

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

N° 82 11684

⑤4 Esters d'hydroxybenzènes substitués de 2-thénylmercaptopropionylglycine utiles notamment comme mucolytiques, procédé pour leur préparation et compositions pharmaceutiques les contenant.

⑤1 Classification internationale (Int. Cl.³). C 07 D 333/38; A 61 K 31/38.

⑫2 Date de dépôt..... 2 juillet 1982.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée : *Italie, 2 juillet 1981, n° 48807 A/81.*

④1 Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 1 du 7-1-1983.

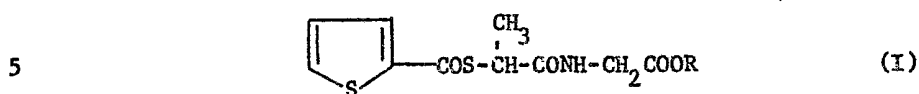
⑦1 Déposant : Société dite : SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE SpA, résidant en Italie.

⑦2 Invention de : Claudio Cavazza.

⑦3 Titulaire : *Idem* ⑦1

⑦4 Mandataire : Cabinet Beau de Lormé, 55, rue d'Amsterdam, 75008 Paris.

La présente invention concerne une nouvelle classe d'esters d'hydroxybenzènes substitués de 2-thénylmercaptopropionylglycine de formule générale (I)



dans laquelle R est un radical p-acétamidophényle, p-propyloxy-carbophényle ou o-alkyloxy-carbophényle dans lequel le radical oxyalkyle est en C₁-C₄, et de préférence est un radical méthoxy ou éthoxy.

10 La présente invention concerne également un procédé pour la préparation de ces esters et des compositions pharmaceutiques les contenant.

Plus particulièrement, la classe de composés de formule générale (I) comprend les esters suivants :

- 15 (1) p-(2-thénylmercaptopropionylglyciloxy)benzoate de propyle;
 (2) p-(2-thénylmercaptopropionylglyciloxy)acétamidobenzène;
 (3) o-(2-thénylmercaptopropionylglyciloxy)benzoate de méthyle;
 (4) o-(2-thénylmercaptopropionylglyciloxy)-benzoate d'éthyle;
 (5) o-(2-thénylmercaptopropionylglyciloxy)benzoate de propyle; et
 20 (6) o-(2-thénylmercaptopropionylglyciloxy)benzoate de butyle.

Les esters de mercaptopropionylglycine d'un hydroxybenzène substitué, en particulier le guaiacol, sont déjà connus (voir à ce sujet la demande de brevet européen n° 79830052.1 déposée par la demanderesse).

25 On sait également que ces composés possèdent une activité pharmacologique comme agents mucolytiques.

Bien que ces composés connus possèdent d'excellentes propriétés mucolytiques tout en n'augmentant pas la sécrétion bronchique, certains de ces esters sont cependant insuffisamment
 30 stables. En conséquence, les compositions pharmaceutiques contenant ces esters peuvent libérer une odeur désagréable, même après une durée de stockage relativement courte, ce qui nuit à la fois à l'utilisateur et à l'efficacité thérapeutique des compositions.

Cet inconvénient est encore aggravé lorsque les
 35 compositions sont conservées et utilisées dans les pays tropicaux.

Un autre inconvénient de certains des esters connus du guaïacol est que ce sont des substances huileuses ou poisseuses, ce qui rend difficile leur traitement et leur combinaison.

La demanderesse a découvert selon l'invention que
5 les nouveaux esters de formule générale (I), outre qu'ils présentent une excellente activité mucolytique sans augmentation de la sécrétion bronchique, sont remarquablement plus stables que les esters de guaïacol connus et, en outre, que ce sont des substances pulvé-
10 rulentées solides qui peuvent être facilement transformées et confec- tionnées.

Le procédé pour la fabrication des esters de formule générale (I) comprend les étapes suivantes :

- (a) réaction de la 2-thénylmercaptopropionylglycine avec un chloro-
formiate d'alkyle de formule générale ClCOOR' , dans laquelle R'
15 est un groupe alkyle en $\text{C}_1\text{-C}_4$, de manière à obtenir l'anhydride mixte correspondant; et
- (b) réaction de l'anhydride mixte de l'étape (a) avec un hydroxy-
benzène substitué choisi parmi le p-hydroxybenzèneacétamide,
le p-hydroxybenzoate de propyle et les o-hydroxybenzoates.
20 d'alkyle en $\text{C}_1\text{-C}_4$.

Plus particulièrement :

En ce qui concerne l'étape (a), on ajoute la
2-thénylmercaptopropionylglycine et une base organique anhydre,
de préférence choisie parmi la triéthylamine et la pyridine, en
25 quantités équimolaires à un solvant organique inerte, tel que chlorure de méthylène, tétrahydrofuranne et dioxanne. On refroidit la solution résultante à une température généralement comprise entre environ 0 et -20°C . On ajoute lentement à cette solution, en
30 agitant, une solution de chloroformiate d'alkyle dissout dans le même solvant organique utilisé pour la 2-thénylmercaptopropionylglycine. La quantité de chloroformiate d'alkyle est de préférence la quantité équimolaire par rapport à la 2-thénylmercaptopropionylglycine.

On maintient le mélange de réaction résultant en
35 agitation pendant environ 10-60 min, en obtenant ainsi l'anhydride mixte qui peut être soit isolé, soit directement utilisé sous forme de solution dans l'étape subséquente (b) du procédé.

En ce qui concerne l'étape (b), on ajoute à la solution d'anhydride mixte maintenue à une température comprise entre environ +5 et -20°C, une solution d'hydroxybenzène substitué et de base organique anhydre (par exemple la triéthylamine) dans un solvant organique anhydre inerte, tel que chlorure de méthylène, tétrahydrofuranne et dioxanne. On maintient le mélange de réaction résultant sous agitation à basse température (d'environ +5 à +15°C), pendant environ 15-60 min, et ensuite à la température ambiante pendant environ 2-24 h.

Lorsque la réaction est effectuée dans un solvant insoluble dans l'eau (par exemple CH_2Cl_2), on lave la solution par l'eau, par HCl dilué, par l'eau jusqu'à neutralité, on sèche et on concentre sous vide. Lorsque l'on utilise d'autres solvants (par exemple tétrahydrofuranne et dioxanne), le produit est isolé après filtration du chlorhydrate de la base organique et concentration du solvant sous vide.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

EXEMPLE 1

Préparation du p-(2-thénylmercaptopropionylglyciloxy)benzoate de propyle.

On ajoute 5,4 g (0,020 mole) de 2-thénylmercaptopropionylglycine et 2,0 g (0,020 mole) de triéthylamine à 50 ml de tétrahydrofuranne.

On amène le mélange résultant à 0°C, puis on ajoute lentement une solution de 2,2 g (0,020 mole) de chloroformiate d'éthyle dans 10 ml de tétrahydrofuranne. On ajoute ensuite lentement la solution suivante :

triéthylamine	2,0 g (0,020 mole)
tétrahydrofuranne	20 ml
p-hydroxybenzoate de propyle	3,6 g (0,020 mole)

On maintient le mélange de réaction sous agitation à 5°C pendant 1 h, et ensuite à la température ambiante pendant 4 h. On filtre le mélange de réaction. On amène le filtrat à siccité et on l'extrait plusieurs fois par l'hexane chaud; il précipite par refroidissement une huile jaunâtre. On recristallise l'huile dans l'hexane.

- F. 94-95°C
- Chromatographie sur gel de silice, toluène:éther (60:40)
couche mince
- Chromatographie liquide
5 haute pression :
- | | | |
|---------|----------------------|----|
| colonne | "Lichrosorb RP 18" | |
| éluant | H ₂ O | 65 |
| | CH ₃ CN | 35 |
| | CH ₃ COOH | 1 |
- 10 détecteur d'UV = 254 mμ
- Spectre de RMN (DMSO) δ = 1,03 (t, 3H, CH₂-CH₃); 1,60 (d, 3H, CH-CH₃);
1,73 (m, 2H, CH₂-CH₃); 4,23 (d, 2H, NH-CH₂);
4,30 (t, 2H, CH₂-CH₂-CH₃); 4,50 (q, 1H, CH-CH₃);
7,10-8,03 (m, 3H, protons du thiophène);
15 7,26-8,13 (d, 4H, protons aromatiques).

EXEMPLE 2

Préparation du p-(2-thénylmercaptopropionylglyciloxy)acétamido-
benzène.

- On ajoute 5,4 g (0,020 mole) de 2-thénylmercapto-
20 propionylglycine à 50 ml de tétrahydrofuranne. On amène le mélange
résultant à 0°C, puis on ajoute lentement une solution de 2,2 g
(0,020 mole) de chloroformiate d'éthyle dans 10 ml de CH₂Cl₂ anhydre.
On ajoute lentement la solution suivante à la solution résultante :
- | | |
|------------------------------|--------------------|
| 25 p-hydroxyacétamidobenzène | 3,0 g (0,020 mole) |
| triéthylamine | 2,0 g (0,020 mole) |
| tétrahydrofuranne | 20 ml |

- On maintient le mélange de réaction sous agitation
à 50°C pendant 1 h, et ensuite à la température ambiante pendant
4 h. On sépare par filtration le produit solide qui se forme, on
30 le lave à l'eau, puis on le recristallise dans le méthanol. On
obtient un produit blanc cristallisé solide ayant un point de fusion
de 203-204°C.

- Chromatographie sur couche gel de silice, toluène:éther 60:40
mince
- 35 Chromatographie liquide
haute pression :
- | | | |
|-----------|----------------------|----|
| colonne : | "Lichrosorb RP 18" | |
| éluant : | H ₂ O | 65 |
| | CH ₃ CN | 35 |
| | CH ₃ COOH | 1 |

détecteur d'UV = 250 m μ

Spectre de RMN (DMSO) δ = 1,58 (d, 3H, CH-CH₃); 2,15 (s, 3H, COCH₃);
 4,26 (d, 2H, CH₂); 4,56 (q, 1H, CH-CH₂);
 7,20-7,80 (d, 4H, protons aromatiques);
 7,26-8,30 (m, 3H, protons du thiophène);
 9,05 (t, 1H, NH-CH₂); 10,26 (s, 1H, NH-CO)

5

On étudie la toxicité aiguë, les activités expectorantes et mucolytiques et l'effet sur la mobilité ciliaire des composés de formule (I).

10 Toxicité aiguë.

Le tableau I ci-après indique la DL₅₀ des composés de formule (I) déterminée par la méthode de Weil ("Tables for convenient calculation of median effective dose (LD50 or ED 50) and instructions in their use", Biometrics, pages 249-253, 1952), par administration e.p. chez la souris.

15

TABLEAU I

DL₅₀ et limite de confiance, mg/kg e.p., des composés de formule (I).
 Méthode de Weil N=4, K=4.

Composé	DL ₅₀	Limites de confiance
20 (1)	1580	(1260-1900)
(2)	1930	(1620-2240)
(3)	1780	(1440-2120)
(4)	2150	(1900-2400)
(5)	2080	(1800-2350)
25 (6)	1800	(1500-2100)

Activité expectorante.

On effectue les essais sur des lapins mâles pesant 2-3 kg anesthésiés par l'éthyluréthane, en suivant la méthode décrite par Perry et coll. (J. Pharm. Exp. Ther. 73, page 65, 1941).

30

On insère une canule dans la trachée des animaux anesthésiés, attachés la tête en bas sur une table d'opérations à une inclinaison de 60°. Chaque canule est reliée à un dispositif d'alimentation qui fournit de l'air préchauffé (36-38°C) à un

débit faible constant et à humidité constante (80%). A l'extrémité inférieure de chaque canule est fixée une éprouvette graduée, dans laquelle on recueille la sécrétion bronchique. Tous les animaux respirent spontanément et, par conséquent, règlent eux-mêmes l'asorption d'air appropriée pour la respiration normale. Au bout de 4 h après l'insertion de la canule, on administre oralement aux animaux (par une sonde stomacale) les composés de formule (I) dissous dans l'eau distillée à des doses comprises entre 20 et 40 mg. Chaque dose est administrée à 5 animaux. Les animaux témoins (8) reçoivent seulement de l'eau. On détermine la sécrétion 1 h, 2 h et 4 h après l'administration. Les résultats, rassemblés dans le tableau II ci-après, montrent que les composés de formule générale (I) n'exercent pas d'activité expectorante.

Activité mucolytique.

Les essais sont effectués in vitro en utilisant la méthode décrite par Morandini et coll. (Lotta contro la tubercolosi n. 4, 1977). On utilise un thromboélastographe pour suivre les variations des propriétés rhéologiques du crachat humain induites par les composés de formule générale (I) et par l'acétylcystéine. Les résultats rassemblés dans le tableau III ci-après montrent que les composés de formule (I) entraînent une plus forte diminution de la densité du crachat humain que celle induite par l'acétylcystéine.

Effet sur l'activité ciliaire.

On étudie l'aptitude des composés de formule (I) à modifier la mobilité ciliaire en observant au microscope le mouvement ciliaire des anneaux de la trachée du rat que l'on plonge dans des solutions des composés essayés.

Il est possible, selon cette technique, d'étudier en fonction de la concentration du composé et de la durée de contact le blocage du mouvement ciliaire provoqué par les composés étudiés, qui est lié à l'élimination du mucus de l'épithélium ciliaire.

Pour les substances à utiliser sous la forme de solutions, ce blocage ne doit pas avoir lieu en des durées de contact de moins de 15 min.

Les solutions aqueuses à 2% des composés de formule (I) provoquent le blocage du mouvement ciliaire en 18-20 min.

Activité antitussive.

On étudie l'irritation tussigène chez le cobaye en exposant les animaux d'expérience à un environnement dans lequel une solution d'acide citrique à 10% est atomisée au moyen d'un appareil à aérosol maintenu sous une pression constante par l'air comprimé. Les animaux d'expérience sont placés dans une chambre à paroi de verre qui est reliée à un appareil électrique d'enregistrement approprié pour le comptage de la toux.

La durée de l'exposition à l'aérosol tussigène est de 10 min. Les animaux d'expérience sont soumis à un essai de contrôle 7 jours avant administration orale de 200 mg/kg des composés. Les résultats de quelques expériences effectuées en comparaison avec des animaux témoins, rassemblés dans le tableau IV ci-après, montrent que les composés de formule générale (I) sont doués d'activité antitussive après une seule administration de 200 mg/kg 1 h avant le début de l'essai.

TABLEAU II

Effet des composés de formule générale (I) sur la sécrétion bronchique.

Composés	Variations $\pm \sigma$, %, de la sécrétion bronchique par rapport aux valeurs basales aux intervalles suivants après administration		
	1 h	2 h	4 h
Témoin (H ₂ O)	+1,2 \pm 0,04	+2,1 \pm 0,04	+3,2 \pm 0,05
(1)	+0,9 \pm 0,05	+2,1 \pm 0,01	+3,8 \pm 0,06
(2)	+0,8 \pm 0,03	+1,2 \pm 0,04	+2,5 \pm 0,07
(3)	+0,3 \pm 0,05	+0,9 \pm 0,05	+1,4 \pm 0,08
(4)	+0,8 \pm 0,03	+1,9 \pm 0,06	+3,0 \pm 0,04
(5)	+0,9 \pm 0,06	+1,7 \pm 0,05	+3,2 \pm 0,06
(6)	+0,5 \pm 0,04	+1,0 \pm 0,06	+1,9 \pm 0,04

n = 6 animaux par groupe

TABLEAU III

Activité mucolytique in vitro des composés de formule générale (I) et de l'acétylcystéine; modifications de la densité du crachat humain

Composés	Chute $\pm \sigma$, %, du tracé par rapport à l'amplitude maximale (*) après addition de 1 ml d'une solution à 10% des composés à la dilution indiquée	
	Dilution 1/30	Dilution 1/60
5		
10	(1) 75	60
	(2) 86	65
	(3) 85	65
	(4) 82	60
	(5) 78	57
15	(6) 75	55
	Acétylcystéine 75	22

(*) Indice d'activité mucolytique.

Comme le montre l'expérience, les composés de l'invention modifient notablement les propriétés rhéologiques du crachat. L'examen des résultats obtenus indique une diminution de la densité du crachat aux doses plus élevées (ou dilutions plus faibles) et aux doses plus faibles (ou dilutions plus élevées) constamment supérieures à celle provoquée par l'acétylcystéine. Par contre, aucun des composés n'augmente la sécrétion bronchique ni n'est capable de bloquer le mouvement ciliaire de l'épithélium de préparations d'anneaux trachéaux en des intervalles de temps inférieurs à ceux admissibles.

TABLEAU IV

Action antitussive chez le cobaye : coups de toux et pourcentage d'inhibition avant et après traitement par les composés de formule (I)

Nombre d'animaux	Composé	Coups de toux		Inhibition, %
		avant traitement	après traitement	
10	-	45	44	3
6	1	61	39	37
35	2	55	30	46
	3	60	31	49

TABLEAU IV (suite)

	Nombre d'animaux	Composé	Coups de toux		Inhibition, %
			avant traitement	après traitement	
	6	4	62	30	52
5	6	5	54	28	49
	6	6	49	25	49

Les composés selon l'invention sont intéressants en thérapeutique pour le traitement des maladies des voies respiratoires. On administre par voie orale ou parentérale aux patients une quantité thérapeutiquement efficace d'un ester de formule générale (I).

La dose de l'ester de guaiacol de formule (I) administrée par voie orale ou parentérale est généralement comprise entre environ 15 et 70 mg/kg de poids corporel (environ 1,0-5,0 g) par jour, bien que le médecin traitant puisse administrer des doses supérieures ou inférieures en tenant compte de l'âge, du poids et de l'état général du patient.

Dans la pratique, les esters de guaiacol sont administrés par voie orale ou parentérale sous l'une quelconques des formes pharmaceutiques habituelles qui sont préparées par des techniques classiques bien connues de l'homme de l'art. Ces formes comprennent les formes de dosage unitaire orales solides et liquides, telles que pastilles, capsules, solutions, sirops et analogues, ainsi que les formes injectables, telles que, par exemple, solutions stériles pour ampoules et fioles. On donne ci-après quelques exemples non limitatifs de compositions appropriées pour l'administration orale ou parentérale.

Compositions pharmaceutiques

Dans toutes les formulations ci-après, l'ingrédient actif est à titre d'exemple le p-(2-thénylmercaptopropionylglyciloxy)acétamidobenzène.

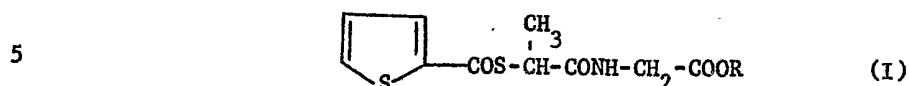
Ampoules pour administration en aérosol ou administration intramusculaire

	Chaque ampoule contient :	
	ingrédient actif	0,40 g
	métabisulfite de sodium	10 mg
	eau distillée apyrogène	3 ml
5	<u>Sirop</u>	
	ingrédient actif	4,0 g
	sorbitol, à 70%	15 g
	saccharose	50 g
	éthanol	1 ml
10	p-hydroxybenzoate	0,2 µg
	agents aromatisants	0,5 ml
	eau distillée	q.s.p. 100 ml
	saccharine	0,20 g
	<u>Suppositoires pour adultes</u>	
15	ingrédient actif	0,40 g
	métabisulfite de sodium	0,020 g
	excipient	q.s pour 1 suppositoire
	<u>Suppositoires pédiatriques</u>	
	ingrédient actif	0,20 g
20	métabisulfite de sodium	0,010 g
	excipient	q.s. pour 1 suppositoire
	<u>Suppositoires pour nourrissons</u>	
	ingrédient actif	0,10 g
	métabisulfite de sodium	0,005 g
25	excipient	q.s. pour 1 suppositoire
	<u>Sachet monodose</u>	
	ingrédient actif	3,80 g
	saccharine	0,20 g
	arôme d'orange	0,5 g
30	lyophilisat d'orange	10 g
	saccharose	q.s.p. 100 g

Il est entendu que l'invention n'est pas limitée aux modes de réalisation préférés décrits ci-dessus à titre d'illustration et que l'homme de l'art peut y apporter diverses modifications et divers changements sans toutefois s'écarter du cadre et de l'esprit de l'invention.

RE V E N D I C A T I O N S

1 - Nouveaux esters de 2-thénylmercaptopropionylglycine, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule générale



dans laquelle R est un radical p-acétamidophényle, p-propyloxy-carbophényle ou o-alkyloxy-carbophényle, dans lequel le radical oxyalkyle est en C₁-C₄.

10 2 - Ester selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste en p-(2-thénylmercaptopropionylglyciloxy)acétamidobenzène.

3 - Ester selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste en p-(2-thénylmercaptopropionylglyciloxy)benzate de propyle.

15 4 - Ester selon la revendication 1, caractérisé en ce que R est un reste o-méthoxycarbophényle ou o-éthoxycarbophényle.

5 - Procédé pour la préparation des esters de 2-thénylmercaptopropionylglycine selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

20 (a) réaction de la 2-thénylmercaptopropionylglycine avec un chloroformiate d'alkyle de formule générale ClCOOR', dans laquelle R' est un groupe alkyle en C₁-C₄, de manière à obtenir l'anhydride mixte correspondant; et

25 (b) réaction de l'anhydride mixte de l'étape (a) avec un hydroxybenzène substitué choisi parmi le p-hydroxybenzèneacétamide, le p-hydroxybenzoate de propyle et les o-hydroxybenzoates d'alkyle en C₁-C₄.

30 6 - Nouveaux médicaments, utiles notamment comme agents mucolytiques et anti-inflammatoires, caractérisés en ce qu'ils contiennent comme ingrédient actif un ester de 2-thénylmercaptopropionylglycine selon la revendication 1.

7 - Médicaments selon la revendication 7, caractérisés en ce que R est un reste o-méthoxycarbophényle ou o-éthoxycarbophényle.

8 - Médicament selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il contient l'ingrédient actif en association avec un excipient acceptable en pharmacie.