

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

N° 79 15377

⑤4 Nouveau dérivé phospholipidique actif comme antilipémique et anti-artériosclérotique.

⑤1 Classification internationale (Int. Cl.³). C 07 F 9/22; A 61 K 31/66.

⑫② Date de dépôt..... 15 juin 1979, à 14 h 44 mn.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée :

④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 2 du 9-1-1981.

⑦① Déposant : A. NATTERMANN & CIE GMBH, résidant en RFA.

⑦② Invention de :

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Cabinet Regimbeau, Corre, Paillet, Martin et Schrimpf,
26, av. Kléber, 75116 Paris.

La présente invention concerne de nouveaux dérivés phospholipidiques.

Les phospholipides que l'on trouve dans la nature, qui peuvent être préparés à partir de jaunes d'oeufs, de haricots de soja, de colza, d'arachide ou de tournesol, sont toujours constitués d'un mélange de phospholipides chimiquement différents. Parmi ceux-ci, la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et les phosphatidylionistides sont en nombre les composants dominants. On sait depuis longtemps que la phosphatidylcholine ou les fractions phospholipidiques enrichies en phosphatidylcholine avec surtout des acides gras plusieurs fois insaturés ont une efficacité métabolique utile dans de nombreuses maladies comme l'artériosclérose, les hyperlipidémies ou le diabète. On ne connaît cependant actuellement d'effet de ce genre que pour le glycérine-phospholipides qui contiennent de la choline. En revanche, la phosphatidyléthanolamine ne présente aucun effet antiartériosclérotique ni antilipémique. Elle représente plutôt un composant des phosphatides qui peut provoquer des effets secondaires indésirables lorsqu'on utilise des phospholipides. On sait que le groupe amino primaire de ce phosphatide peut être acylé par un anhydride d'acide polycarboxylique (cf brevet allemand N° 721 002) pour obtenir de meilleures propriétés de solubilité. On connaît également par le brevet américain N° 2 791 594 l'acylation de mélanges contenant de la lécithine et par les brevets anglais N° 766 394 et 974 432 ainsi que la demande de brevet allemand N° 15 43 937 l'acylation des phosphatides avec l'anhydride de l'acide acétique. On a trouvé des composés N-acyle d'acide gras supérieur de la phosphatidyléthanolamine en plus faible quantité dans les glycérinephospholipides que l'on trouve dans la nature et surtout dans le mélange phospholipidique des haricots de soja. Il s'agit ici de mélanges de N-acyl-phosphatidyléthanolamine avec différents acides gras, où l'acide palmitique prédomine avec environ 65% en quantité.

On a trouvé de façon surprenante que l'on peut transformer des phosphatidyléthanolamines d'origine naturelle et synthétique par acylation avec l'acide oléique en nouvelles N-oléyl-phosphatidyléthanolamines qui présentent même à faible dose une action anti-artériosclérotique ou anti-lipémique pro-

noncés dans des expériences chez l'animal. Il faut considérer comme surprenant que ces effets ne s'observent nettement que pour les dérivés d'acide oléique de la phosphatidyléthanolamine et sont absents dans les composés correspondants qui dérivent des acides gras plusieurs fois insaturés ou des acides gras saturés de différentes longueurs de chaîne. Même le N-linoléate de phosphatidyléthanolamine ne présente qu'une action antilipémique modérée, bien que précisément les composés N-linolyles d'amines cycliques, comme par exemple le cyclohexyllinolamide, soient connus depuis longtemps comme substances faisant baisser les lipides. Les spécialistes ne pouvaient donc prévoir, et il n'a en aucune façon été suggéré, que l'on puisse préparer les N-oléyl-phosphatidyléthanolamines et rechercher leur effet antilipémique ou anti-artériosclérotique.

Pour préparer les dérivés N-oléyles selon l'invention, on peut dissoudre la phosphatidyléthanolamine pure ou des fractions phospholipidiques contenant de la phosphatidyléthanolamine, comme par exemple les phosphatides bruts ou les fractions phospholipidiques solubles ou insolubles dans l'alcool, dans un hydrocarbure aliphatique, cyclique ou chloré, ou le tétrahydrofurane ou le dioxanne, et après avoir ajouté des composés basiques, comme la triéthylamine, la pyridine ou des accepteurs d'acide de ce genre, et faire réagir avec le chlorure de l'acide oléique ou selon le procédé de l'anhydride avec l'acide oléique et l'acide chloroformique.

Ce qui est surtout particulièrement intéressant du point de vue économique est le fait que l'on puisse utiliser des fractions phosphatides contenant de la céphaline pour la préparation N-oléylique de la phosphatidyléthanolamine. On peut pour ce faire préparer facilement des mélanges phospholipidiques qui contiennent, outre la phosphatidylcholine biologiquement utile, les N-oléyl-phosphatidyl-éthanolamines de la présente demande et qui présentent à l'application orale une action lipémique et anti-artériosclérotique satisfaisante.

La recherche de l'effet antilipémique des dérivés phospholipidiques selon l'invention dans des expériences effectuées chez l'animal montre, effectuée avec des rats Sprague-

Dawley ou Wistar, aussi bien chez les animaux normaux que chez ceux qui sont atteints d'une hypercholestérolémie de triton selon le protocole expérimental de H. Schön et G. Berg, *Arzneimittelforschung* 7, 307 (1957), même pour une dose de 1 mg
5 de N-oléyl-phosphatidyléthanolamine selon l'invention par kg de poids corporel chez les rats traités un net abaissement des lipides totaux, surtout du cholestérol et des triglycérides du sérum par rapport aux animaux témoins non traités.

Afin de préparer une forme de présentation thérapeutique orale appropriée, on peut répartir dans des capsules
10 de gélatine molles les N-oléyl-phosphatidyléthanolamines selon l'invention après avoir ajouté par exemple de la vitamine E comme antioxydant, éventuellement, lorsqu'on a un mélange avec d'autres phospholipides, après avoir ajouté des mono-, di- ou
15 tri-glycérides d'acides gras naturels. Pour une application orale sous forme solide on peut avoir recours à une adsorption sur par exemple de l'Aerosil ou diverses cérites. Comme autres additifs pour la préparation de formes d'application solides, on peut utiliser, outre des antioxydants comme le tocophérol ou
20 l'acide ascorbique, le lactose, le carbonate de calcium et le stéarate de magnésium. Les préparations pharmaceutiques selon l'invention peuvent en outre contenir des colorants des aromates et des agents de conservation.

La dose de N-oléyl-phosphatidyléthanolamine à administrer quotidiennement dans une préparation pharmaceutique à
25 employer par voie orale doit se situer entre 100 et 2000 mg, cette quantité pouvant en règle générale s'administrer en plusieurs petites doses de 50 à 500 mg par exemple 2 à 4 fois par jour.

30 Les exemples suivants servent à illustrer plus précisément l'invention.

- EXEMPLE 1 -

On dissout dans 500 ml de toluène 100 g de phosphatidyléthanolamine chimiquement pure, préparée par séparation
35 au moyen d'une chromatographie sur colonne d'une fraction lécithine de soja insoluble dans l'alcool riche en phosphatidyl-

éthanolamine, sur gel de silice avec du chloroforme-méthanol comme éluant, et après avoir ajouté 38 ml de triéthylamine tout en agitant, on mélange avec une solution de 41,2 g de chlorure de l'acide oléique dans 60 ml de toluène.

5 Après avoir agité pendant 1 h à la température ambiante on sépare par filtration le chlorhydrate de triéthylamine précipité et on retire le solvant sous vide à une température de bain de 60°C dans une atmosphère d'azote. Il reste la N-oléyl-phosphatidyl-éthanolamine sous forme d'une huile jaune-brun visqueuse. Rendement 115 g = 96% de la quantité théorique. R_f de la N-oléyl-phosphatidyléthanolamine = 0,72 sur plaques G de gel de silice 60 F₂₅₄ (Fa. Merck), éluant chloroforme-méthanol-NH₄OH à 12,5% 70:25:5 (v/v/v).

15 - EXEMPLE 2 -

20 On dissout 19,3 g d'acide oléique dans 300 ml de tétrahydrofuranne et après avoir ajouté 9,5 ml de triéthylamine tout en agitant, on refroidit à 0°C. On mélange la solution avec 6,5 ml d'ester éthylique de l'acide chloroformique et au bout de 5 minutes avec une solution de 50 g de phosphatidyléthanolamine, préparée comme il est dit dans l'Exemple 1, dans 120 ml de tétrahydrofuranne. Après avoir ajouté 9,5 ml de triéthylamine on agite le mélange réactionnel pendant 1 h à la température ambiante, puis on sépare par filtration le chlorhydrate de triéthylamine précipité et on concentre la solution sous vide à une température de bain de 60°C. Il reste la N-oléyl-phosphatidyléthanolamine sous forme d'une huile jaune-brun visqueuse. Rendement 58 g = 97% de la quantité théorique.

30 - EXEMPLE 3 -

35 On dissout dans 800 ml de chloroforme 200 g d'une fraction phosphatide de soja soluble dans l'alcool, préparée par extraction répétée de phosphatide brut de haricot de soja déshuilé avec de l'éthanol à 40-60°C, et après avoir ajouté 25 ml de pyridine on mélange tout en agitant avec une solution de 16,4 g de chlorure de l'acide oléique dans 50 ml de chloro-

forme. Après avoir agité pendant 1 h à la température ambiante on extrait la solution réactionnelle en agitant avec 800 ml d'eau. On concentre la phase chloroforme après séchage avec du sulfate de sodium sous vide à 60°C de température du bain sous la protection d'un gaz inerte. Le mélange phosphatidique plas-

5 tique résultant est constitué d'environ 30% de N-oléyl-phosphatidyléthanolamine à côté d'environ 60% de phosphatidylcholine.

- EXEMPLE 4 -

10 On dissout dans 2500 ml de n-hexane 500 g d'une fraction phosphatide de soja insoluble dans l'alcool avec une teneur en phosphatidyléthanolamine d'environ 33%, comme elle se présente en tant que résidu dans la préparation de la fraction soluble dans l'alcool décrite dans l'Exemple 3, et après

15 avoir ajouté 47 ml de triéthylamine, on mélange tout en agitant avec une solution de 52 g de chlorure de l'acide oléique dans 75 ml de n-hexane. Après avoir agité pendant 1 h à la température ambiante on sépare par filtration le chlorhydrate de triéthylamine précipité et on concentre la solution sous vide à

20 60°C de température de bain. On extrait le résidu restant successivement, tout en agitant à la température ambiante, une fois avec 500 ml et deux fois avec 250 ml d'acétone. A partir des extraits réunis d'acétone on obtient après avoir retiré le solvant sous vide à 60°C de température de bain la N-oléyl-

25 phosphatidyléthanolamine à une concentration de 70% sous forme d'une huile jaune-brun visqueuse avec une teneur en phosphatidylcholine d'environ 25%. Rendement 240 g = 90% de la quantité théorique.

30 - EXEMPLE 5 -

a) Capsules remplies avec un liquide

On peut préparer de façon classique des capsules appropriées à l'administration orale en remplissant des capsules

35 de gélatine molle avec la N-oléyl-phosphatidyléthanolamine préparée selon l'invention, éventuellement en ajoutant de la vita-

mine E (par exemple 500 mg de N-oléyl-phosphatidyléthanolamine par capsule).

b) Capsules remplies à sec

- 5 En triturant la N-oléyl-phosphatidyléthanolamine avec de l'Aerosil on peut préparer un matériau pulvérulent et que l'on peut verser, qui convient pour être mis dans des capsules de gélatine dures :

	N-oléyl-phosphatidyléthanolamine	250 mg
10	Aerosil	250 mg

Les capsules ainsi préparées peuvent être utilisées dans le traitement de l'hyperlipémie et de l'athérosclérose, pour lequel on doit administrer régulièrement 1 à 2 capsules 2 à 4 fois par jour.

- 15 L'examen pharmacologique des dérivés phospholipidiques selon l'invention sur l'action antilipémique chez des animaux d'expérience a été effectué d'après les tests d'expérimentation suivants :

- 20 1- Test aigu au Triton selon Schön et Schurr chez le rat (application prophylactique en une seule fois)
Schön, H. und Berg, G. : Arzneimittelforschung 7, 307 (1957)

- Schurr, P. E. et al. : Lipids 7, 68 - 74 (1972)
Application orale de la substance à tester ; 24 h
25 plus tard application intrapéritonéale de Triton-WR 1339 (production d'une hyperlipémie) ; 48 h après application du Triton détermination des lipides dans le sérum. Exploitation par rapport aux témoins.

- 30 2- Test aigu au Triton selon Schön et Schurr chez le rat (application thérapeutique)

Bibliographie comme sous 1.

- Application intrapéritonéale de Triton-WR 1339 ; 1h
plus tard application de la substance à tester ; 48 après application du Triton détermination des lipides dans le sérum. Ex-
35 ploitation par rapport aux témoins.

3- Expérimentation biochimique (rats non agressés)

Fletcher, M. J. : Clin. Chim. Acta 22, 393 (1968).

Application orale de la substance à tester : 4 h
plus tard détermination des lipides dans le sérum. Exploitation
par rapport aux témoins.

5

Les résultats des tests des composés de l'inven-
tion par comparaison au Clofibrat sont rassemblés dans le
tableau suivant.

TABLEAU

Expérience	Composé selon l'invention (N-oléylcéphaline)	Clofibrate
1. Test aigu au Triton chez le rat (application prophylactique en une seule fois)	Lipides totaux Phospholipides Triglycérides Cholestérol total Cholestérol libre	Doses jusqu'à 250 mg/kg PC sans action Doses de 500 mg/kg PC : bonne action
2. Test aigu au Triton chez le rat (application thérapeutique en une seule fois)	Lipides totaux Triglycérides Cholestérol total Phospholipides Cholestérol libre	Abaissement depuis 250 mg/kg PC Abaissement depuis 250 mg/kg PC Aucun effet jusqu'à 500 mg/kg PC Abaissement depuis 500 mg/kg PC Aucun effet jusqu'à 500 mg/kg PC
3. Expérimentation biochimique (rats non agressés)	Lipides totaux Phospholipides Triglycérides Cholestérol total Cholestérol libre	Abaissement depuis 100 mg/kg PC non déterminé Abaissement depuis 50 mg/kg PC Abaissement depuis 50 mg/kg PC non déterminé
4. Toxicité aiguë	DL ₅₀ Souris DL ₅₀ Rat DL ₅₀ Rat	~ 2960 mg/kg PC ~ 1470 mg/kg PC ~ 1100 mg/kg PC ~ 681 mg/kg PC
5. Toxicité subchronique	Rat de 4 semaines Très faible dose toxique entre 250 et 1250 mg/kg PC	Rat de 13 semaines Très faible dose toxique entre 88 et 265 mg/kg PC

PC = poids corporel

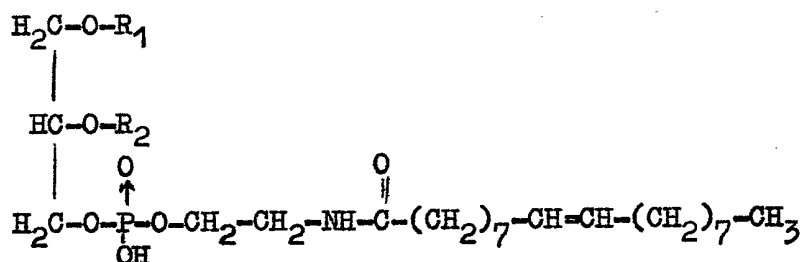
Comme le montre le Tableau, les composés de l'invention présentent chez tous les types d'animaux une action hypolipémique ou antihyperlipémique marquante, en partie dans un intervalle de dose très faible.

5 En revanche, on remarque pour le Clofibrate essentiellement une dose nettement plus élevée (en partie 100 à 500 fois plus élevée) pour atteindre des effets comparables.

 En plus de cela, les composés de l'invention présentent une toxicité aiguë et subaiguë beaucoup plus faible, ce
10 qui a pour conséquence une amélioration significative du domaine thérapeutique (cf le Tableau).

REVENDICATIONS

1) Dérivés N-oléyles de phosphatidyléthanamines naturelles et synthétiques de formule générale



où R^1 et R^2 représentent les radicaux d'acides gras à chaîne droite ou ramifiée, saturés ou insaturés, et surtout d'acides gras que l'on trouve dans la nature et qui ont de 12 à 22 atomes de carbone et une ou plusieurs doubles liaisons dans la molécule.

2) Procédé de préparation des dérivés N-oléyles de phosphatidyléthanamines selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on fait réagir des phosphatidyléthanamines synthétiques ou naturelles avec le chlorure d'acide ou l'anhydride de l'acide oléique en présence d'une base faible.

3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'on fait réagir les phosphatidyléthanamines en présence d'autres phospholipides synthétiques ou naturels.

4) Composition pharmaceutique à action antilipémique et antiartériosclérotique, caractérisée en ce qu'elle contient un composé selon la revendication 1, éventuellement avec d'autres phospholipides synthétiques ou que l'on trouve dans la nature chez les animaux et les plantes.

5) A titre de médicament, un composé selon la revendication 1.