (2016-06-11), pages 656-673, XP029705911, ISSN: 0223-5234, DOI: 10.1016/J.EJMECH.2016.05.063 le document en entier -----	1-10

☐

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

2 mars 2020

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/03/2020

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

Diederer, Jeroen