

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 919 184**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **07 05483**

⑤① Int Cl⁸ : **A 61 K 31/415 (2006.01), A 61 P 29/00, 13/08**

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 26.07.07.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 30.01.09 Bulletin 09/05.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *SANOFI AVENTIS Société anonyme*
— FR.

⑦② Inventeur(s) : *CROCI TIZIANO, FINET MICHEL et*
GUAGNINI FABIO.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) :

⑤④ L'ACIDE 5-(4-CHLOROPHENYL)-1-(2,4-DICHLOROPHENYL)-4-METHYLPYRAZOLE-3-CARBOXYLIQUE, SES ESTERS, SES SELS PHARMACEUTIQUEMENT ACCEPTABLES ET LEURS SOLVATES POUR LEUR UTILISATION COMME MEDICAMENT.

⑤⑦ L'invention a pour objet l'utilisation de l'acide 5-(4-chlorophényl)-1-(2,4-dichlorophényl)-4-méthylpyrazole-3-carboxylique, ses esters, ses sels pharmaceutiquement acceptables et leurs solvates en tant que médicament.

Application: Traitement de la douleur, de l'inflammation et de l'hypertrophie bénigne de la prostate.

FR 2 919 184 - A1



L'acide 5-(4-chlorophényl)-1-(2,4-dichlorophényl)-4-méthylpyrazole-3-carboxylique, ses esters, ses sels pharmaceutiquement acceptables et leurs solvates pour leur utilisation comme médicament.

5 La présente invention a pour objet l'acide 5-(4-chlorophényl)-1-(2,4-dichlorophényl)-4-méthylpyrazole-3-carboxylique, ses sels pharmaceutiquement acceptables et leurs solvates ainsi que ses esters, notamment avec un alkyle en C₁-C₆ ou un benzyle, pour leur utilisation comme médicament.

L'invention a également pour objet les compositions pharmaceutiques
10 contenant l'acide 5-(4-chlorophényl)-1-(2,4-dichlorophényl)-4-méthylpyrazole-3-carboxylique, l'un de ses esters, l'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables ou un de leurs solvates comme principe actif en combinaison avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Enfin, l'invention a aussi pour objet l'utilisation de l'acide 5-(4-chlorophényl)-
15 1-(2,4-dichlorophényl)-4-méthylpyrazole-3-carboxylique, de ses esters, de ses sels pharmaceutiquement acceptables et de leurs solvates pour la préparation de médicaments utiles pour le traitement de la douleur, de l'inflammation et de l'hypertrophie bénigne de la prostate.

L'acide 5-(4-chlorophényl)-1-(2,4-dichlorophényl)-4-méthylpyrazole-3-
20 carboxylique, ci-après dénommé « composé A » est décrit dans le brevet EP 656 354. On a maintenant trouvé que ce composé présente une activité pharmacologique dans différents domaines thérapeutiques et qu'il peut être utilisé comme médicament pour le traitement de différentes affections, notamment pour le traitement de la douleur, de l'inflammation et de l'hypertrophie bénigne de la
25 prostate.

Plus particulièrement, selon la présente invention, le composé A, ses esters, ses sels pharmaceutiquement acceptables et/ou leurs solvates sont utiles dans le traitement des douleurs chroniques, des douleurs neuropathiques, des neuropathies notamment de la neuropathie diabétique, de l'inflammation, notamment de
30 l'inflammation asthmatique bronchopulmonaire ou inflammation allergique bronchopulmonaire, du syndrome du colon irritable, de la maladie de Crohn, de l'inflammation des intestins.

Les effets du composé A ont été étudiés chez des animaux dans les modèles expérimentaux ci-après.

A – chez les souris sur un modèle d'asthme allergique induit par ovalbumine selon le protocole de *Kips et al., (Eur Respir J. 2003, 22, 374-382)*. La sensibilisation
5 par injection intrapéritonéale d'un allergène, l'ovalbumine, en présence d'alun comme adjuvant recrute et active des sous-populations de lymphocytes T, les CD4+ et certains Th2, qui activent les lymphocytes B à produire des immunoglobulines IgE spécifiques de l'ovalbumine. Ces cellules jouent également un rôle de mémoire. Lors de la seconde exposition ou stimulation, l'ovalbumine active les mastocytes par
10 liaison aux IgE spécifiques et réactivent les lymphocytes T en particulier les CD4+ et les Th2. Il se produit une infiltration des cellules lymphocytes T et des éosinophiles dans les tissus bronchopulmonaires suivie d'une libération de médiateurs qui entraînent des lésions tissulaires. Cette infiltration des cellules inflammatoires est la conséquence de l'activation des cellules mononucléaires (mastocytes et
15 macrophages qui constituent la première barrière de défense au niveau de l'épithélium bronchique et lymphocytes T) stimulées par activation antigénique lors de la stimulation par l'ovalbumine. Ce type de modèle allergique chez la souris a permis de comprendre les rôles clés joués par les lymphocytes T CD4+ et par les Th2 et les cytokines libérées par ces cellules (*Kumar & Foster, Am J Resp Cell Mol Biol, 27, 267-272, 2002*).

B – chez des rats neuropathiques chez lesquels une lésion chronique par constriction (dénommée ci-après CCI) a été induite selon le protocole décrit par *Bennet et al. Pain, 33 (1988) 87-107*.

C - sur les ganglions dorsaux rachidiens avec racines de rats neuropathiques
25 chez lesquels une lésion chronique par constriction (dénommée ci-après CCI) a été induite selon le protocole indiqué ci-dessus, en utilisant le protocole de *C. Sommer et al. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology et R. Lindsay et al. Development Biology, Vol. 112, 30-48 (1985)*.

D - chez des rats chez lesquels une hypertrophie bénigne de la prostate a
30 été induite par la testostérone (*Van Copenolle F. et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 280:E120-E129, 2001; Fujimoto N. et al., Cancer Sci: 95: 711-715, 2004*).

Selon un autre de ses aspects, la présente invention concerne des compositions pharmaceutiques renfermant, en tant que principe actif, le composé A

un de ses esters ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables ou un de leurs solvates en combinaison avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Le composé A, ses esters, ses sels pharmaceutiquement acceptables ou leurs solvates peuvent être utilisés à des doses journalières de 0,01 à 100 mg par kilo de poids corporel du mammifère à traiter, de préférence à des doses journalières de 0,1 à 50 mg/kg. Chez l'être humain, la dose peut varier de préférence de 0,5 à 4000 mg par jour, plus particulièrement de 2,5 à 1000 mg selon l'âge du sujet à traiter ou le type de traitement : prophylactique ou curatif.

Dans les compositions pharmaceutiques de la présente invention pour l'administration orale, sublinguale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, transdermique, locale ou rectale, le principe actif peut être administré sous forme unitaire d'administration, en mélange avec des supports pharmaceutiques classiques, aux animaux et aux êtres humains. Les formes unitaires d'administration appropriées comprennent les formes par voie orale, telles que les comprimés, les gélules, les poudres, les granules et les solutions ou suspensions orales, les formes d'administration sublinguale et buccale, les aérosols, les implants, les formes d'administration sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intranasale ou intraoculaire et les formes d'administration rectale.

Dans les compositions pharmaceutiques de la présente invention, le principe actif est généralement en unités de dosage contenant de 0,5 à 1000 mg, avantageusement de 1 à 500 mg, de préférence de 2 à 200 mg dudit principe actif par unité de dosage pour les administrations quotidiennes.

Lorsque l'on prépare une composition solide sous forme de comprimé, on peut ajouter au principe actif, micronisé ou non, un agent mouillant tel que le laurylsulfate de sodium et on mélange le tout avec un véhicule pharmaceutique, tel que la silice, l'amidon, le lactose, le stéarate de magnésium, le talc ou analogues. On peut enrober les comprimés de saccharose, de divers polymères ou d'autres matières appropriées ou encore les traiter de telle sorte qu'ils aient une activité prolongée ou retardée et qu'ils libèrent d'une façon continue une quantité prédéterminée de principe actif.

On obtient une préparation en gélules en mélangeant le principe actif avec un diluant tel qu'un glycol ou un ester de glycérol et en incorporant le mélange obtenu dans des gélules molles ou dures.

Une préparation sous forme de sirop ou d'élixir peut contenir le principe actif conjointement avec un édulcorant, acalorique de préférence, du méthylparaben et du propylparaben comme antiseptique, ainsi qu'un agent donnant du goût et un colorant approprié.

5 Les poudres ou les granules dispersibles dans l'eau peuvent contenir le principe actif en mélange avec des agents de dispersion, des agents mouillants, ou des agents de mise en suspension, comme la polyvinylpyrrolidone, de même qu'avec des édulcorants ou des correcteurs du goût.

Pour une administration rectale, on recourt à des suppositoires qui sont
10 préparés avec des liants fondant à la température rectale, par exemple, du beurre de cacao ou des polyéthylèneglycols.

Pour une administration parentérale, on utilise des suspensions aqueuses, des solutions isotoniques ou des solutions stériles et injectables, qui contiennent des agents de dispersion et/ou des agents solubilisants pharmaceutiquement
15 compatibles, par exemple le propylèneglycol ou le polyéthylèneglycol.

Ainsi, pour préparer une solution aqueuse injectable par voie intraveineuse, on peut utiliser un cosolvant : un alcool tel que l'éthanol, un glycol tel que le polyéthylèneglycol ou le propylèneglycol et un tensioactif hydrophile tel que le Tween® 80. Pour préparer une solution huileuse injectable par voie intramusculaire,
20 on peut solubiliser le principe actif par un triglycéride ou un ester de glycérol.

Pour l'administration transdermique, on peut utiliser des patches sous forme multilaminée ou réservoirs dans lequel le principe actif est en solution alcoolique.

Le principe actif peut être formulé également sous forme de microcapsules ou microsphères, éventuellement avec un ou plusieurs supports ou additifs.

25 Parmi les formes à libération prolongée utiles dans le cas de traitement chroniques, on peut utiliser les implants. Ceux-ci peuvent être préparés sous forme de suspension huileuse ou sous forme de suspension de microsphères dans un milieu isotonique.

La présente invention va maintenant être décrite plus en détail par les tests
30 expérimentaux ci-après.

TEST 1 : Effet du composé A sur la migration des cellules dans l'espace bronchoalvéolaire après stimulation par l'ovalbumine.

Des souris Balb/c pesant entre 28 et 30 g (Charles River) ont été sensibilisées au jour 1 et au jour 11 par injection intrapéritonéale d'une solution d'ovalbumine 0,05 % (dans un gel à 3 % d' Al(OH)₃) dans un volume de 0,2 ml/animal.

5 Au jour 19, les souris ont été stimulées par une exposition intratrachéale de 10 µl d'une solution à 1 % d'ovalbumine (dissoute dans de l'eau isotonique stérile). 24 heures après l'injection d'ovalbumine, les animaux ont été anesthésiés au pentobarbital et on a réalisé un lavage bronchoalvéolaire. Les fluides de lavage ont été récupérés, centrifugés puis les cellules remises en suspension. On a compté le
10 nombre de cellules en différenciant, d'après les critères morphologiques standard, les cellules éosinophiles, neutrophiles et mononucléaires.

La stimulation intratrachéale par l'ovalbumine a induit une augmentation importante du nombre des cellules mononucléaires et éosinophiles dans l'espace bronchoalvéolaire des souris : par rapport au groupe contrôle, respectivement de
15 26800 à 47700 et de 480 à 11500 cellules. On a étudié l'effet du traitement par le composé A sur le recrutement, induit par l'ovalbumine, de ces cellules.

Le composé A ou son véhicule (eau/Tween 80) a été administré aux animaux 1 heure avant la stimulation par l'ovalbumine à des doses variant de 0,1 à 10 mg/kg/i.p. dans un volume de 0,1 ml/10 g de poids. Les résultats obtenus sont
20 rassemblés dans le tableau 1 ci-après

Tableau 1 : pourcentage d'inhibition

Dose mg/kg	Nombre total de cellules Moyenne et déviation standard	Nombre d'éosinophiles Moyenne et déviation standard	Nombre de cellules mononuclées Moyenne et déviation standard	n
0,1 mg/kg	2 ± 18	11 ± 17	0,15 ± 23	6
0,3 mg/kg	35 ± 9	19 ± 26	45 ± 7	4
1 mg/kg	53 ± 9	31 ± 16	64 ± 10	4
3 mg/kg	64 ± 16	43 ± 17	77 ± 18	9
10 mg/kg	99 ± 18	62 ± 14	116 ± 21	10

L'inhibition de la migration cellulaire a été plus importante sur les cellules mononuclées que sur les éosinophiles ; ainsi à 10 mg/kg, l'inhibition de la migration des mononucléaires était totale alors que celle des éosinophiles n'a atteint que 62 %.

5 La dose efficace 50 (DE₅₀) qui inhibe la migration des cellules inflammatoires (nombre total) était 0,9 mg/kg.

En administration intrapéritonéale une heure avant la stimulation par un agent allergène, le composé A inhibe donc de façon dose dépendante la migration des cellules inflammatoires mesurée 24 heures plus tard, les cellules mononuclées étant
10 inhibées de manière plus importante que les éosinophiles. Les cellules mononuclées n'ont pas été caractérisées. De manière classique les cellules mononuclées dans le liquide bronchoalvéolaire des souris contrôles sont à prédominance macrophagique tandis que les cellules qui migrent après stimulation sont vraisemblablement à prédominance lymphocytaire, mais n'ont pas été différenciées par cytofluorométrie
15 de flux.

TEST 2 : Effet du composé A sur la réponse nociceptive chez les rats neuropathiques.

20 Le nerf sciatique de chaque rat a été isolé et, à proximité de la trifurcation des nerfs sciatiques, quatre ligatures lâches ont été faites autour du nerf. Les rats ainsi traités sont dénommés ci-après « rats avec CCI ».

Des rats chez lesquels le nerf sciatique a été isolé, mais sans ligature, ont été utilisés comme animaux témoins (rats témoins).

25 Le composé A a été administré par voie orale quotidiennement et pendant 8 jours à la dose de 30 mg/kg à partir du 7^{ème} jour après l'intervention chirurgicale (ligature) selon le mode opératoire ci-après :

- le composé A a été dissous dans le véhicule constitué d'eau distillée (pH 7,5) contenant 5% de DMSO (diméthylsulfoxyde) et 5% de Tween 80 et administré
30 par gavage à raison de 2 ml/kg de poids corporel.

L'hyperalgésie thermique et la réponse de l'allodynie mécanique ont été enregistrées avant l'intervention chirurgicale, puis le 7^{ème} jour et le 14^{ème} jour (24 heures après la 7^{ème} administration) après l'intervention chirurgicale et enfin le 14^{ème} jour (2 heures après la dernière administration du composé A).

L'hyperalgésie thermique a été évaluée par enregistrement des latences de retrait des pattes à une stimulation thermique par rayonnement selon le protocole ou test plantaire décrit par *Hargreaves et al. Pain, 32 (1988) 77-88* en utilisant l'appareil de mesure de l'analgésie commercialisé par la Société italienne Ugo Basile, Varese, Italie.

L'allodynie mécanique a été déterminée selon la méthode décrite par *Villetti et al. (The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 306 :804-814,2003)* en utilisant l'instrument de mesure de la réponse à une stimulation mécanique (Plantar Aesthesio meter) commercialisé par la Société italienne Ugo Basile.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux 2 et 3 ci-après.

Tableau 2 : Effet du composé A sur l'hyperalgésie thermique chez les rats avec CCI et les rats témoins.

15

Jour après l'intervention chirurgicale	Latence(s)			
	0	7	14 24h après la 7 ^{ème} administration de A	14 2h après la 8 ^{ème} administration de A
Rats témoins + Véhicule	10,6 ± 0,8	11,6 ± 0,3	10,4 ± 0,7	10,7 ± 0,4
Rats témoins + Composé A	9,4 ± 0,5	10,6 ± 0,6	10,5 ± 0,2	10,3 ± 0,2
Rats avec CCI + Véhicule	9,6 ± 0,3	5,4 ± 0,1 ^{oo}	5,4 ± 0,2 ^{oo}	5,5 ± 0,3 ^{oo}
Rats avec CCI + composés A	10,1 ± 0,3	4,9 ± 0,3 ^{oo}	6,9 ± 0,5 ^{*oo}	7,9 ± 0,4 ^{**oo}
% de récupération par rapport aux témoins			27,7 ± 8,0	48,5 ± 7,2

Les résultats sont des moyennes ± ET pour 5 à 8 rats.

*p<0,05, **p<0,001 par rapport aux rats CCI + Véhicule, ^{oo}p<0,001 par rapport aux témoins (Anovarep 2 passages plus test Newman-Keuls).

Tableau 3 : Effet du composé A sur l'allodynie mécanique chez les rats avec CCI et les rats témoins.

Jour après l'intervention chirurgicale	Seuil mécanique (g)			
	0	7	14 24h après la 7 ^{ème} administration de A	14 2h après la 8 ^{ème} administration de A
Rats témoins + Véhicule	37,6 ± 2,5	33,7 ± 1,6	37,4 ± 0,9	38,2 ± 1,5
Rats témoins + Composé A	37,3 ± 2,7	36,7 ± 1,2	37,3 ± 2,7	36,7 ± 2,1
Rats avec CCI + Véhicule	37,5 ± 2,2	10,6 ± 0,5 ^{oo}	11,5 ± 0,3 ^{oo}	12,1 ± 0,4 ^{oo}
Rats avec CCI + Composé A	38,1 ± 2,6	11 ± 0,7 ^{oo}	16,9 ± 0,8 ^{*oo}	15,4 ± 1,0 ^{**oo}
% de récupération par rapport aux témoins			20,2 ± 2,9	14,1 ± 3,7

Les résultats sont des moyennes ± ET pour 5 à 8 rats.

- 5 *p<0,05, **p<0,001 par rapport aux rats CCI + Véhicule, ^{oo}p<0,001 par rapport aux témoins (Anovarep 2 passages plus test Newman-Keuls).

TEST 3 : Effet du composé sur l'inflammation

- 10 Les ganglions dorsaux rachidiens postérieurs L4, L5 et L6 avec les racines attachées (DRG) ont été prélevés par micro-dissection sur des rats naïfs (témoins sans CCI) et des rats rendus neuropathiques (rats avec CCI) selon le protocole décrit dans l'exemple 2 ci-dessus après anesthésie avec du pentobarbital sodique (100 mg/kg de poids corporel par voie i.p.). Dans les deux cas, les rats étaient des rats adultes Charles River Crl : CD BR pesant 400 à 500 g.

- 15 Les ganglions prélevés ont été incubés dans du milieu de EAGLE modifié par le milieu DULBECCO (milieu DMEM) contenant 0,5 mg/ml de trypsine, 1 mg/ml de collagénase et 0,1 mg/ml d'ADNase pendant 90 minutes à 37°C. Un inhibiteur de trypsine de soja a été ensuite ajouté pour neutraliser la trypsine et la suspension résultante a été centrifugée à 1 000 g pendant une minute. Les neurones contenus dans le gâteau de centrifugation ont été mis en suspension dans le milieu DMEM contenant 10 % de sérum de veau, 10 % de sérum de cheval, 2 mM de glutamine, 20 0,1 mg/ml de pénicilline/streptomycine et 2,5 mg/ml d'ADNase et répartis dans des boîtes de Pétri (diamètre 35 mm) revêtues de Matrigel. Les neurones ont été

ensuite incubés à 37°C en présence de 95 % de CO₂ et 5 % d'O₂ dans un milieu de base sous différentes conditions expérimentales :

- en présence du composé A (0,1 µM et 1 µM) ;
- 5 - en présence du facteur de croissance du tissu nerveux (NGF) (1 ng/ml et 50 ng/ml) ;
- en l'absence de tout agent (rats témoins).

Après 48 h d'incubation dans les conditions ci-dessus, les neurones cultivés ont été fixés dans du paraformaldéhyde 4 % pendant 5 à 10 minutes, lavés avec du tampon phosphate (PBS) et incubés immédiatement après avec un tampon bloquant
10 (0,1 % de Tween 20 + 1,5 % de lait en poudre maigre dans du PBS à pH 4) pendant 30 minutes.

Les cultures ont été ensuite incubées pendant une nuit à 4°C avec une première solution d'anticorps (anticorps monoclonaux de souris anti-neurofilament H et M commercialisés sous la dénomination Chemicon ® par la Société CHEMICON
15 International Inc., Californie, USA) dans le tampon bloquant. Les cultures du jour suivant ont été lavées et incubées avec un second anticorps universel conjugué avec de la peroxydase (selon la technique ABC utilisant un complexe enzymatique avidine-biotine avec le kit commercialisé sous la dénomination Vectastain ® par la société VECTOR Laboratories à Burlingame, Californie, USA) et colorées avec une
20 solution de 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Les neurones ont été observés au microscope ZEISS et des photos ont été prises avec une caméra numérique Canon Power Shot G (4.0 mégapixel).

Les explants DRG ont été mesurés sur chaque photographie d'une manière aléatoire en utilisant le logiciel SCION Image NIH (National Institute of Health
25 Bethesda, Maryland USA).

Un minimum de 15 explants DRG séparés ont été mesurés pour chaque boîte.

Dans chaque cas, la croissance maximale de neurites radiaux a été mesurée et convertie en unités métriques (élongation) par comparaison à une grille de
30 calibration établie dans les mêmes conditions expérimentales.

L'élongation des neurites DRF induite par NGF (exprimée en µm) dans les différentes conditions expérimentales est représentée sur la figure 1 :

- rats témoins (sans CCI) ;
 - rats témoins (sans CCI)+ NGF à 20 ng/ml ;
 - rats avec CCI ;
 - rats avec CCI + NGF à 20 ng/ml ;
- 5 - au jour 0 (t = 0 jour de la création de la lésion chronique par constriction) ;
- au jour 3 et au jour 7 (t = 3 et t = 7, respectivement le 3^{ème} et le 7^{ème} jour après la création de la lésion chronique par constriction).

En condition nuisible, le NGF exogène provoque une augmentation de l'élongation des neurites DRG qui est maximale le 3^{ème} jour après la lésion. Le 7^{ème} jour, le NGF exogène est incapable de provoquer une augmentation supplémentaire de l'élongation des neurites DRG, ceci étant probablement dû à l'activation des cellules Schwann (processus de régénération).

10

On a ensuite mesuré le % d'élongation des neurites après administration du composé A à la concentration 10^{-6} M ou 10^{-7} M. Les pourcentages d'effet sont calculés par rapport à l'effet dû au NGF. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 4 ci-après.

15

Tableau 4 : Elongation des neurites

NEURITES ELONGATION	COMPOSE A 10^{-7} M	COMPOSE A 10^{-6} M
% effet par rapport à l'effet maximal dû au NGF (pas de neuropathie)	45 ± 17 %	52 ± 10 % **
% effet par rapport à l'effet maximal dû au NGF (neuropathie - rats avec CCI)	34 ± 5 %	45 ± 5 % *

* $p < 0,05$,

20 ** $p < 0,01$ ANOVA test Duncan / témoins n = 3-5

TEST 4 : Effet du composé A sur l'hypertrophie bénigne de la prostate

Une hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) a été provoquée chez 10 rats mâles CD par administration de testostérone à raison de 18,75 mg par jour par voie sous-cutanée pendant 24 jours.

25

Le composé A a été ensuite administré par voie orale en combinaison avec NaOH 10% +Tween 80 5% +HCl 1N 9,8%+H₂O comme véhicule (5 ou 10 mg de composé A par ml de véhicule) à raison de 10 ou 30 mg/kg de poids corporel et par jour pendant 24 jours. On a ensuite mesuré le volume et le poids de la prostate totale et de la prostate ventrale.

Les résultats obtenus sont reportés sur les figures 2a et 2b (poids) et les figures 3a et 3b (volume) ainsi que ceux obtenus avec des rats mâles témoins chez lesquels une hypertrophie bénigne de la prostate a été provoquée selon le mode opératoire ci-dessus mais auxquels on a administré uniquement le véhicule.

10

TEST 5 : mesure isométrique

On a réalisé le test ex vivo ci-après sur le lobe ventral de la prostate de rats chez lesquels une hypertrophie bénigne a été induite selon le mode opératoire décrit au test 4.

15 La prostate a été rapidement excisée chez des rats mâles Crl:CD[®] Charles River) d'un poids de 300-350g et mise dans le tampon bicarbonate de Krebs (NaCl 118,4 mM; KCl 4,7 mM, CaCl₂ 2,5 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucose 11,7 mM).

20 La prostate a été débarrassée des tissus environnants et la partie ventrale a été isolée et coupée en deux lobes. Chaque lobe a été monté longitudinalement dans une chambre d'organe isolé de 20 ml pour enregistrement de la tension isométrique, mis dans le tampon bicarbonate de Krebs à 37°C, oxygéné avec 95% d'O₂ - 5% de CO₂ et étiré jusqu'à une tension passive de 250 mg. Après une période d'équilibration durant laquelle le lobe a été lavé avec le tampon Krebs tel que défini

25 ci-dessus 4 fois pendant 10 minutes, la courbe de réponse à la noradrénaline (1 nM - 0,1 mM) a été obtenue en présence de 0,5 µM de DMI (desméthylimipramine, Ciba) et 30 µM d'hémisuccinate d'hydrocortisone (Flebocortid ®, Lepetit). Les changements de forces isométriques ont été enregistrés en utilisant le système

30 La génération de la force isométrique a été mesurée comme étant le pourcentage de contraction induite par KCl 40 mM (100% de contraction maximale tissulaire) ajouté à la fin de l'expérimentation après la concentration la plus élevée de noradrénaline.

Les résultats sont exprimés en EC50 (concentration produisant 50% de l'effet maximal).

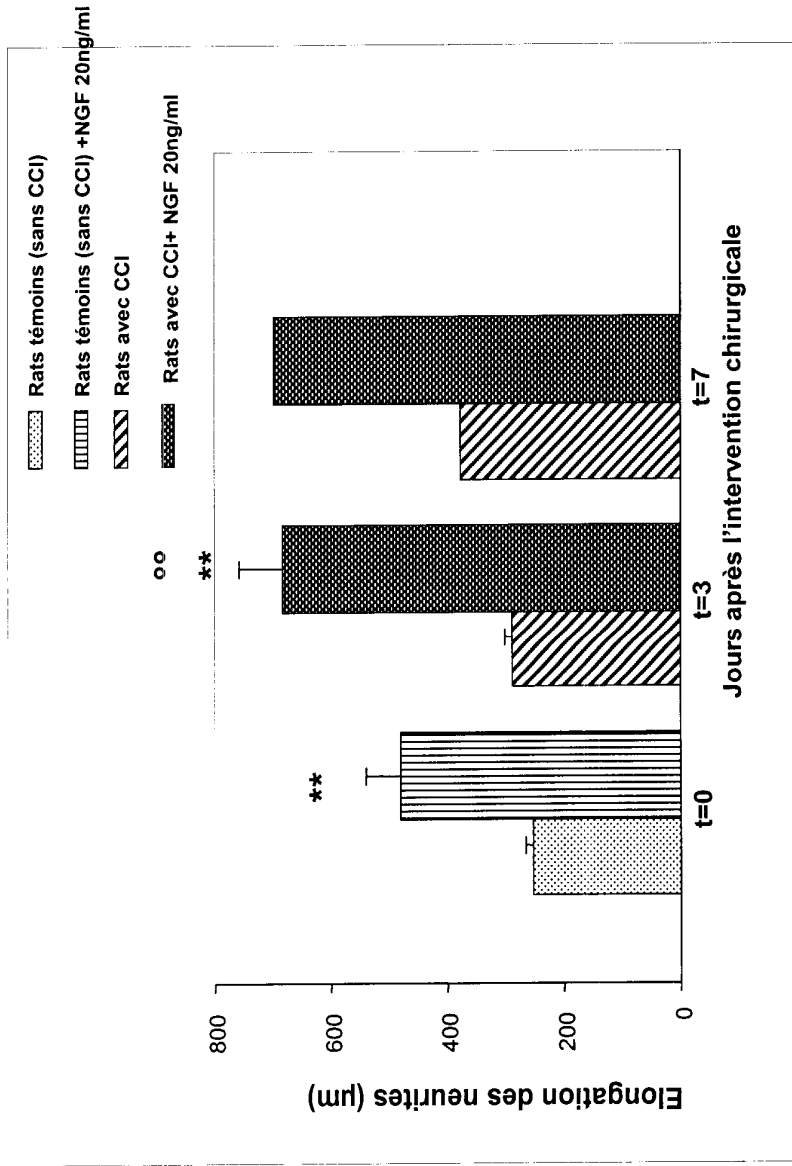
Les courbes de réponse à la noradrénaline sont représentées sur la figure 4.

- 5 Chez les rats ayant une hypertension bénigne provoquée par la testostérone (rats témoins + HBP), la courbe de réponse à la noradrénaline montre un décalage vers la droite par rapport aux rats témoins. Ce décalage est significatif d'une diminution de la capacité de contraction tissulaire.

- 10 Le composé A administré à raison de 10 ou 30 mg/kg de poids corporel a montré une capacité de contraction normale à la noradrénaline. Le composé A restaure donc la contractibilité de l'échantillon de prostate testé.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation de l'acide 5-(4-chlorophényl)-1-(2,4-dichlorophényl)-4-méthylpyrazole-3-carboxylique, ses esters, ses sels pharmaceutiquement acceptables et leurs solvates en tant que médicament.
5
2. Composition pharmaceutique contenant de l'acide 5-(4-chlorophényl)-1-(2,4-dichlorophényl)-4-méthylpyrazole-3-carboxylique, ses esters, ses sels pharmaceutiquement acceptables et leurs solvates en tant que principe actif en combinaison avec un véhicule pharmaceutique acceptable.
10
3. Composition pharmaceutique selon la revendication 2 contenant 0,5 à 1000 mg de principe actif.
- 15 4. Utilisation de l'acide 5-(4-chlorophényl)-1-(2,4-dichlorophényl)-4-méthylpyrazole-3-carboxylique, ses esters, ses sels pharmaceutiquement acceptables et leurs solvates pour la préparation de médicaments utiles pour le traitement de la douleur.
- 20 5. Utilisation selon la revendication 4 pour la préparation de médicaments utiles pour le traitement des douleurs chroniques.
6. Utilisation selon la revendication 4 pour la préparation de médicaments utiles pour le traitement des douleurs neuropathiques.
- 25 7. Utilisation de l'acide 5-(4-chlorophényl)-1-(2,4-dichlorophényl)-4-méthylpyrazole-3-carboxylique, ses esters, ses sels pharmaceutiquement acceptables et leurs solvates pour la préparation de médicaments utiles pour le traitement de l'inflammation.
- 30 8. Utilisation de l'acide 5-(4-chlorophényl)-1-(2,4-dichlorophényl)-4-méthylpyrazole-3-carboxylique, ses esters, ses sels pharmaceutiquement acceptables et leurs solvates pour la préparation de médicaments utiles pour le traitement de l'hypertrophie bénigne de la prostate.



Moyenne ±ES,
 **p<0,01, Anova deux passages; test Duncan/
 témoins ± CCI;
 oo p<0,01, Anova deux passages; test Duncan/
 témoins (sans CCI) + NGF

Figure 1

2/4

Figure 2a

POIDS PROSTATE

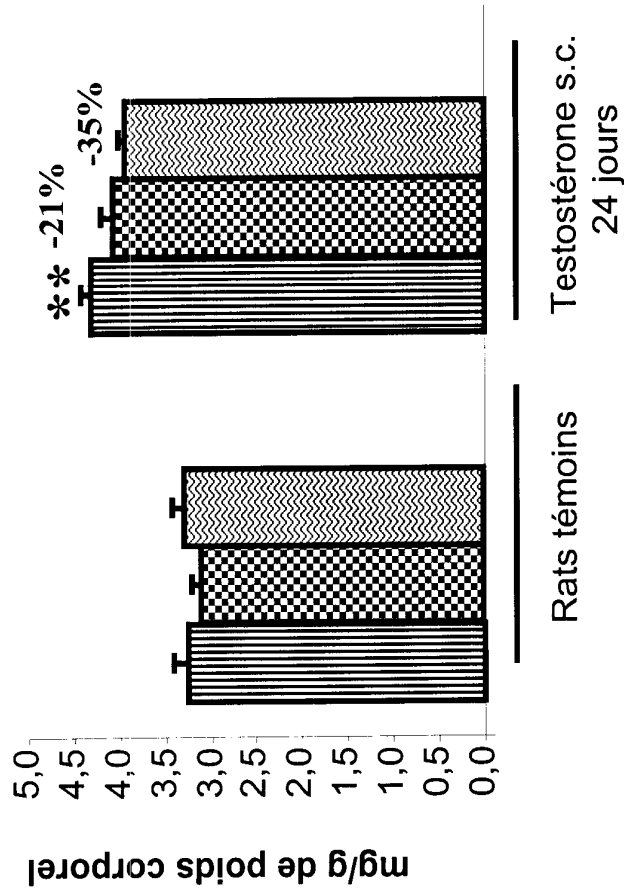
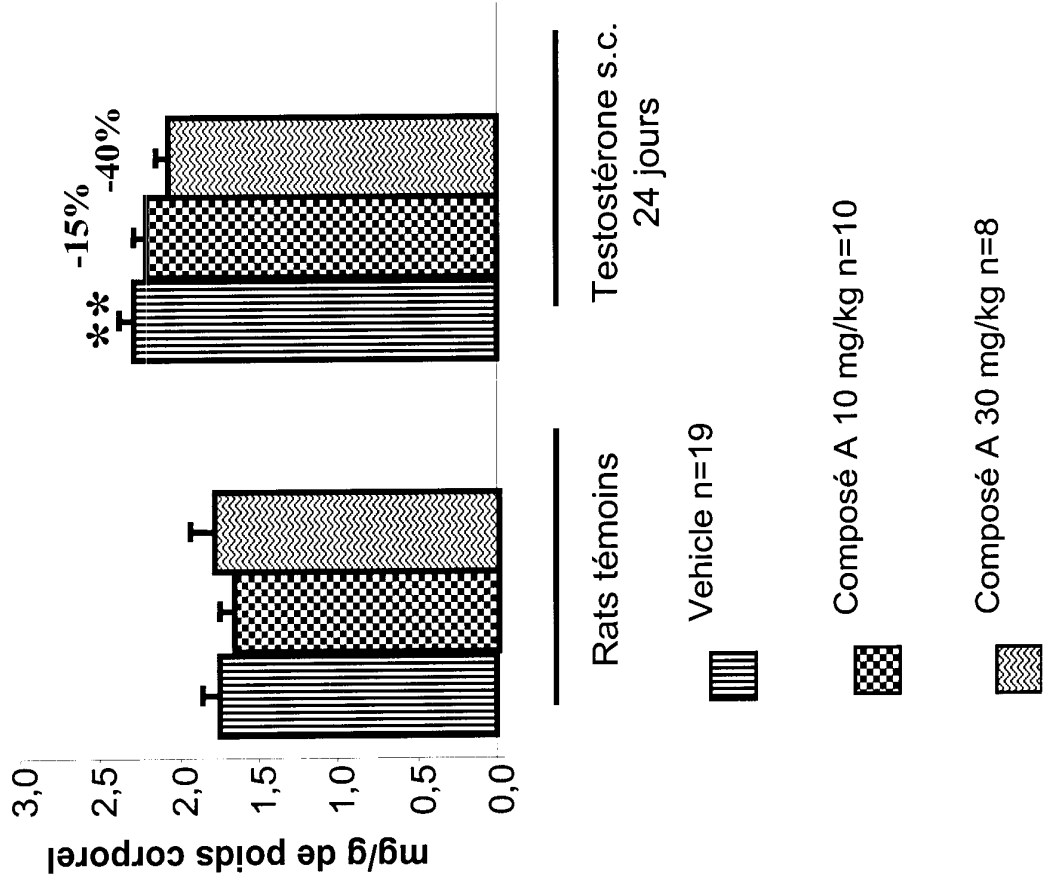


Figure 2b

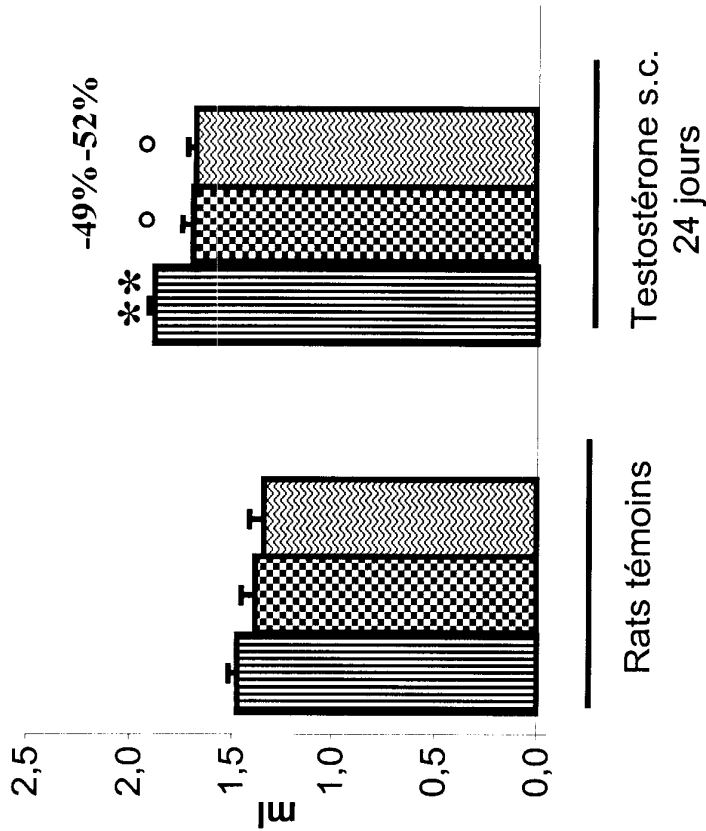
POIDS PROSTATE VENTRALE



**P<0,001 vs vehicle p.o., (Anova plus Newman-Keuls)

Figure 3a

VOLUME PROSTATE

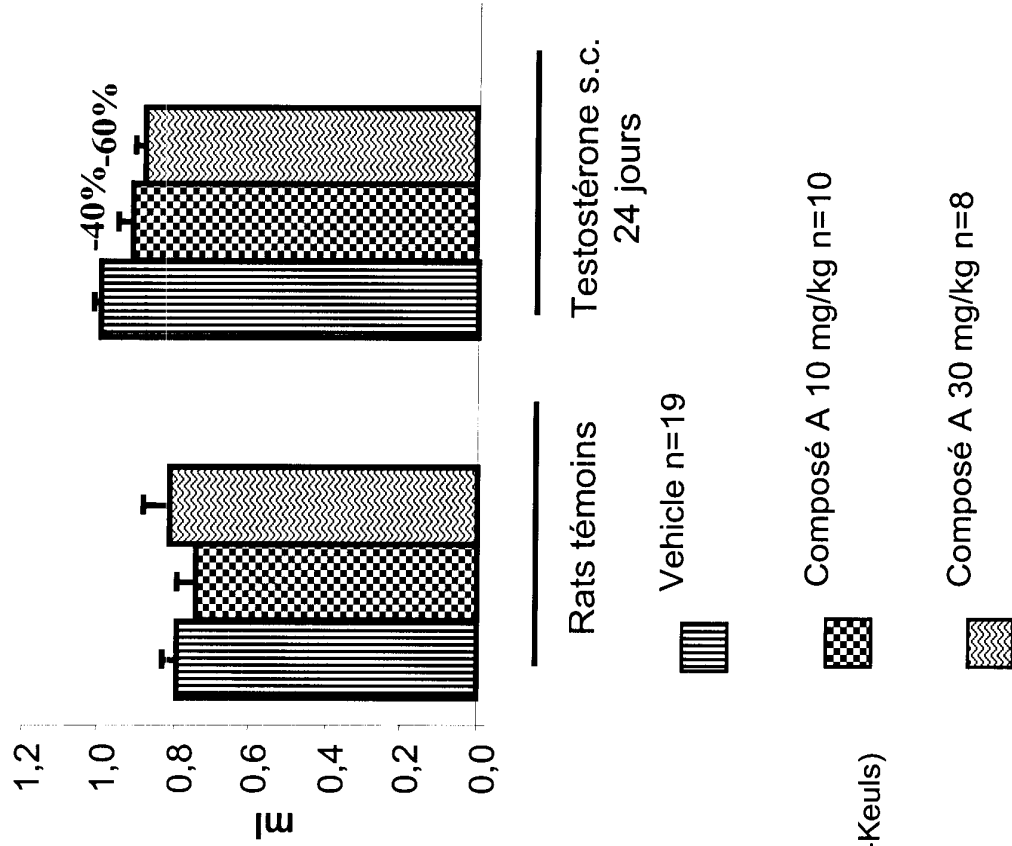


**P<0,001 vs vehicle p.o. , (Anova plus Newman-Keuls)

°P<0,05 vs vehicle p.o./testostérone s.c. (Anova plus Newman-Keuls)

Figure 3b

VOLUME PROSTATE VENTRALE



4/4

- Rats témoins (sans HBP) n=6
- Rats témoins (avec HBP) n=5
- △ Composé A 10mg/kg/jour p.o. n=4
- ▲ Composé A 30mg/kg/jour p.o. n=5

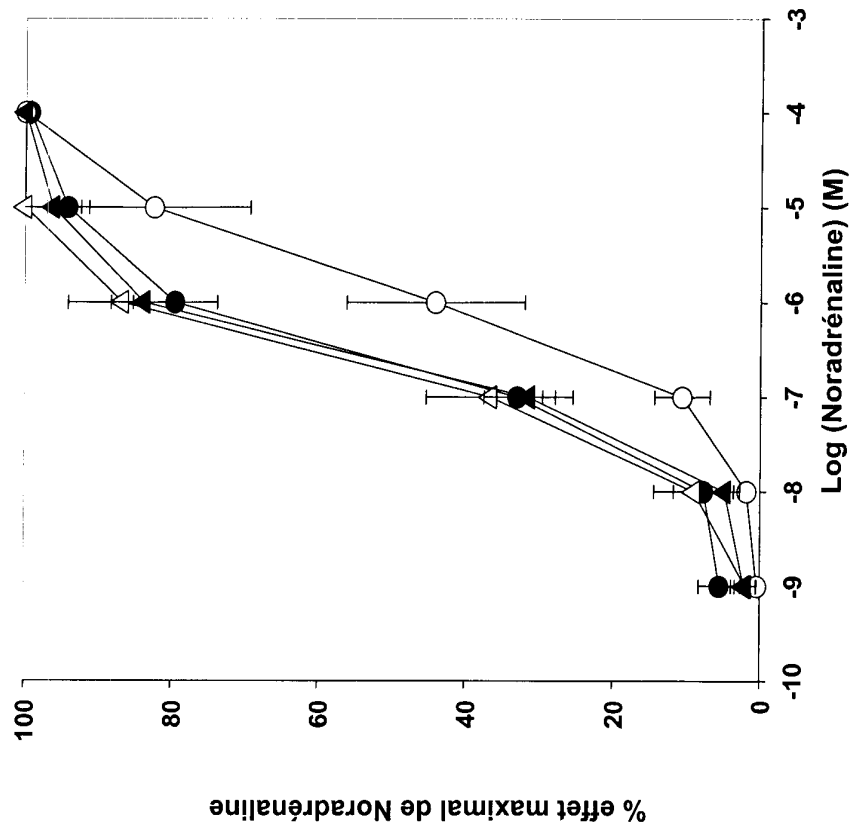


Figure 4

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 698616
FR 0705483

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 2007/009701 A (ESTEVE LABOR DR [ES]; BUSCHMANN HELMUT H [ES]) 25 janvier 2007 (2007-01-25) * page 1, ligne 1 - page 3, ligne 11 * * page 8, ligne 24 - ligne 28 * * page 12, ligne 25 - ligne 26 * * page 21, ligne 31 - page 23, ligne 17; revendications 1-20,34-38; exemple 1 *	1-3	A61K31/415 A61P29/00 A61P13/08
A	WO 03/088968 A (RES TRIANGLE INST [US]) 30 octobre 2003 (2003-10-30) * page 13, dernier alinéa - page 14, alinéa 1; tableaux *	1-8	
A	US 5 624 941 A (BARTH FRANCIS [FR] ET AL) 29 avril 1997 (1997-04-29) * colonne 11, ligne 60 - colonne 12, ligne 65; revendication 16; exemples 209,210 *	1-8	
D,A	EP 0 656 354 A (SANOFI SA [FR]) 7 juin 1995 (1995-06-07) * page 2, ligne 39 - ligne 55 * * page 3, ligne 25 - page 4, ligne 53; revendication 8 *	1-8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61K A61P
A	FR 2 864 958 A (SANOFI SYNTHELABO [FR]) 15 juillet 2005 (2005-07-15) * abrégé * * exemples; tableau 1 * * page 23, ligne 10 - page 24, ligne 20; revendications *	1-8	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
11 mars 2008		Hoff, Philippe	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0705483 FA 698616**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 11-03-2008

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2007009701	A	25-01-2007	AUCUN	

WO 03088968	A	30-10-2003	AU 2003223471 A1	03-11-2003
			CA 2482004 A1	30-10-2003
			EP 1494673 A1	12-01-2005
			US 2003199536 A1	23-10-2003

US 5624941	A	29-04-1997	AUCUN	

EP 0656354	A	07-06-1995	AT 154012 T	15-06-1997
			AU 685518 B2	22-01-1998
			AU 7899994 A	15-06-1995
			CA 2136893 A1	21-06-1995
			CN 1110968 A	01-11-1995
			CZ 9403016 A3	14-06-1995
			DE 69403614 D1	10-07-1997
			DE 122006000034 I1	23-11-2006
			DE 69403614 T2	22-01-1998
			DK 656354 T3	29-12-1997
			ES 2105575 T3	16-10-1997
			FI 945690 A	03-06-1995
			FR 2713225 A1	09-06-1995
			GR 3024470 T3	28-11-1997
			HK 1000599 A1	09-04-1998
			HU 71498 A2	28-11-1995
			IL 111719 A	28-10-1999
			JP 3137222 B2	19-02-2001
			JP 7309841 A	28-11-1995
			JP 3995405 B2	24-10-2007
			JP 2001026541 A	30-01-2001
			LU 91268 A9	26-09-2006
			NL 300237 I1	02-10-2006
			NO 944625 A	06-06-1995
			NO 2006010 I1	28-08-2006
			NZ 270025 A	26-09-1995
			PL 306067 A1	12-06-1995
			RU 2141479 C1	20-11-1999
			SG 68570 A1	20-06-2000

FR 2864958	A	15-07-2005	AR 047096 A1	04-01-2006
			AU 2005209441 A1	11-08-2005
			CA 2551141 A1	11-08-2005
			CN 1910157 A	07-02-2007
			EP 1720837 A1	15-11-2006
			WO 2005073197 A1	11-08-2005
			JP 2007517839 T	05-07-2007

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0705483 FA 698616

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **11-03-2008**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2864958	A	KR 20060105050 A	09-10-2006
		US 2007021486 A1	25-01-2007

**RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 698616
FR 0705483

Bien que la revendication 1 concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.
