

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

N° 81 01593

⑤④ Carnitinamides d'acides aminés optiquement actifs, leur procédé de préparation et leur application en thérapeutique.

⑤① Classification internationale (Int. Cl. ³). C 07 C 103/54; A 61 K 31/16.

②② Date de dépôt..... 28 janvier 1981.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée : *Italie, 29 janvier 1980, n° 47749 A/80.*

④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 31 du 31-7-1981.

⑦① Déposant : SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE SPA, société de droit italien,
résidant en Italie.

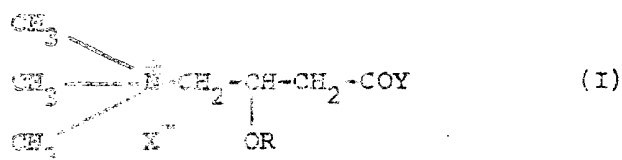
⑦② Invention de : Paolo De Witt et Maria Ornella Tinti.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Cabinet Malémont,
42, av. du Président-Wilson, 75116 Paris.

La présente invention est relative à une nouvelle classe d'amides de carnitine et d'acyl-carnitine, à leur préparation et à leur utilisation comme agents thérapeutiques et comme intermédiaires dans le dédoublement d'antipodes optiques en vue de l'obtention du chlorhydrate de L-carnitine et du chlorhydrate de D-carnitine.

L'invention se rapporte plus particulièrement à des amides de carnitine et d'acyl-carnitine, dans lesquels le reste amide dérive d'un aminoacide estérifié, optiquement actif, ces amides étant représentés par la formule générale :

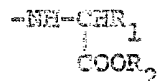


dans laquelle :

X^- est un anion halogène, de préférence Cl^- ;

R représente l'hydrogène ou un groupe acyle, de préférence un groupe acétyl, propionyle, butyryle ;

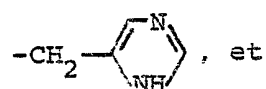
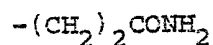
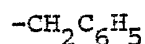
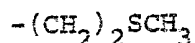
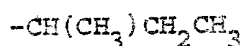
Y est le reste d'un aminoacide estérifié, optiquement actif, répondant à la formule générale :



dans laquelle :

R_1 représente l'un des groupes suivants :

- CH₂COOR₂
- (CH₂)₂COOR₂
- CH₂S₃CH₂CH(NH₂)COOR₂
- CH₃
- CH(CH₃)₂
- CH₂CH(CH₃)₂



10 R_2 est un radical alkyle de 1 à 4 atomes de carbone, en étant de préférence un radical méthyle, éthyle ou isopropyle.

15 Il doit être entendu que les amides suivant la présente invention, représentés par la formule (I), englobent à la fois les mélanges de diastéréoisomères et les antipodes optiques séparés que l'on peut obtenir au départ de ces mélanges par des procédés que l'on décrira par la suite.

20 Les amides de formule générale (I) que l'on préfère particulièrement sont ceux dans lesquels le reste amide est celui du diester méthylique, éthylique ou isopropylique d'acide L-aspartique et d'acide L-glutamique, ainsi que de la L-cystine, le reste de l'ester méthylique ou éthylique de L-asparagine, de L-phénylalanine, de L-glutamine, de L-phénylglycine, de L-leucine, de L-isoleucine, de L-méthionine, de L-histidine, de
25 L-valine et de L-alanine.

30 On prépare les amides de formule (I) au départ de chlorhydrate de D, L-carnitine ou de chlorhydrate d'acyl-D, L-carnitine, que, pour la brièveté, on désignera ci-après respectivement par "carnitine" et "acyl-carnitine".

Suivant l'invention, on prépare les amides de formule (I) en suivant deux voies distinctes de synthèse ; suivant l'une de ces voies, la carnitine ou l'acyl-carnitine est convertie en l'halogénure d'acide correspondant et ce dernier composé est condensé avec l'ester désiré d'acide optiquement actif (Procédé A), tandis que, suivant la seconde voie de synthèse, la carnitine ou l'acyl-carnitine est directement condensée avec l'ester de l'acide optiquement actif en présence d'un agent de condensation approprié (Procédé B).

Le Procédé A comprend plus particulièrement les phases opératoires suivantes :

(a) on fait réagir le chlorhydrate de carnitine ou d'acyl-carnitine avec un excès d'agent halogénant à environ 25-60°C sur une période d'environ 0,3 à 24 heures et on sépare l'excès d'agent halogénant pour obtenir de la sorte l'halogénure d'acide correspondant de carnitine ou d'acyl-carnitine ;

(b) on dissout l'halogénure d'acide de carnitine ou d'acyl-carnitine de la phase (a) dans un solvant anhydre inerte ;

(c) on condense cet halogénure d'acide de carnitine ou d'acyl-carnitine avec un acide optiquement actif, estérifié avec des alcools alkyliques inférieurs de 1 à 4 atomes de carbone, dissous dans un solvant anhydre inerte, en maintenant le mélange de réaction sous agitation à la température ambiante sur une période d'environ 3 à 48 heures, pour obtenir de la sorte l'amide de formule (I) (mélange de diastéréoisomères) ; et

(d) on isole l'amide de formule (I) par concentration du mélange de la phase (c) et on purifie par des cristallisations répétées.

Le Procédé B comprend les phases opératoires

suivantes :

(a') on condense la carnitine ou l'acyl-carnitine en solution aqueuse avec un aminoacide optiquement actif, estérifié avec des alcools alkyliques inférieurs de 1 à 4 atomes de carbone dans une solution de sol-
5 vants organiques, tels que de l'acétone et du dioxane, en présence d'une solution de dicyclohexylcarbodiimide dans le même solvant organique, en maintenant le mélange ainsi obtenu sous agitation à 15-40°C pendant 20-48 heures,
10 pour obtenir de la sorte l'amide de formule (I) (mélange de diastéréoisomères) et un précipité de dicyclohexyl urée, et "

(b') on sépare par filtration le précipité de dicyclohexyl urée et on isole l'amide de formule (I) par
15 concentration du filtrat, dessiccation et cristallisations répétées dans des solvants organiques.

Le solvant organique de la phase (b') est de préférence de l'acétone. Le rapport molaire carnitine (ou acyl-carnitine)/ester d'acide amino optiquement actif/dicyclohexylcarbodiimide est de préférence de 1/1/2.
20

L'ester mentionné précédemment d'acide amino optiquement actif s'obtient par estérification de l'acide amino optiquement actif, de préférence avec du méthanol, de l'éthanol ou de l'isopropanol, en présence de
25 HCl gazeux.

On isole ensuite l'ester sous la forme de chlorhydrate d'ester.

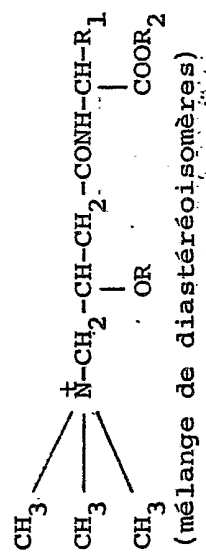
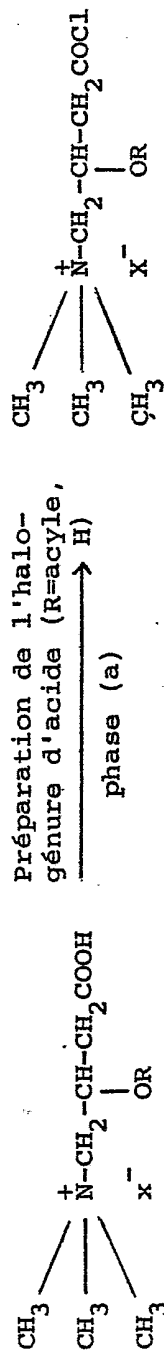
Ensuite :

(i) on dissout le chlorhydrate d'ester dans de
30 l'eau, on amène le pH à neutralité avec une solution basique saturée, par exemple une solution de Na_2CO_3 ; la solution ainsi obtenue est extraite de manière répétée avec du chlorure de méthylène, du chloroforme ou de

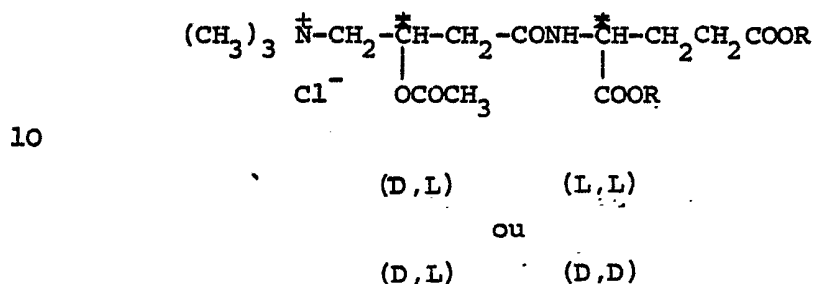
l'éther éthylique, la phase organique est desséchée, concentrée, puis on isole l'ester de l'acide optiquement actif sous forme de la base libre et on l'utilise tel quel dans la réaction avec l'halogénure de carnitine ou d'acyl-carnitine (Procédé A) ou avec la carnitine ou l'acyl-carnitine (Procédé B) ; ou

(ii) on met en suspension le chlorhydrate d'ester dans de l'éther éthylique et on ajoute de la triéthylamine ou de la pyridine en quantités équimolaires à 0°C ;
on sépare par filtration le chlorhydrate de triéthylamine ou de pyridine ainsi obtenu ; on concentre la solution étherée et l'ester de l'acide optiquement actif, isolé sous la forme de la base libre, est utilisé tel quel pour la condensation avec l'halogénure de carnitine ou d'acyl-carnitine [phase (c) du Procédé A] ou avec la carnitine ou l'acyl-carnitine [phase (a') du Procédé B].

Les Procédés A et B de préparation des amides de formule (I) sont illustrés par les schémas suivants de synthèse.



L'amide de formule (I), tel qu'obtenu par les procédés précédents, est en réalité un mélange d'amides diastéréoisomères. A titre d'exemple, en faisant réagir l'acétyl-D,L-carnitine avec l'une ou l'autre des deux formes optiquement actives de l'acide glutamique (diester), on obtiendra les diastéréoisomères suivants (les atomes de carbone asymétriques sont marqués par un astérisque) :



suivant que l'acide glutamique utilisé (diester) est dans sa forme lévogyre ou dans sa forme dextrogyre.

Pour réaliser le dédoublement du mélange d'amides de la formule générale (I), afin d'isoler ainsi les diastéréoisomères distincts, on soumet le mélange à une cristallisation fractionnée pour laquelle on utilise un mélange d'un agent solvant et d'un agent de précipitation. Des mélanges appropriés de ce genre sont des mélanges d'acétone/acétate d'éthyle et de méthanol/acétone.

La phase solide qui précipite consiste essentiellement en l'un des diastéréoisomères, tandis que la phase liquide consiste essentiellement en l'autre diastéréoisomère. On peut obtenir des isomères pratiquement purs par des cristallisations répétées.

Les quantités relatives de l'agent solvant et de l'agent de précipitation dépendront de l'amide particulier et de la concentration des isomères l'un par rapport à l'autre. Ces quantités relatives de l'agent sol-

vant et de l'agent de précipitation seront aisément déterminées par une expertise quelconque, en tenant compte que, pour obtenir le meilleur dédoublement, on utilisera la plus petite quantité nécessaire de solvant et la plus
5 petite quantité d'agent de précipitation provoquant la formation d'une légère opalescence.

La préparation de certains amides suivant l'invention sera illustrée plus complètement par les exemples non limitatifs suivants.

10 Exemple 1

Préparation de l'acétyl-carnitinamide du diester isopropylique d'acide L-glutamique (Procédé A)

(a) Préparation du chlorure d'acide de D,L-acétyl-carnitine.

15 A du chlorhydrate d'acétyl-carnitine (1,2 g ; 0,005 mole), on ajoute du chlorure d'oxalyle (2,5 ml ; 0,029 mole) et on maintient le mélange résultant sous agitation à la température ambiante pendant 2 heures. On sèche ensuite le mélange sous vide et on lave le
20 reste trois fois avec de l'éther éthylique anhydre, pour obtenir de la sorte le chlorure d'acide d'acétyl-carnitine que l'on utilise tel quel dans la phase suivante.

(b) Condensation du chlorure d'acide de D,L-acétyl-carnitine avec le diester isopropylique d'acide
25 L-glutamique.

Une suspension du chlorure d'acide préparé suivant la phase précédente (0,005 mole) dans 20 ml de chlorure de méthylène anhydre est ajoutée lentement
30 sous agitation au diester isopropylique d'acide L(+)-glutamique sous forme de la base libre, $[\alpha]_D = +19$ (1,3 g ; 0,005 mole), dissous dans 20 ml de chlorure de méthylène anhydre. On maintient le mélange de réaction à la température ambiante sous agitation pendant 3 heures, puis

on dessèche. Le reste est repris avec de l'isopropanol anhydre et l'acétyl-carnitine qui n'a pas réagi est précipitée avec de l'éther éthylique anhydre. On concentre la solution et le reste obtenu est lavé avec de l'eau
 5 que l'on a préalablement refroidie à 0°C, afin d'éliminer le diester isopropylique d'acide glutamique n'ayant pas réagi. Le reste (probablement un mélange des deux diastéréoisomères) est analysé par chromatographie en couche mince (gel de silice ; éluant : CHCl_3 : 55 ;
 10 CH_3OH : 35 ; NH_4OH : 5 ; H_2O : 5) et il apparaît sous forme de deux taches, la première à un R_f supérieur et la seconde à un R_f inférieur.

(c) Dédoublément des diastéréoisomères

Le produit ayant un R_f inférieur avec une valeur $[\alpha]_D = -10$ (1% dans H_2O) est isolé par des cristallisations répétées dans de l'acétone-acétate d'éthyle.
 15 Dans les liqueurs-mères la concentration du produit au R_f supérieur augmente. Par une analyse de résonance magnétique nucléaire du produit au R_f inférieur, il
 20 s'est confirmé que le composé isolé est de l'acétyl-carnitinamide du diester isopropylique d'acide glutamique

25 RMN δ 5,7 (m, 1H, $-\text{CH}-$) ; 5,0 (m, recouvert, $(\text{O}-\text{CH} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array})$;

4,2 (m, 1H, $-\text{NH}-\text{CH}-$) ; 3,5 (d, 2H, $\text{=N}^+-\text{CH}_2-$) ; 3,2 (s, 9H,

30 $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{N}^+)$; 2,9-2,2 (m, 9H, $-\text{CH}_2\text{CO}; \text{CH}_2\text{CH}_2;\text{OCOCH}_3$) ; 1,2
 (d, 12H $(\text{CH} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array})_2$; D_2O

Un échantillon de comparaison de L-acétyl-

carnitinamide de l'ester isopropylique d'acide L-glutamique a été préparé par le même procédé que ci-dessus en utilisant du chlorhydrate de L-acétyl-carnitine pur, $[\alpha]_D = -27$ (1% dans H_2O). Le produit ainsi obtenu montrait une

5 valeur $[\alpha]_D = -17$ (1% dans H_2O).

(d) Hydrolyse de la liaison amide sur le diastéréoisomère.

Les diastéréoisomères isolés de la façon décrite précédemment dans la phase (b) sont dissous dans de

10 l'eau et, à la solution résultante, on ajoute de l'acide oxalique (rapport amide/acide oxalique de 1/3). La solution est maintenue à la température de reflux pendant environ 7 heures, puis on la filtre et on concentre le filtrat jusqu'à siccité. On fait passer le reste con-

15 sistant en L-carnitine à travers une résine IRA 402 (activée sous la forme OH) pour éliminer toute trace quelconque d'acide oxalique. L'éluat est acidifié jusqu'au pH de 2 avec du HCl concentré, puis lyophilisé. Le produit lyophilisé consistant en L-carnitine (ce qui

20 est vérifié par une chromatographie en couche mince et par résonance magnétique nucléaire) montre une valeur $[\alpha]_D = -20$ (1% dans H_2O).

Exemple 2

Préparation de carnitinamide d'ester diméthylque

25 d'acide L(+)-aspartique (Procédé B)

(a') Condensation de carnitine/ester diméthylque d'acide L(+)-aspartique en présence de dicyclohexylcarbodiimide.

On ajoute de la triéthylamine (4,2 ml ; 0,03

30 mole) à une solution de chlorhydrate d'ester diméthylque d'acide L(+)-aspartique (6 g ; 0,03 mole) dans de l'acétone (200 ml). On maintient le mélange pendant 0,5 heure sous agitation magnétique à la température ambian-

te. On enlève par filtration le précipité de chlorhydrate de triéthylamine qui se sépare. A la solution filtrée, on agite sous agitation magnétique et à la température ambiante une solution de dicyclohexylcarbodiimide (7 g ; 0,03 mole) dans de l'acétone (100 ml) et du chlorhydrate de D,L-carnitine (6 g ; 0,03 mole) dissous dans 10 ml de H₂O. On maintient le mélange de réaction sous agitation pendant la nuit.

(b') Séparation du mélange de diastéréoisomères

- 10 Le précipité ainsi formé (dicyclohexylurée) est séparé par filtration. Le filtrat est concentré sous vide jusqu'à évaporation totale de l'acétone. La solution aqueuse résiduelle est lavée trois fois avec de petites quantités de CHCl₃ (pour éliminer tout résidu
- 15 quelconque de l'ester de départ et de triéthylamine pouvant encore être présent). On évapore ensuite la phase aqueuse jusqu'à siccité. Le produit brut, analysé par chromatographie en couche mince (CHCl₃, MeOH, H₂O, NH₄OH : 55/35/5/5 ; gel de silice), consiste en deux taches ayant
- 20 des valeurs R_f voisines l'une de l'autre ;
[α]_D (matière brute) = -8,2 (1% dans H₂O) [mélange des deux diastéréoisomères].

- L'analyse de résonance magnétique nucléaire (sulfoxyde de diméthyle) montre deux doublets dans
- 25 l'intervalle δ de 9,15-8,72, dont l'un représente les 70% de l'ensemble (calcul sur l'intégrale).

(c') Dédoublément des diastéréoisomères

- Les deux diastéréoisomères sont dédoublés par cristallisation fractionnée dans du méthanol-acétone.
- 30 Le produit ayant la valeur R_f la plus basse est le premier à cristalliser, tandis que les liqueurs-mères deviennent plus riches en produit de valeur R_f supérieure. Par une série de quatre cristallisations, il est possi-

ble d'obtenir le diastéréoisomère pur au Rf inférieur ;
et il s'agit d'une substance très hygroscopique et déli-
quescente.

$[\alpha]_D = -13,5$ (1% dans H_2O)

5 RMN (sulfoxyde de diméthyle), δ : 9,00 (1H, d, -NHCO-) ;

5,60 (1H, m, $\begin{array}{c} \text{OCOCH}_3 \\ | \\ \text{-CH-} \end{array}$) ; 4,66 (1H, m, $\begin{array}{c} \text{NHCO-} \\ | \\ \text{-CH-} \end{array}$) ; 3,87

(2H, d, $\begin{array}{c} \text{+} \\ \text{N-CH}_2\text{-} \end{array}$) ; 3,70 [6H, s, $(-\text{COOCH}_3)_2$] ; 3,23

10 (9H, s, $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_3 \text{---} \text{N-} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$) ; 2,90-2,46 (4H, m, $\text{-CH}_2\text{-COOCH}_3$ /
 $\text{-CH}_2\text{-CONH-}$) ; 2,10 (3H, s, $-\text{OCOCH}_3$) .

Pour vérifier les résultats précédents, l'amide
de l'ester diméthylque d'acide L(+)-aspartique a été
15 préparé au départ d'un échantillon de chlorhydrate de
L(-)-carnitine pur en suivant les mêmes procédés que
ceux décrits ci-dessus.

Le produit ainsi obtenu a montré les mêmes ca-
ractéristiques physico-chimiques que celles du diasté-
20 réoisomère précédemment isolé ayant la valeur Rf infé-
rieure. Ce produit avait une valeur $[\alpha]_D = -15$ (1% dans
 H_2O) .

(d') Hydrolyse du groupe amide sur le diastéréo-
isomère isolé

25 Une solution de l'amide précédemment préparé
(2 g ; 0,006 mole) dans 15 ml de H_2O et de l'acide oxa-
lique (1,8 g ; 0,02 mole) sont maintenus pendant 6 heures
à la température de reflux, puis on refroidit et
on laisse reposer au réfrigérateur pendant la nuit.
30 Le mélange de réaction est filtré et le filtrat est lavé
trois fois avec du $CHCl_3$, puis évaporé jusqu'à siccité.

Le reste, repris avec du MeOH, filtré et pré-
cipité avec du CH_2Cl_2 , donne la L(-)-carnitine brute.

Ce produit est dissous dans de l'eau et on le fait passer à travers une résine IRA 402 (résine fortement anionique) avec élution en utilisant de l'eau, puis on acidifie avec du HCl 6N et on lyophilise.

- 5 Cette L(-)-carnitine lyophilisée a une valeur $[\alpha]_D = -23$ (1% dans H_2O).

Exemple 3

Préparation d'acétyl-carnitinamide d'ester éthylique de phénylglycine (Procédé A)

- 10 On ajoute 10 g de phénylglycine à 150 ml d'éthanol absolu. On fait barboter du HCl gazeux à la température ambiante sous agitation dans la solution résultante, jusqu'à dissolution de la totalité de la phénylglycine. On conserve la solution à la température de reflux pendant la nuit, puis on refroidit et on
- 15 dessèche sous vide. Le reste est à nouveau dissous dans de l'eau et la solution résultante est neutralisée avec du $NaHCO_3$. L'ester éthylique de phénylglycine est extrait sous forme de la base libre avec du CH_2Cl_2 .
- 20 Une solution de chlorhydrate d'acétyl-carnitine (10 mmoles dans du CH_2Cl_2), préparée comme illustré dans l'Exemple 1, est ajoutée à une solution de 1,8 g (10 mmoles) de la base libre d'ester éthylique de phénylglycine, dissoute dans 10 ml de CH_2Cl_2 . Le mélange est
- 25 conservé sous agitation pendant la nuit à 50°C et ensuite refroidi. On ajoute de l'éther éthylique (50 ml) au mélange.

- 30 L'huile qui se forme est dissoute dans un mélange d'éthanol et d'acétone (5/1) et précipitée avec de l'éther.

RMN (sulfoxyde de diméthyle) $\delta = 1,1$ (t, 3H, $-CH_2-\underline{CH_3}$) ;
 2,0 (s, 3H, $-\underline{CO}-CH_3$) ; 2,8 (d, 2H, $-\underline{CH_2}-CO-$) ;
 3,2 (s, 9H, $-(\underline{CH_3})_3-N$) ; 3,5 (d, 2H, $-N-\underline{CH_2}$) ;

4,0 (q, 2H, $-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_3$) ; 5,4 (s, 1H, $-\underline{\text{CH}}-\text{C}_6\text{H}_5$) ;

5,5 (m, 1H, $-\text{CH}_2-\underset{|}{\text{CH}}-\text{CH}_2-$) ; 7,5 (s, 5H, C_6H_5) ;

9,2 (d, 1H, $\text{CO}-\underline{\text{NH}}-$)

Analyse élémentaire :

5 Calculé pour : C = 56,92 ; H = 7,29 ; N = 6,99 ; Cl = 8,84

Trouvé : C = 56,84 ; H = 7,31 ; N = 6,89 ; Cl = 8,72

Exemple 4

Préparation de l'acétyl-carnitinamide d'ester méthylique de leucine

10 On prépare l'acétyl-carnitinamide de l'ester méthylique de leucine en suivant les procédés de l'Exemple 1. L'analyse de résonance magnétique nucléaire du produit ainsi obtenu a montré les résultats suivants :

15 δ 8,8 (d, 1H, $-\text{NHCO}-$) ; 5,5 (m, 1H, $-\underset{\text{O}}{\text{CH}}-$) ; 4,4 (m, 1H,

$-\text{NH}-\underline{\text{CH}}-$) ; 3,8 (m, 5H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3-\text{CH}_2, -\text{OCH}_3$) ; 3,2 (s, 9H,

$\text{CH}_3-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) ; 2,9 (d, 2H, $-\text{CH}_2\text{CO}-$) ; 2,2 (s, 3H, $-\text{COCH}_3$) ;

20 1,5 (m, 3H, $\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_3$) ; 1,0 (d, 6H, $\text{CH}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}_3}$) ;

sulfoxyde de diméthyle.

L-leucine : $[\alpha]_D = +12$ (2,5% dans HCl 1N)

Chlorhydrate d'ester méthylique de L-leucine :

25 $[\alpha]_D = -13,4$ (c = 5% dans H_2O)

Exemple 5

Préparation de l'acétyl-carnitinamide d'ester méthylique d'isoleucine

30 On prépare l'acétyl-carnitinamide d'ester méthylique d'isoleucine en suivant les procédés de l'Exemple 2.

L'analyse de résonance magnétique nucléaire du produit ainsi obtenu a donné les résultats suivants :

- 8,7 (d, 1H, -NHCO-) ; 5,5 (m, 1H, -CH-) ;
 O
 5 4,3 (m, 1H, -NH-CH) ; 3,9 (s, 9H, NCH_2) ;
 CH_3
 3,7 (s, 3H, -OCH₃) ; 3,2 (s, 9H, CH_3 N^+) ;
 CH_3
 2,7 (recouvert, -CH₂-CO-) ; 2,1 (s, 3H, -COCH₃) ;
 10 1,4 (m, 3H, CH- CH -CH₂) ; 0,9 (m, 6H, -CH-CH₂-CH₃) ;
 CH_3
 sulfoxyde de diméthyle.

L-isoleucine : $[\alpha]_D = +35$ (c = 5% dans HCl 1N)

Chlorhydrate d'ester méthylique de L-isoleucine :

- 15 $[\alpha]_D = +26,6$ (c = 2% dans H₂O)

Exemple 6

Préparation de l'acétyl-carnitinamide d'ester méthylique de valine

- On prépare l'acétyl-carnitinamide d'ester méthylique de valine en suivant les procédés de l'Exemple 2. L'analyse de résonance magnétique nucléaire du produit obtenu a donné les résultats suivants :

- 5,7 (m, 1H, -CH-) ; 4,4 (m, 1H, NH-CH-) ;
 O
 25 3,8 (m, 5H, N^+ -CH₂-, OCH₃) ; 3,2 (s, 9H, CH_3 N^+) ;
 CH_3
 CH_3
 2,8 (d, 2H, -CH₂-CO-) ; 2,2 (s, 3H, -COCH₃) ;
 1,3-0,9 (m, 7H, -CH- CH_3) ; D₂O
 CH_3

Chlorhydrate d'ester méthylique de L-valine :

$$[\alpha]_D = +15,5 \text{ (C = 2\% dans H}_2\text{O)}$$

L-valine : $[\alpha]_D = +24 \text{ (c = 5\% dans HCl 1N)}$

Exemple 7

5 Préparation de carnitinamide d'ester méthylique de L-méthionine (Procédé B)

On prépare la base libre d'ester méthylique de L-méthionine au départ de son chlorhydrate dissous dans l'acétone par addition d'une quantité équivalente de triéthylamine (comme décrit en liaison avec l'ester diméthylique d'acide aspartique).

On met en suspension la base libre d'ester méthylique de méthionine (1,95 g ; 0,01 mole) dans un mélange d'acétone et de dioxane 1/1 (50 cm³) et on ajoute une solution de dicyclohexylcarbodiimide (7 g ; 0,03 mole) dans du dioxane (100 cm³) et une solution de chlorhydrate de D,L-carnitine (1,97 g ; 0,01 mole) dans du H₂O (5 cm³).

On maintient le mélange de réaction sous agitation pendant 24 heures à la température ambiante. On sépare par filtration le précipité de dicyclohexylurée qui se forme. La solution est concentrée jusqu'à sécheresse. Le reste, analysé par chromatographie en couche mince (CHCl₃ : MeTOH : CH₃COONa 0,01 M : 40/40/10), consiste, d'après ce que l'on a constaté, en deux produits ayant des valeurs R_f très proches l'une de l'autre (agent de développement : iode).

Par des cristallisations répétées avec de l'acétone-acétonitrile, le produit de la valeur R_f inférieure est isolé et il s'agit du L-carnitinamide d'ester méthylique de L-méthionine.

RMN (sulfoxyde de diméthyle) δ 8,8 (d, 1H, -CONH-) ;

4;5 (m, 1H, -CH-) ; 4,3 (t, 1H, -CH-) ;

O

NH-

- 3,8 (m, 5H, $-\text{COOCH}_3$, $\text{=}\overset{+}{\text{N}}-\text{CH}_2-$) ;
 3,2 (s, 9H, $\text{CH}_3-\overset{+}{\text{N}}$) ; 2,7 (recouvert par sulfoxyde
 5 de diméthyle, $-\text{CH}_2\text{CO}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$) ; 2,2 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}$) ;
 2,1 (s, 3H, $-\text{CH}_3-\text{S}-$)

Hydrolyse de la liaison amide du diastéréoisomère isolé

- L'amide précédemment isolé (3,4 g ; 0,01 mole)
 est dissous dans une solution 2M d'acide oxalique dans
 10 du H_2O (15 cm^3). On chauffe la solution jusqu'à 55°C
 pendant 10 heures. On refroidit ensuite la solution et
 on y ajoute 50 cm^3 d'éthanol. On maintient le mélange
 résultant à 0°C pendant la nuit. Le précipité qui se
 forme est séparé par filtration et la solution aqueuse
 15 est concentrée pour séparer l'alcool. Le concentré est
 repris avec de l'eau et on fait passer la solution à
 travers une résine Amberlite IRA 402 (résine fortement
 anionique). L'éluat est lyophilisé.

- Le produit lyophilisé, analysé par chromato-
 20 graphie en couche mince et résonance magnétique nucléai-
 re, consiste, d'après ce que l'on a constaté, en un sel
 interne de L-carnitine, $[\alpha]_{\text{D}} = -20$ (c = 1% dans H_2O).

Exemple 8

- Préparation de carnitinamide d'ester éthylique de L(+)-
 25 alanine (Procédé A)

- On fait passer une solution de chlorhydrate
 d'ester éthylique de L(+)-alanine dans de l'eau, à tra-
 vers une résine faiblement anionique (Amberlite IR 45).
 On lyophilise l'éluat pour obtenir la base libre d'ester
 30 éthylique de L(+)-alanine, $[\alpha]_{\text{D}} = +4$ (c = 2% dans du
 HCl 5N).

On dissout la base libre d'ester éthylique
 L(+)-alanine (1,5 g ; 12,5 moles) dans du chlorure de

méthylène et, à la solution résultante, on ajoute lentement sous agitation, à la température ambiante, une solution du chlorure d'acide de D,L-acétyl-carnitine (12,5 mmoles, préparation de la façon décrite précédemment).

- 5 On conserve la solution à 40°C pendant la nuit. Après refroidissement à 0°C, on filtre la solution et on ajoute de l'éther éthylique au filtrat, pour obtenir ainsi une huile.

- 10 Ce reste huileux est purifié en le dissolvant dans du H₂O, en traitant la solution aqueuse avec de l'Amberlite XAD₂ et en lyophilisant. Le produit lyophilisé, que l'on suppose être le mélange des deux diastéréoisomères, est analysé par chromatographie en couche mince (CHCl₃ : 55 ; CH₃OH : 55 ; NH₄OH : 5 ; H₂O : 5 ; développement : réactif de Dragendoff) et, d'après ce que l'on a constaté, il consiste en deux produits, respectivement d'un R_f supérieur et d'un R_f inférieur. Une analyse de résonance magnétique nucléaire dans du sulfoxyde de diméthyle a montré un multiplet dans l'intervalle δ 9-9,8, créé par la présence des deux amides.

- 20 On a réalisé des cristallisations répétées avec un mélange de solvants, comprenant du chlorure de méthylène, de l'acétone et de l'acétate d'éthyle, en isolant ainsi le produit au R_f inférieur ; [α]_D = -8.
- 25 RMN (sulfoxyde de diméthyle) δ 8,9 (d, 1H, -CONH-) ;
 5,5 (m, 1H, -CH-) ; 4,3-3,5 (m, 5H, -CH₂CH₃ ;

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ \text{CH}_3 \\ \text{N}-\text{CH}_2 \\ | \\ \text{NH} \end{array} ; -\text{CH}-) ; 3,2 \text{ (s, 9H, } \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{N}^+ \text{) ; 2,7 (recou-}$$
- 30 vert par sulfoxyde de diméthyle, -CH₂CO) ; 2,1 (s, 3H, -COCH₃) ; 1,5 (t, 3H, CH₃CH₂-)

L'hydrolyse de la liaison amide de l'ester

sur le diastéréoisomère isolé et la séparation de la L-carnitine sont réalisées de la façon décrite précédemment pour l'acétyl-carnitinamide de diester isopropylique d'acide glutamique.

5 La L-carnitine isolée (vérification par chromatographie en couche mince et résonance magnétique nucléaire) a une valeur $[\alpha]_D = -19$ (1% dans H_2O).

10 Les amides de formule générale (I) sont des agents thérapeutiques intéressants dans le traitement de troubles cardiaques, d'hyperlipidémies et d'hyperlipoprotéinémies.

15 On peut les utiliser également pour obtenir, en partant de la D,L-carnitine ou d'une acyl-D,L-carnitine (par exemple de l'acétyl-D,L-carnitine), les isomères D et L séparés. L'intérêt du dédoublement des isomères optiques de carnitine est créé par le fait que les formes D et L montrent des actions thérapeutiques différentes, parfois même antagonistes entre elles.

20 Un procédé de préparation de chlorhydrate de L-carnitine et de chlorhydrate de D-carnitine a été décrit dans le brevet belge n° 660039. Suivant ce procédé, on convertit du chlorhydrate de D,L-carnitine en chlorhydrate de D,L-carnitinamide que l'on fait réagir avec du D-camphorate d'argent, pour former ainsi le
25 D-camphorate de D,L-carnitinamide. Par cristallisation fractionnée au départ d'une solution alcoolique, de préférence une solution isopropanolique, de D-camphorate de D,L-carnitinamide, on obtient le D-camphorate de L-carnitinamide qui est la première fraction à cristalliser
30 de la solution. On obtient ensuite le chlorhydrate de L-carnitine par des procédés traditionnels d'hydrolyse au départ du D-camphorate de L-carnitinamide.

Ce procédé présente l'inconvénient sérieux,

qui rend difficile son application à l'échelle industrielle, que le D-camphorate d'argent doit nécessairement être utilisé. On obtient ce D-camphorate d'argent en faisant réagir d'abord de l'acide D-camphorique avec de l'ammoniac et en faisant ensuite réagir le D-camphorate d'ammonium ainsi obtenu avec du nitrate d'argent. Comme le D,L-carnitinamide est sous la forme d'un sel chlorhydrate, la formation du sel d'argent a pour but la séparation de l'ion chlorure. Du fait de l'utilisation du nitrate d'argent, ce procédé est coûteux et incommode étant donné que les diverses phases opératoires doivent être réalisées à l'abri de la lumière pour empêcher un noircissement des réacteurs en raison des grandes quantités de chlorure d'argent qui se forment. De plus, le produit final peut être souillé par la présence d'ions d'argent.

Pour éviter ces inconvénients sérieux et en particulier pour éliminer totalement l'utilisation de sels d'argent, on a décrit, dans la demande de brevet italien n° 50222 A/78, un procédé dans lequel on fait réagir directement la base libre de D,L-carnitinamide (obtenue en faisant passer une solution de chlorhydrate de D,L-carnitinamide à travers une colonne de résine échangeuse d'ions) avec de l'acide D-camphorique, ce qui donne le D-camphorate de D,L-carnitinamide. Bien que ce procédé constitue une amélioration remarquable par rapport au procédé du brevet belge mentionné précédemment, il est encore nécessaire suivant le procédé de cette demande de brevet italien de faire réagir le carnitinamide avec un agent approprié de dédoublement (c'est-à-dire l'acide D-camphorique) qui doit ensuite être séparé.

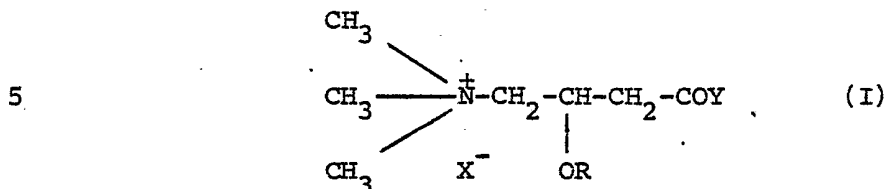
Inversement, les amides de la présente inven-

tion présentent l'avantage qu'ils peuvent être dédoublés directement en leurs diastéréoisomères par cristallisation fractionnée dans des solvants alcooliques. Cela signifie que ces amides permettent la séparation de la

5 L-carnitine à partir de la D-carnitine non seulement en évitant l'utilisation de sels d'argent mais en outre sans avoir recours à un agent quelconque de dédoublement, tel que l'acide D-camphorique.

REVENDICATIONS

1. Carnitinamides répondant à la formule générale :



dans laquelle :

X est un anion halogène ;

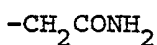
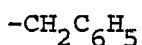
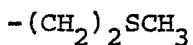
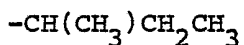
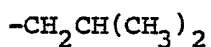
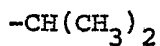
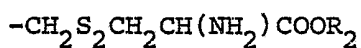
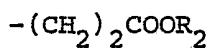
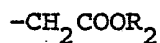
10 R est l'hydrogène ou un radical acyle choisi parmi les groupes acétyle, propionyle et butyryle ;

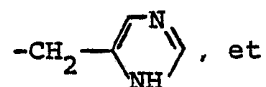
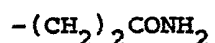
Y est le reste d'un aminoacide estérifié, optiquement actif, répondant à la formule générale :



15 dans laquelle :

R₁ représente :





R_2 est un radical alkyle de 1 à 4 atomes de carbone.

2. Carnitinamides suivant la revendication 1,
5 caractérisés en ce que le reste de l'acide aminé estérifié, optiquement actif, est le reste d'un L-acide aminé.

3. Carnitinamides suivant la revendication 2, caractérisés en ce que le reste du L-acide aminé estérifié est le reste du diester isopropylique de l'acide L-glutamique, du diester méthylique et du diester éthylique
10 d'acide L-aspartique et de L-cystine, ou de l'ester méthylique ou éthylique de L-asparagine, de L-phénylalanine, de L-glutamine, de L-phénylglycine, de L-leucine, de L-isoleucine, de L-méthionine, de L-histidine, de L-valine et
15 de L-alanine.

4. Procédé de préparation des carnitinamides répondant à la formule (I), caractérisé en ce qu'il comprend les phases opératoires suivantes :

(a) on fait réagir le chlorhydrate de carnitine ou
20 d'acyl-carnitine avec un excès d'un agent halogénant à environ 25-60°C pendant environ 0,3-24 heures et on sépare l'excès d'agent halogénant pour obtenir ainsi l'halogénure d'acide correspondant de carnitine ou d'acyl-carnitine ;

25 (b) on dissout l'halogénure d'acide de carnitine ou d'acyl-carnitine de la phase (a) dans un solvant anhydre inerte ;

(c) on condense cet halogénure d'acide de carnitine ou d'acyl-carnitine avec un acide aminé optiquement actif,
30 estérifié par des alcools alkylés inférieurs de 1 à 4 atomes de carbone, dissous dans un solvant anhydre inerte,

en conservant le mélange résultant sous agitation à la température ambiante pendant environ 3-48 heures, pour obtenir de la sorte l'amide de formule (I) (mélange des diastéréoisomères) ; et

- 5 (d) on isole l'amide de formule (I) par concentration du mélange de la phase (c) et purification par des cristallisations répétées.

10 5. Procédé de préparation des carnitinamides de formule (I), caractérisé en ce qu'il comprend les phases opératoires suivantes :

(a') on condense de la carnitine ou une acyl-carnitine en solution aqueuse avec un aminoacide optiquement actif, estérifié par des alcools alkyliques inférieurs de 1 à 4 atomes de carbone dans une solution de solvants organiques, tels que de l'acétone et du dioxane, en présence d'une solution de dicyclohexylcarbodiimide dans le même solvant organique, et on maintient sous agitation le mélange ainsi obtenu à 15-40°C pendant 20-48 heures, pour obtenir de la sorte l'amide de formule (I) (mélange des diastéréoisomères) et un précipité de dicyclohexyl urée ; et

(b') on sépare par filtration le précipité de dicyclohexyl urée et on isole l'amide de formule (I) par concentration du filtrat, dessiccation et cristallisations répétées dans des solvants organiques.

6. Procédé suivant la revendication 5, caractérisé en ce que le rapport molaire carnitine ou acyl-carnitine/ester d'acide amino optiquement actif/dicyclohexylcarbodiimide est d'environ 1/1/2.

30 7. Procédé de dédoublement d'un mélange de diastéréoisomères d'amides répondant à la formule (I) en leurs diastéréoisomères séparés respectifs, caractérisé en ce qu'il consiste à soumettre le mélange

d'amides à une cristallisation fractionnée avec un mélange d'un agent dissolvant et d'un agent précipitant, par exemple un mélange constitué d'acétone et d'acétate d'éthyle ou de méthanol et d'acétone, pour obtenir ainsi
5 une phase solide comprenant essentiellement l'un des isomères optiques, et une phase liquide comprenant essentiellement l'autre isomère optique.

8. Médicament, utile notamment dans le traitement de troubles cardiaques, de l'hyperlipidémie et de l'hyperlipoprotéïnémie, caractérisé en ce qu'il est constitué par
10 l'un quelconque des composés selon la revendication 1, 2 ou 3.

9. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé selon l'une quelconque
15 des revendications 1 à 3, éventuellement en association avec un support pharmaceutiquement acceptable.