

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

N° 82 10951

⑭ 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo[5,1-a]isoquinoléine micronisée, sa formulation à usage vétérinaire et son procédé d'utilisation.

⑮ Classification internationale (Int. Cl. ³). C 07 D 471/04; A 61 K 9/00, 31/47.

⑯ Date de dépôt..... 23 juin 1982.

⑰ ⑱ ⑲ Priorité revendiquée : IT, 7 juillet 1981, n° 22771 A/81.

⑳ Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 2 du 14-1-1983.

㉑ Déposant : GRUPPO LEPETIT SPA. — IT.

㉒ Invention de : Amedeo Omodei-Sale et Giulio Galliani.

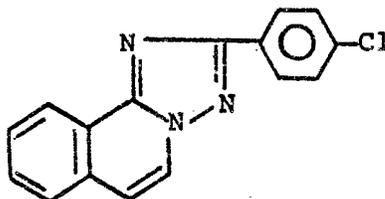
㉓ Titulaire : *Idem* ㉑

㉔ Mandataire : Cabinet Michel Lemoine,
13, bd des Batignolles, 75008 Paris.

Dans de nombreux pays, l'accroissement accéléré et incontrôlé de la population des animaux de compagnie a atteint des proportions inquiétantes. On peut admettre que l'une des causes principales de cette situation réside dans l'absence de méthodes sûres, commodes et bon marché pour contrôler la fécondité des animaux. A l'heure actuelle, on n'emploie, dans le domaine vétérinaire, que des composés hormonaux pour interrompre des grossesses non souhaitées (oestrogènes) ou pour supprimer ou retarder la période d'oestrus (progestines et androgènes). Cependant, leur utilisation n'est par exemple de risques, de contre-indications et de limitations. Par ailleurs, les recherches effectuées jusqu'ici sur les agents contraceptifs non hormonaux (embryotoxiques et prostaglandines) n'ont abouti à aucune application pratique (Jöchle, W., Folia Vet. Lat. 4,706,1974).

Il a été décrit récemment une nouvelle classe de composés non hormonaux qui sont capables d'interrompre la grossesse, à doses non toxiques, sur diverses espèces animales après implantation des blastocystes sur les trompes utérines (voir VS-A-4.075.341, intitulé "Composés de phényl-(2 substitué)-s-triazolo [5,1-a]-isoquinoléine"). Ces composés ont leur maximum d'efficacité pendant la phase initiale du développement embryonnaire, leur effet contraceptif s'exerce sur le complexe utéro-placentaire et se traduit par la dégénérescence et, selon l'espèce animale, la résorption ou l'expulsion subséquente des produits de la conception (G. Galliani et al., Arzneim. Forsch./Drug Res. 30,972,1980).

Les études qui ont été faites sur les relations structure/activité dans cette classe ont conduit à la sélection du composé 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo [5,1-a]isoquinoléine ayant la formule suivante



(I)

comme étant l'un des composés les plus actifs de toute la classe. Ainsi qu'il a été relaté dans le susdit brevet US, ce composé manifeste une remarquable activité contraceptive lorsqu'il est administré en doses multiples. Plus particulièrement, le US-A-4.075.341 rapporte le résultat d'expériences que l'on a effectuées sur des hamsters femelles en administrant ce composé, dissous dans de l'huile de sésame, pendant cinq jours consécutifs au cours de la période d'activité maximale (du jour 4 au jour 8 de la grossesse).

Ce résultat, rapporté au tableau II de ce brevet US, montre qu'en donnant une dose journalière de 0,08 mg/kg, on obtient l'interruption de grossesse sur 50 % des hamsters (DE_{50}). Des expériences analogues, effectuées sur les rates en administrant le composé dissous dans de l'huile de sésame, du jour 6 au jour 10 de la grossesse, ont donné une DE_{50} de 1 mg/kg/jour. Malgré l'activité contraceptive très élevée mise en évidence par ces tests, le besoin d'une administration multiple et surtout la nécessité d'administrer ce composé pendant un intervalle de temps particulier (phase de post-implantation) ont rendu ce composé impropre à une application vétérinaire de grande ampleur.

Il vient d'être constaté maintenant qu'en utilisant sous ^{une} forme particulière, c'est-à-dire la forme micronisée ou micropulvérisée, le composé 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo[5,1-a]isoquinoléine, on peut préparer des formulations convenables, à décharge prolongée, qui éliminent les désavantages susindiqués.

Ladite formulation, contenant de la 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo [5,1-a]isoquinoléine micronisée, permet au composé d'être fort efficace après une seule injection intramusculaire, sur une période de grossesse plus étendue. Des études effectuées sur les chiennes ont mis en évidence le fait que, en fonction de la dose administrée, cette période peut courir du jour de l'accouplement (voire à partir de 10 jours avant

l'accouplement) au jour 15-20 de la grossesse.

La 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo[5,1-a]-
isoquinoléine micronisée est une poudre blanche impalpable, sans odeur et sans saveur, insoluble dans l'eau
5 (< 1γ/ml) et, à la température ambiante, modérément soluble dans des véhicules huileux (solubilité dans l'huile de sésame : 0,5 mg/ml). Le produit micronisé a les mêmes caractéristiques analytiques que le produit non micronisé, telles que par exemple le même spectre
10 U.V. et le même R_f chromatographique, bien que ses particules aient des dimensions différentes.

Les dimensions des particules du produit ont été mesurées avec le système HIAC. Dans ce système, la détermination des dimensions des particules est
15 fondée sur l'ombre portée par une particule qui est frappée par un rayon lumineux.

L'instrument de mesure est constitué essentiellement d'un capteur qui est formé par une source lumineuse et un photodétecteur, séparés par la cellule de
20 comptage. Une suspension aqueuse de la poudre à tester traverse cette cellule dont les dimensions varient en fonction de la gamme de dimensions à évaluer. Chaque particule interrompt individuellement une partie d'un rayon lumineux en engendrant un signal qui est proportionnel à la surface de l'ombre de cette particule.
25 Convenablement mis en corrélation avec le diamètre d'une particule sphérique standard qui donnerait la même absorption de lumière, ce signal électrique est filtré et donne le nombre des particules ayant un diamètre
30 choisi à l'avance. L'instrument peut diviser la plage de mesure (1 à 300 μ) en intervalles de dimensions fixées arbitrairement à l'avance. Par cette méthode, il est possible de calculer le nombre des particules pour chaque plage de mesure et de mettre ce nombre en corrélation
35 avec le nombre total des particules contenues dans l'échantillon. Les valeurs ainsi obtenues sont alors converties en une valeur unique qui représente les

dimensions des particules de la poudre.

La valeur qui est utilisée le plus communément pour représenter les dimensions des particules d'une poudre, selon l'évaluation du système HIAC, est le
5 diamètre de volume médian (DVM) qui correspond à la valeur du diamètre de la médiane (50 % en volume) du volume cumulé.

Les dimensions des particules de la
2-(4-chlorophényl)-s-triazolo [5,1-a]isoquinoléine micro-
10 nisée, exprimées en DVM, sont toujours inférieures à 15 µ.

On prépare la 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo-
[5,1-a]isoquinoléine micronisée en soumettant à une
opération mécanique de micronisation, le composé
2-(4-chlorophényl)-s-triazolo[5,1-a]isoquinoléine, obtenu
15 par n'importe quel procédé décrit dans la littérature technique (voir par exemple le brevet US 4.075.341 et les demandes de brevet italien 26868 A/79 et 26803 A/79). On peut effectuer cette micronisation en utilisant des machineries fondées sur des principes
20 divers, comme il est bien connu des spécialistes en la matière. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, cette micronisation est effectuée dans un broyeur ou microniseur à énergie de fluide. Avec cet
appareil, le composé à microniser est entraîné dans
25 un circuit par un violent courant de gaz. Les collisions des particules du composé contre les parois du circuit ainsi que les collisions des particules entre elles provoquent la pulvérisation de celles-ci. Cet
appareil peut aussi être équipé d'un dispositif de recy-
30 clage qui ramène à la chambre de broyage les plus grosses particules, insuffisamment pulvérisées. Le principal avantage du broyeur à énergie de fluide réside dans le fait que les particules de la poudre micronisée ainsi
obtenue ont des dimensions très homogènes, c'est-à-dire
35 que la gamme de dimensions des particules est très étroite.

La 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo-[5,1-a]-
isoquinoléine micronisée peut être convenablement formulée

en préparations galéniques qui sont adaptées à l'administration parentérale, les dimensions des particules de la poudre initiale étant maintenues, et qui permettent une lente absorption du principe actif, ce qui prolonge son action. La formulation de la 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo[5,1-a]isoquinoléine micronisée, ^{sous} la forme d'une suspension dans un véhicule huileux convenable, constitue donc un autre objet spécifique de la présente invention. Comme véhicule huileux, on peut utiliser des huiles d'origine végétale ou des esters gras tels qu'huile de sésame, huile de maïs, huile d'arachide, huile de coton, oléate d'éthyle et semblables. De telles formulations peuvent contenir en plus, comme il est bien connu des spécialistes en la matière, des agents antimicrobiens, qui sont utilisés pour empêcher la croissance de micro-organismes dans la préparation, et des antioxydants, essentiellement pour empêcher le véhicule huileux de rancir.

Ces suspensions contiennent en général de 1 à 10 %, de préférence environ 5 %, en poids de principe actif par volume, la valeur optimale dépendant bien entendu de la dose choisie en fonction des caractères et/ou de la taille de l'animal.

En vue d'étudier l'influence de la formulation (dimensions des particules et véhicule) sur l'action contraceptive, on a soumis le composé 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo[5,1-a]isoquinoléine à un broyage manuel et à une opération mécanique de micronisation. Dans la première de ces méthodes, on a pilé le composé dans un mortier et on l'a fait passer à travers un tamis possédant des ouvertures appropriées, de façon à obtenir des particules suffisamment homogènes ayant les dimensions désirées. Dans la deuxième de ces méthodes, on a utilisé le microniseur Micronette M 50 (GUSEO, Milan, Italie) en opérant avec une pression d'alimentation de 2 bars et une pression de micronisation de 7 bars. Par les méthodes décrites ci-dessus, on a préparé trois

lots de 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo[5,1-a]isoquinoléine dont les particules ont respectivement les dimensions suivantes : 10 μ , 39 μ et 134 μ . Ces trois lots de 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo[5,1-a]isoquinoléine ont été formulés (sous forme de suspensions contenant 5 % de principe actif) d'une part dans un véhicule huileux (huile de sésame contenant 0,2 % d'alcool benzylique) et d'autre part dans un véhicule aqueux (solution physiologique contenant 2 % de Tween 80[®]).

On a d'abord vérifié sur des rates l'influence des dimensions des particules du principe actif et celle du véhicule d'injection sur l'action embryolétale du composé. On a utilisé à cet effet des rates Sprague-Dawley, pesant 200-280 g. Ces rates ont été logées avec des mâles adultes pendant une nuit. Le lendemain matin, les accouplements ont été mis en évidence par la présence de sperme dans le frottis vaginal. Le jour même où le sperme a été décelé (jour 1 de la grossesse), on a administré aux rates, par voie intramusculaire, une dose de 10 mg/kg de 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo[5,1-a]isoquinoléine. On a examiné les effets du composé sur les conceptus en tuant les animaux au jour 16 de leur grossesse. A l'autopsie, on a isolé les utérus et déterminé le nombre des sites d'implantation, le nombre des embryons ou des foetus morts et le nombre des foetus vivants.

Il a été considéré que la grossesse avait été interrompue lorsque les trompes utérines ne contenaient pas de foetus vivants et que la présence des cicatrices d'implantation indiquait que les rates avaient été fécondées.

Les résultats obtenus sur les rates sont résumés au Tableau I.

TABLEAU I

Influence des dimensions des particules sur l'activité de la 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo[5,1-a]isoquinoléine chez les rates, après administration i.m. de 10 mg/kg

5 au jour 1 de la grossesse.

	Véhicule	Dimensions particules (DVM) *	Nombre de rates	% Interrup- tions grossesse
10	Huile de sésame + 0,2% alcool benzylique (0,2 ml/kg)	10 39 134	20 10 15	65 30 6,7
		-	10**	0
15	Solution physiolo- gique + 2 % Tween 80 [®] (0,2 ml/kg)	10 39	10 6	20 16,7
20		134	11	0
		-	6**	0

25 * Diamètre de volume médian, exprimé en μ

** Animaux traités avec le véhicule seulement.

En analysant ces résultats, on peut constater que la plus forte activité se manifeste lorsqu'on administre de la 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo[5,1-a] isoquinoléine micronisée, suspendue dans le véhicule huileux. Avec ce
30 véhicule, il a été observé que l'activité décroît progressivement à mesure que les dimensions des cristaux croissent. Au contraire, les résultats obtenus avec les trois formu-
lations en véhicule aqueux sont tous négatifs.

35 Au vu des résultats ci-dessus, on a effectué aussi des expériences sur les chiennes, en étudiant l'activité des suspensions huileuses seulement et en administrant

le composé à des doses quatre fois plus faibles que celles utilisées chez les rates, c'est-à-dire 2,5 mg/kg. Ce choix a été suggéré par le fait que les chiennes sont bien plus sensibles que les rates à l'action de ces
 5 nouveaux contraceptifs (G. Galliani et al. Acta Endocrinol. 85, Suppl. 212,199,1977).

Dans cette étude, on a utilisé un total de 24 chiennes adultes, de différentes races, pesant de 6 à 25 kg. Pendant la phase d'oestrus, les animaux ont été
 10 accouplés, puis à nouveau deux jours plus tard, avec des mâles de fécondité prouvée ; le jour compris entre les deux accouplements est considéré comme le jour zéro de la grossesse. On a administré aux chiennes une seule
 15 dose i.m. de 2,5 mg/kg au cours des six premiers jours de la gestation et on les a maintenues en observation pour voir s'il avait été mis fin à leur grossesse ou si celle-ci était interrompue.

Les résultats des expériences effectuées sur les chiennes est rapporté au Tableau II :

20

TABLEAU II

Influence des dimensions des particules sur l'activité de la 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo[5,1-a]isoquinoléine chez les chiennes à qui l'on en a administré 2,5 mg/kg i.m. suspendus dans un véhicule huileux* pendant les six
 25 premiers jours de la gestation**.

	Dimensions particules (DVM)***	Nombre de chiennes	% Interruptions grossesse
30	10	10	100
	39	4	50
	134	4	0
	véhicule	6	0

35

* Huile de sésame contenant 0,2 % d'alcool benzylique (0,05 ml/kg)

** Une seule injection dans la période indiquée.

*** Diamètre de volume médian exprimé en μ .

En accord avec les résultats obtenus chez les rates, les meilleurs résultats (100 % d'interruptions de grossesse) sont obtenus aussi chez les chiennes avec la suspension contenant le composé micronisé. On a répété
5 les expériences décrites ci-dessus en utilisant des formulations contenant de la 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo- $\sqrt{5,1-a}$ isoquinoléine micronisée, caractérisée par des dimensions de particules légèrement différentes (MVD = 14,4 μ et MVD = 6,3 μ), toujours en obtenant
10 des résultats optimaux comme indiqué ci-dessus.

Des études supplémentaires effectuées sur cette formulation ont prouvé qu'une seule injection intramusculaire de 2,5 mg/kg de principe actif, administrée au cours des 15 premiers jours suivant l'accouplement
15 (du jour 0 au jour 15 de la grossesse), provoque une interruption de grossesse à 100 %. De plus, à dose plus élevée (5 mg/kg), le composé s'est révélé très efficace (98 % de résultats positifs) lorsqu'il est administré entre le dixième jour avant l'accouplement et le jour
20 20 de la grossesse.

Un autre objet spécifique de la présente invention est donc un procédé pour interrompre des grossesses non souhaitées chez les animaux de compagnie, lequel procédé consiste à administrer à l'animal, en une seule
25 injection intramusculaire, une quantité efficace de 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo $\sqrt{5,1-a}$ isoquinoléine micronisée, dont les particules ont des dimensions, exprimées en DVM, inférieures à 15 μ et qui est suspendue dans un véhicule huileux.

REVENDEICATIONS

1. 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo[5,1-a]-
isoquinoléine micronisée, dont les particules ont des
dimensions, exprimées en diamètre de volume médian (DVM),
5 inférieures à 15 μ .
2. Formulation à usage vétérinaire qui contient
le composé de la revendication 1, en tant que principe actif,
suspendu dans un véhicule huileux.
3. Formulation selon la revendication 2 qui
10 contient de 1 à 10 % (poids/volume) de principe actif.
4. Formulation selon la revendication 3 qui
contient environ 5 % (poids/volume) de principe actif.
5. Formulation selon l'une quelconque des
revendications 2 à 4, caractérisée en ce que le
15 véhicule huileux est de l'huile de sésame.
6. Procédé pour interrompre des grossesses
non souhaitées chez les animaux de compagnie, lequel pro-
cédé consiste à administrer à l'animal, en une seule
injection intramusculaire, une quantité efficace de
20 2-(4-chlorophényl)-s-triazolo[5,1-a]-isoquinoléine micro-
nisée, dont les particules ont des dimensions, exprimées
en DVM, inférieures à 15 μ et qui est suspendue dans un
véhicule huileux.

CABINET M. LEMOINE
13, bd des Batignolles
75008 PARIS

