

⑫ DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑭ Date de dépôt : 23.06.93.

⑮ Priorité :

⑯ Date de la mise à disposition du public de la demande : 30.12.94 Bulletin 94/52.

⑰ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑱ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑴ Demandeur(s) : CAILLOT Jean-Luc — FR, ZHAO Minjie — FR et JUNG Louis — FR.

⑵ Inventeur(s) : CAILLOT Jean-Luc, ZHAO Minjie et JUNG Louis.

⑶ Titulaire(s) :

⑷ Mandataire : Jung Louis.

⑸ Composés de synthèse associative d'acides aminés soufrés ou non soufrés avec des dérivés aminopyrimidiniques et amino pyridiniques aux propriétés capteurs de radicaux libres et aux propriétés vasodilatatrices.

⑹ De nouveaux composés de synthèse associative d'acides aminés soufrés ou non soufrés avec des dérivés aminopyrimidiniques et aminopyridiniques, ainsi que leurs sels d'addition avec des acides minéraux ou organiques en présence du groupement aminé, ont été synthétisés.

Des acides aminés non soufrés, tels par exemple, l'acide glutamique, l'acide pyroglutamique, la tyrosine, l'histidine, l'arginine et des acides aminés soufrés tels par exemple la méthionine, la cystéine, la S-méthylcystéine, la cystine ont été fixés sur le minoxidil avec obtention de dérivés mono-substitués et disubstitués.

Ces amides présentant une structure pyrimidinique ou pyridinique couplée à une structure amide, dont le carbonyle est d'origine amino-acide soufré ou non soufré présentent plusieurs propriétés:

1) une très bonne fixation au niveau de la peau, en particulier au niveau de l'épiderme.

2) la capture de radicaux libres, en particulier la capture de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle.

3) une relaxation sélective des fibres musculaires lisses

4) la croissance des kératinocytes in vitro et in vivo, et la pousse des cheveux chez l'homme et la repousse et l'accélération de la pousse des poils chez l'animal.



Composés de synthèse associative d'acides aminés soufrés ou non soufrés avec des dérivés aminopyrimidiniques et aminopyridiniques aux propriétés capteurs de radicaux libres et aux propriétés vasodilatatrices

M. CAILLOT Jean-Luc,
32 Rue du Moulin - 67205 OBERHAUSBERGEN

Mme. ZHAO Minjie,
119, Rte de Colmar - 67100 STRASBOURG

M. JUNG Louis.
205 Rte d'Oberhausbergen - 67200 STRASBOURG

Description

L'invention a pour objet des nouveaux composés de synthèse associative d'acides aminés soufrés ou non soufrés avec des dérivés aminopyrimidiniques et aminopyridiniques, ainsi que leurs sels d'addition avec des acides minéraux ou organiques en présence du groupement aminé, leurs procédés de préparation, 5 leurs activités pharmacologiques et les compositions pharmaceutiques les renfermant.

Actuellement le minoxidil molécule de base pour notre étude est connu pour les propriétés suivantes :

- il est utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle par réduction de la 10 pression artérielle résultant d'une relaxation sélective des fibres musculaires lisses des artéioles périphériques.

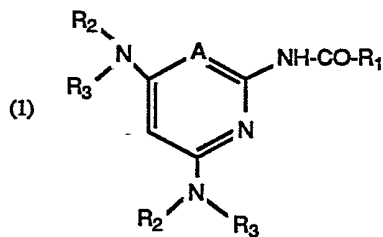
- d'autre part le minoxidil appliqué par voie topique stimule la croissance des kératinocytes in vitro et in vivo, et la pousse des cheveux, chez certains sujets présentant une alopecie androgénique. L'apparition de ce phénomène a lieu après environ 4 mois (ou davantage) d'utilisation du produit et varie en fonction des
 5 sujets. Le minoxidil lorsqu'il est appliqué par voie topique, n'est que faiblement absorbé: une quantité moyenne de 1,4% (pour des valeurs allant de 0,3 à 4,5%) de la dose appliquée parvient à la circulation générale.

Le mécanisme dans le cadre de la repousse des cheveux serait basé sur ses propriétés vasodilatatrices au niveau des artérioles périphériques du cuir chevelu.
 10 Cependant la repousse des cheveux nécessite un traitement prolongé; les cheveux formés sont fragiles et en particulier le poids moléculaire des kératines formées est plus petit que celui des poils normaux.

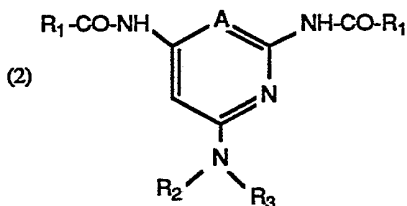
Les nouveaux composés, objet de l'invention ont un pouvoir capteur de radicaux libres plus élevé agissant comme tels et sont à l'origine de l'activité vasodilatatrice;
 15 ils présentent une pénétration cutanée et de rétention au niveau de l'épiderme nettement plus élevé.

Les composés originaux décrits pour la première fois et dont l'invention est ici revendiquée sont des dérivés des aminopyrimidines et des aminopyridines formules 1 à 6.

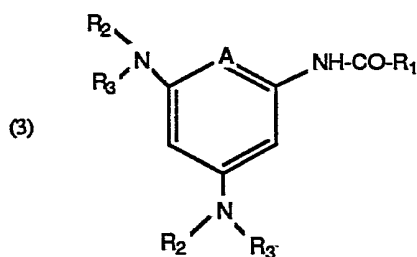
20



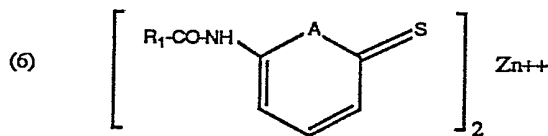
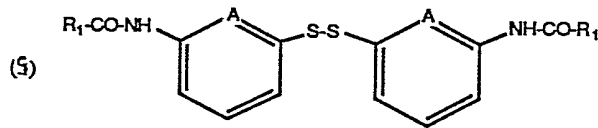
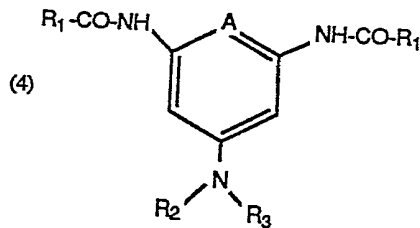
25



30

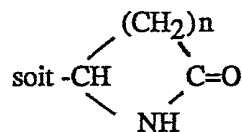
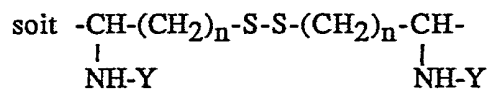
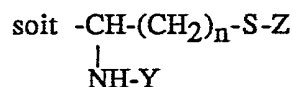
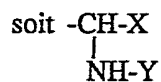


35



A peut-être soit un atome d'azote, soit un groupement N-oxyde de structure N^+-O^-

R1 peut être

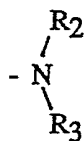


X et Y peuvent être l'hydrogène, un groupe alkyle linéaire, ramifié, éventuellement hydroxylé, un groupe aryle, un groupe alkylaryle, un groupe aminoalkyle, un groupe aminoaryle, un groupe carboxyalkyle, un groupe carboxyaryle.

Z peut être l'hydrogène, un groupe alkyle, un groupe aryle, n vaut 1 à 6, de préférence 1 ou 2.

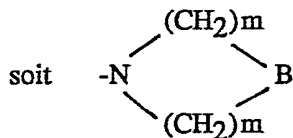
R2 et R3 peuvent être l'hydrogène, un groupe alkyle linéaire, ramifié, éventuellement hydroxylé, un groupe aryle, un groupe aminoalkyle, un groupe aminoaryle, un groupe hétérocyclique.

-CO-R1 peut être une structure peptidique comprenant deux ou plusieurs acides aminés dont les fonctions acides ou amines terminales ou ramifiées peuvent être libres ou engagés dans des groupements esters ou amides.



peut être une structure cyclique

5 soit - N $\bigcirc$ (CH₂)_n, n vaut préférentiellement 4 à 6



10 m vaut préférentiellement 2, B est un hétéroatome, préférentiellement un O, un NH ou amine substituée par un groupe alkyle linéaire, ramifié, éventuellement hydroxylé, un groupe aryle.

La fonction amine -NH-Y, Y étant un hydrogène, peut également exister sous forme de sels minéral ou organique, et sous forme d'amide soit pour Y la structure CO-R₄,

15 R₄ étant identique à R₂ en excluant l'hydrogène.

Ces amides dérivent de monoamino-, de diamino- et de triamino-pyrimidines et de monoamino-, de diamino- et de triamino-pyridines.

Ils résultent de la combinaison entre soit d'une amino-pyrimidine, soit d'une amino-pyridine et des acides aminés ou peptides non soufrés, tel par exemple, 20 l'acide glutamique, l'acide pyroglutamique, la tyrosine, l'histidine, l'arginine, la citrulline ou des acides aminés ou peptides soufrés tels la méthionine, la cystéine, la S-méthylcystéine, la S-benzylcystéine, la cystine, le glutathion, le glutathion oxydé.

Comme exemple nous pouvons citer la combinaison entre le minoxidil et des acides 25 aminés ou peptides non soufrés, tel par exemple, l'acide glutamique, l'acide pyroglutamique, la tyrosine, l'histidine, l'arginine, la citrulline ou des acides aminés ou peptides soufrés tels la méthionine, la cystéine, la S-méthylcystéine, la S-benzylcystéine, la cystine, le glutathion, le glutathion oxydé.

Les lazaroïdes, à substitution aminée en position 6 de la 2,4-diaminopyrimidine 30 (amine sous forme amine aromatique primaire) étant une pipérazine substituée par un 21-aminostéroïde non glucocorticoïde peuvent remplacer le minoxidil.

Les amides répondant aux formules 1 à 4 sont obtenus par combinaison entre une diaminopyrimidine et une diaminopyridine et une fonction carboxyle d'un acide aminé ou de peptide, conduisant à un dérivé monosubstitué ou à un dérivé 35 disubstitué. Comme diaminopyrimidine on peut utiliser le minoxidil conduisant à un dérivé monosubstitué ou à un dérivés disubstitué.

Ces amides présentant une structure pyrimidinique ou pyridinique couplée à une structure amide, dont le carbonyle est d'origine amino-acide ou peptidique soufré ou non soufré présentent plusieurs propriétés:

- 1) une très bonne fixation au niveau de la peau, en particulier au niveau de l'épiderme.
 - 2) la capture de radicaux libres, en particulier la capture de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle.
 - 5 3) une réduction de la pression artérielle résultant d'une relaxation sélective des fibres musculaires lisses et artérioles périphériques.
 - 4) la croissance des kératinocytes in vitro et in vivo, et la pousse des cheveux chez l'homme et la repousse et l'accélération de la pousse des poils chez l'animal.
- Les amides qui présentent des groupements aminoalkyles ou aminoaryles salifiés, par exemple sous forme de chlorhydrate, ou des sels organiques ou minéraux d'une fonction carboxylique libre sont solubles dans l'eau, les autres composés étant plutôt liposolubles.

Dans la présente description le terme "alkyle" désigne des groupes hydrocarbonés aliphatiques contenant 1 à 12 atomes de carbone, à chaîne droite ou ramifiée. On préfère les groupes alkyles inférieurs, c'est-à-dire les groupes alkyles contenant 1 à 4 atomes de carbone.

Le terme "aryle" désigne les groupes aromatiques non hétérocycliques du type phényle, phénole, benzyle et les homologues supérieurs, substitués ou non ainsi que les groupes aromatiques hétérocycliques ayant 2 à 7 atomes de carbone dans le cycle aromatique, et 1 à 4 hétéroatomes pouvant être l'oxygène, l'azote, le soufre, du type furane, pyridine, oxazole.

Le terme "aminoalkyle" désigne des groupes hydrocarbonés aliphatiques contenant 1 à 12 atomes de carbone et 1 à 3 atomes d'azote, à chaîne droite ou ramifiée. On préfère les groupements contenant 1 à 4 atomes de carbone et 1 atome d'azote.

Le terme "aminoaryle" désigne les substituants azotés de cycles aromatiques.

Le terme "sel minéral" désigne préférentiellement un sel soit de sodium, soit de potassium, soit de calcium.

Le terme de "sel organique" désigne préférentiellement un sel, obtenu par action d'une amine primaire ou secondaire ou tertiaire sur le groupement carboxylique ; on préfère soit un sel d'éthanolamine, soit un sel de pipéridine, soit un sel de pyrrolidine, soit un sel de pyridine ou leurs dérivés.

Le terme "carboxyalkyle" désigne un groupe hydrocarboné se terminant par une fonction carboxylique.

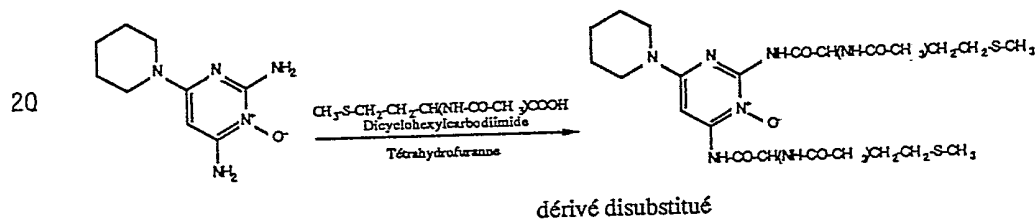
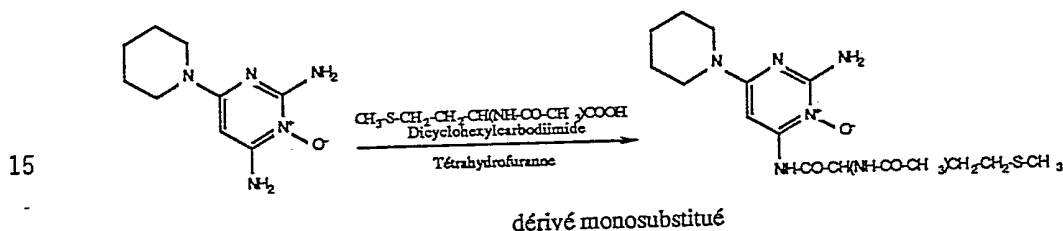
Le terme "carboxyaryle" désigne un groupe aromatique avec présence d'un substituant carboxylique.

Le terme "acide aminé" désigne l' α -alanine, l'arginine, l'asparagine, l'acide aspartique, la cystéine, la cystine, l'acide glutamique, la glutamine, le glycolle, l'histidine la δ -hydroxylysine, l'hydroxyproline, la leucine, l'isoleucine, la lysine, la méthionine, la norleucine, la phénylalanine, la proline, la sérine, la thréonine, le tryptophane, la tyrosine, la valine, la β -alanine, l'acide α -amino

n-butyrique, l'acide γ -amino n-butyrique, l'acide β -amino-isobutyrique, l'acide δ -amino-lévéulinique, l'acide carbamyl-aspartique, la citrulline, la créatine, la créatinine, l'ornithine, la taurine.

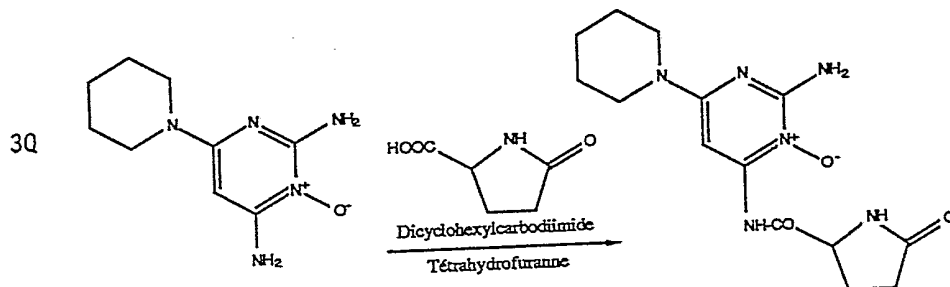
La préparation des amides correspond à faire réagir un acide aminé N-substitué, par exemple N-acétylé sur le ou les groupements aminés d'une aminopyrimidine et d'une aminopyridine au moyen d'un réactif de synthèse peptidique, par exemple le dicyclohexylcarbodiimide. Les exemples choisis sont ceux du minoxidil avec la N-acétyl D,L-méthionine et l'acide pyroglutamique

Synthèse associative du minoxidil et de la N-acétyl-D,L-méthionine



Les deux dérivés sont séparés par chromatographie

Synthèse associative du minoxidil et de l'acide pyroglutamique



35

Minoxidil monosubstitué et disubstitué par la N-acétyl-D,L-méthionine :

Dans un ballon rodé de 100 ml, dissoudre 0,5 g de minoxidil (0,0024 mole) dans 40 ml de tétrahydrofurane et laisser 5 minutes sous agitation. Ajouter 0,59 g de dicyclohexylcarbodiimide (0,0029 mole) puis 0,5 g de N-acétyl-D,L-méthionine (0,0026 mole). Laisser sous agitation à température ambiante pendant une heure sous une atmosphère d'argon.

Filtrer le mélange réactionnel, puis évaporer le filtrat sous pression réduite.

Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice. Le minoxidil monosubstitué et disubstitué sont élués par un mélange MeOH/CH₂Cl₂ (5/95) pour obtenir 0,20 g de minoxidil monosubstitué et 0,14 g de minoxidil disubstitué.

5 Les rendements sont respectivement de 20 et 10,5%.

Analyses :

- minoxidil monosubstitué :

Point de fusion : 138°C

CCM (CH₃OH, CH₂Cl₂ - 10/90) R_f : 0,72

10 : ¹H-RMN (DMSO) :

= 1,52 (m ; 6H ; CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N) ; 1,91 (s ; 3H ; CO-CH₃) ; 2,05 (s ; 3H ; S-CH₃) ; 2,07 (m ; 2H ; CH₂-CH₂-S-CH₃) ; 2,50 (m ; 2H ; CH₂-S-CH₃) ; 3,49 (m ; 4H ; CH₂-N-CH₂) ; 4,41 (m ; 1H ; CO-CH₂-NH) ; 6,9 (s ; 1H ; H_{arom.}) ; 7,19 (slarge ; 2H ; NH₂) ; 8,58 (d ; 1H ; NH-CO-CH₃) ; 10,94 (s ; 1H ; φ-NH-CO).

15

- minoxidil disubstitué :

Point de fusion : 228°C

CCM (CH₃OH, CH₂Cl₂ - 10/90) R_f : 0,94

¹H-RMN (DMSO) :

20 = 1,56 (m ; 6H ; CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N) ; 1,91 (s ; 6H ; CO-CH₃) ; 2,01 (m ; 4H ; CH₂-CH₂-S-CH₃) ; 2,05 (s ; 6H ; S-CH₃) ; 2,50 (m ; 4H ; CH₂-S-CH₃) ; 3,56 (m ; 4H ; CH₂-N-CH₂) ; 4,58 (m ; 2H ; CO-CH₂-NH) ; 7,25 (s ; 1H ; H_{arom.}) ; 8,50 (d ; 1H ; NH-CO-CH₃) ; 8,53 (d ; 1H ; NH-CO-CH₃) ; 10,53 (s ; 1H ; φ-NH-CO) ; 10,64 (s ; 1H ; φ-NH-CO).

Minoxidil monosubstitué par l'acide pyroglutamique :

25 Dans un ballon rodé de 100 ml, introduire 0,5 g de minoxidil (0,0024 mole) dans 40 ml de tétrahydrofurane et laisser 5 minutes sous agitation.

Ajouter 0,59 g de dicyclohexylcarbodiimide (0,0029 mole), puis 0,32 g d'acide pyroglutamique (0,0025 mole).

Après 1 heure le mélange est filtré. Le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le
30 résidu est repris par une solution d'acide chlorhydrique 1N et extrait au dichlorométhane. La phase aqueuse ainsi obtenue, après addition d'une quantité suffisante d'ammoniaque à 15%, est extraite au dichlorométhane. Cette solution est lavée plusieurs fois à l'eau. La phase organique est recueillie, séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est mis en suspension
35 dans de l'oxyde de diisopropyle chaud puis est filtré à chaud. On récupère sur le filtre 0,25 g de minoxidil monosubstitué sous forme d'une poudre blanche.

Le rendement est de 32%.

Analyses :

Point de fusion : 232°C

CCM (CH₃OH, CH₂Cl₂ - 10/90) R_f : 0,45

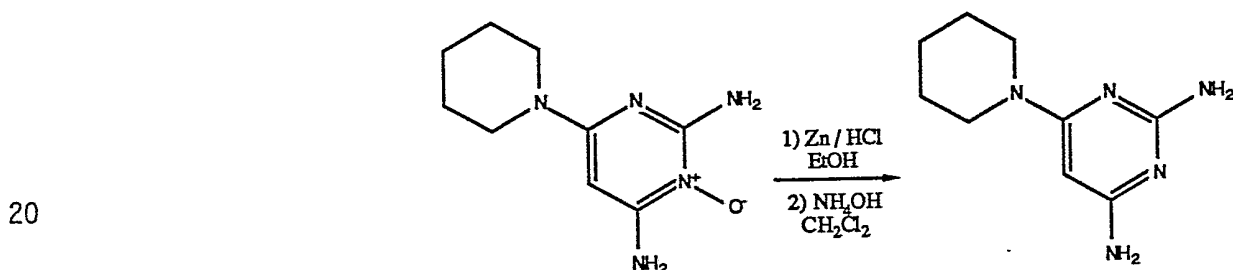
¹H-RMN (DMSO) :

d = 1,14 (m ; 2H ; CH₂-CH₂-CO) ; 1,57 (m ; 6H ; CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N) ; 2,17 (m ; 2H ; CH₂-CH₂-CO) ; 3,32 (m ; 4H ; CH₂-N-CH₂) ; 4,42 (m ; 1H ; CH-NH-CO) ; 5,56 (d ; 1H ; NH-CO-CH₂) ; 6,95 (s ; 1H ; Harom.) ; 7,20 (slarge ; 2H ; NH₂) ; 8,11 (s ; 1H ; NH-CO).

Il est également envisagé de faire réagir un acide aminé N-substitué, par exemple N-acétylé sur le ou les groupements aminés d'une aminopyrimidine N-oxyde et d'une aminopyridine N-oxyde au moyen d'un réactif de synthèse peptidique, par exemple le dicyclohexylcarbodiimide.

On peut transformer un dérivé aminopyrimidine N-oxyde et un dérivé aminopyridine N-oxyde en son amine correspondante en faisant réagir du zinc en milieu chlorhydrique en solution éthanolique.

15 Minoxidil réduit :



Ajouter à une solution de 0,5 g de minoxidil (0,0024 mole) dans 15 ml d'éthanol à 95% 15 ml d'un mélange d'acide chlorhydrique concentré et d'eau distillée (50/50).

25 On y additionne par fractions 1,569 g de poudre de zinc (0,024 mole). Laisser 30 minutes sous agitation puis filtrer l'excès de zinc. Evaporer l'alcool sous pression réduite et ajouter de l'eau distillée, puis alcaliniser avec un large excès d'ammoniaque concentrée, avant d'extraire par le dichlorométhane. Laver la phase organique à l'eau et la sécher sur sulfate de magnésium.

30 Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient un résidu huileux qui est cristallisé dans de l'oxyde de diisopropyle. Une recristallisation dans l'éthanol donne 0,14 g de minoxidil réduit.

Le rendement est de 26%.

Analyses :

35 Point de fusion : 118°C

CCM (CH₃OH, CH₂Cl₂ - 10/90) R_f : 0,40

¹H-RMN (CDCl₃) :

d = 1,56 (m ; 6H ; CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N) ; 3,49 (m ; 4H ; CH₂-N-CH₂) ; 4,29 (slarge ; 2H ; NH₂) ; 4,48 (slarge ; 2H ; NH₂) ; 5,15 (s ; 1H ; Harom.).

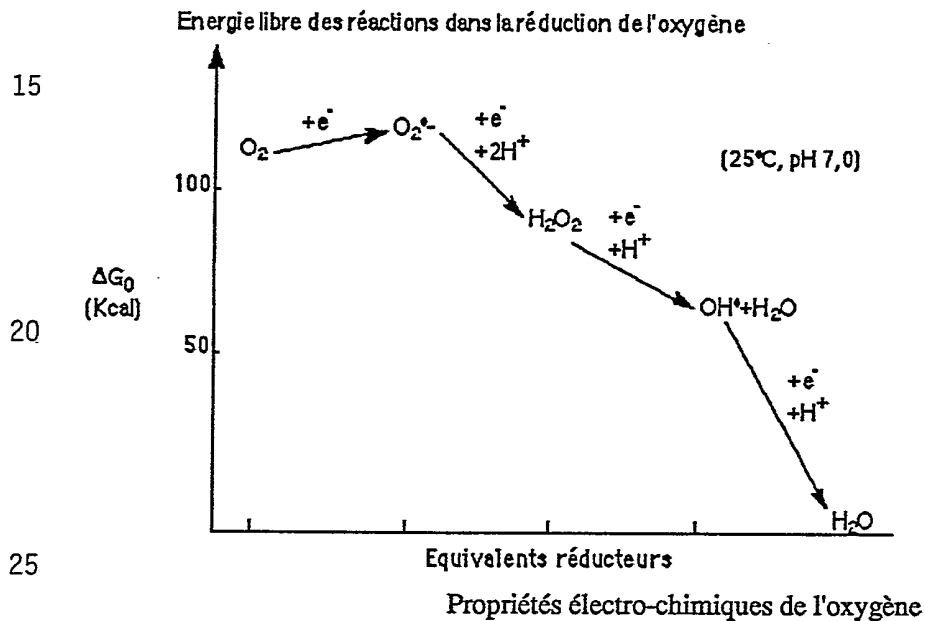
Les amides aminopyrimidine N-oxyde et aminopyridine N-oxyde peuvent être préparés en faisant réagir du perhydrol en solution éthanolique.

Les nouveaux produits décrits peuvent être utilisés comme médicament par voie générale par exemple comme anti-hypertenseur en combinaison avec des excipients, appropriés sous forme de comprimés, de gélules par exemple.

Ils peuvent également être utilisés dans des compositions dermopharmaceutiques ou cosmétologiques en combinaison avec un véhicule approprié, solution, émulsion, spray par exemple, le tout étant à appliquer à la surface de la peau de l'homme.

CAPTURES DES RADICAUX LIBRES (RL)

La formation des différentes espèces réactives de l'oxygène est présentée par le schéma suivant

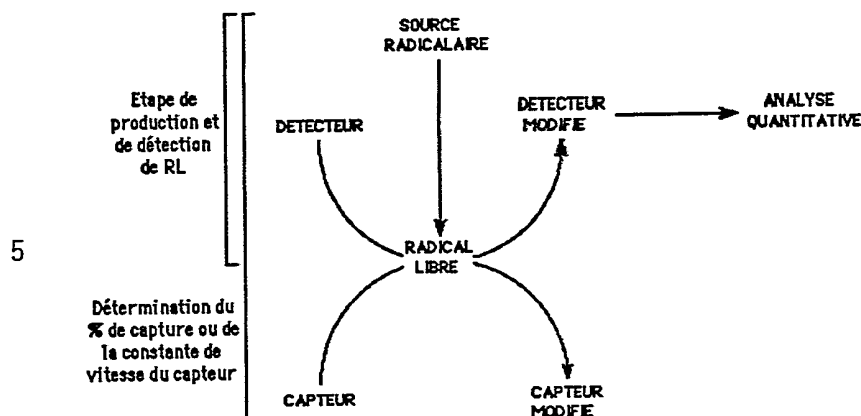


Etude de la capture de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle ($O_2^{\bullet-}$ et $OH^{\bullet}$).

Les méthodologies utilisées doivent former sélectivement un type de RL choisi (anion superoxyde ou radical hydroxyle). Le détecteur doit être capable de capter proportionnellement la totalité des RL formés.

Schéma général de la quantification de la capture de radicaux libres :

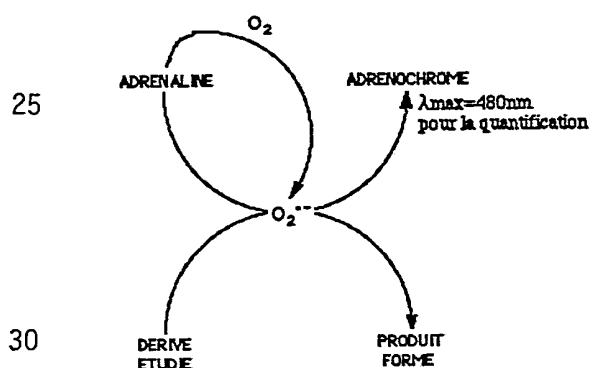
Etape de production et de détection de RL : la source radicalaire fournit le radical libre qui va réagir avec un détecteur pour former un détecteur modifié. Ce dernier pourra être quantifié directement ou après interaction avec un complément de réactif analytique par une analyse spectrophotométrique.



Détermination soit du pourcentage de capture soit de la constante de vitesse du capteur : un capteur va entrer en compétition avec le détecteur pour former un capteur modifié. On obtient un abaissement de la quantité de détecteur modifié qui va nous donner, après une analyse mathématique, soit la constante de vitesse de la réaction du capteur avec le radical, soit le pourcentage de captation de ce radical par le capteur.

Capture de l'anion superoxyde

La méthodologie est l'auto-oxydation de l'adrénaline : l'adrénaline joue le double rôle de producteur de l'anion superoxyde et de détecteur. L'adrénaline stable à pH acide, s'oxyde de manière spontanée à pH alcalin. Cette réaction complexe donne après plusieurs étapes l'adrénochrome. L'anion superoxyde y participe comme agent oxydant. La formation d'adrénochrome est suivie à 480 nm.



Capture de l'anion superoxyde : oxydation de l'adrénaline

Le milieu réactionnel est constitué de 3,1 ml de carbonate sodique (0,05 M) à pH 10,2 contenant de l'EDTA (0,1 mM). La réaction d'oxydation est initiée par l'addition de 0,2 ml d'adrénaline (0,01 M, dans HCl 0,01N). La formation d'adrénochrome est suivie pendant 2 minutes à 480 nm. Les composés à étudier sont ajoutés à l'aide de 0,02 ml de DMSO, avant l'addition de l'adrénaline.

La capacité des substances à capter l'anion superoxyde est exprimée en terme de pourcentage d'inhibition (%I).

$$A_0 - A$$

$$\%I = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$

$$A_0$$

A_0 et A sont respectivement l'absorbance du détecteur modifié en absence et en présence du dérivé étudié.

% d'inhibition de la superoxyde-dismutase (SOD)

SOD ($\mu\text{g/ml}$)	33,3	83,3	133,6	166,6	217,1
% d'inhibition	20	37,93	48,39	60,71	66,67

% d'inhibition de la cystéine

cystéine (mM)	0,005	0,008	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07
% d'inhibition	6,52	8,58	9,61	21,12	31,72	34,45	46,71	51,93	57,17

% d'inhibition du minoxidil, des dérivés monosubstitué et disubstitué de la N-acétyl-méthionine

Dérivés	Conc. (mM)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
minoxidil		11,71	25,62	41,86	57,20	-	74,12	82,70	-
monosubstitué (N-acétyl-méthionine)		-	7,57	14,49	19,38	25,71	27,17	32,01	-
disubstitué (N-acétyl-méthionine)		-	10,56	15,62	25,99	30,77	38,71	43,75	53,22

La méthode de production et de détection de l'anion superoxyde est validée par la SOD qui est l'enzyme spécifique de la dégradation de l'anion superoxyde.

A part la SOD, la cystéine est connue comme la plus réactive vis à vis de l'anion superoxyde.

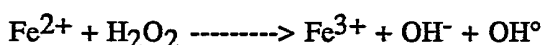
La concentration à laquelle on obtient 50% d'inhibition est de l'ordre de 0,051 mM pour la cystéine, de 0,25 mM pour le minoxidil et de 0,67 mM pour le composé disubstitué avec la N-acétyl-méthionine. Le composé monosubstitué à la concentration 0,6 mM, l' inhibition est de 32%.

A la concentration de 0,6 mM en N-acétyl-méthionine nous n'avons pas observé d'activité. Ce n'est qu'à 2 mM que nous observons une inhibition de 10%.

Les exemples faisant l'objet de cette étude montrent un pouvoir capteur de l'anion superoxyde identique à celui du minoxidil, mais leur intérêt vient du fait d'une pénétration cutanée plus importante de plus de 10 fois.

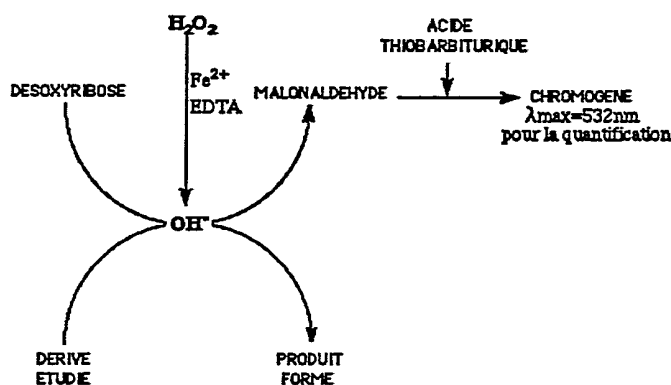
15 Capture du radical hydroxyle

La réaction de Fenton, la décomposition catalytique du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'action du Fe^{2+} a été utilisée pour produire le radical hydroxyle.



Comme le radical hydroxyle a une durée de vie très courte il faut pour pouvoir le détecter une méthode indirecte.

En raison de sa large utilisation, le test de dégradation oxydative du déoxyribose a été choisi pour notre étude. Le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton dégrade le déoxyribose et produit le malonaldehyde qui forme un complexe coloré avec l'acide thiobarbiturique. Ce complexe est quantifié par colorimétrie à la longueur d'onde de 532 nm. Cette méthodologie peut être représentée par le schéma suivant



Dans la littérature les résultats sont présentés le plus souvent en pourcentage d'inhibition et comparés avec des capteurs connus (mannitol par exemple), mais chaque fois que l'on peut on utilise les constantes de vitesse.

Les constantes de vitesse ont été déterminées en utilisant la méthode de Halliwell avec des modifications. L'équation cinétique finale est la suivante

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} \left(1 + \frac{k_s \cdot S}{k_d \cdot D + k_x} \right)$$

A et A₀ absorbances à 532 nm du complexe en présence et en absence du dérivé étudié.

k_s et k_d constantes de vitesse de la réaction du OH° avec le dérivé étudié et le déoxyribose.

S et D concentrations de dérivé étudié et de déoxyribose.

k_x terme représentant la réactivité du radical OH° réagissant avec les réactifs de la réaction de Fenton.

En traçant la droite 1/A en fonction de la concentration S, la constante de vitesse k_s est déterminée. Les valeurs des constantes de vitesse obtenues sont :

Composés	k obtenues (10 ⁹ . M ⁻¹ .s ⁻¹)	k moyennes (10 ⁹ . M ⁻¹ .s ⁻¹)	k littératures (10 ⁹ . M ⁻¹ .s ⁻¹)	Nombre d'essais
Mannitol	1,52-1,84	1,68	1,8(15)	2
Méthionine	5,02-5,36	5,19	6,5(16)	2
N-acétyl-méthionine	5,52-5,83 6,70	6,02	6,7(17)	3
Minoxidil	10,20-11,40	10,80	-	2
Minoxidil réduit	8,47-9,16	8,81	-	2
Monosubstitué (N-acétyl-méthionine)	13,10-13,40	13,25	-	2
Disubstitué (N-acétyl-méthionine)	19,40-19,50	19,45	-	2

La méthode de production et de détection du radical hydroxyle est validée par comparaison des constantes de vitesse obtenues avec celles de la littérature (mannitol, méthionine et N-acétyl-méthionine).

Le mannitol est connu comme étant un bon capteur du radical hydroxyle, sa constante de vitesse est de $1,8.10^9 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

Les nouveaux dérivés synthétisés possèdent une constante de vitesse plus grande par rapport au mannitol allant de 5 fois (minoxidil réduit) jusqu'à 11 fois plus (disubstitué) et une pénétration cutanée nettement plus importante de plus de 10 fois.

10 Capture du radical hydroxyle

Le milieu d'incubation est constitué de 2-déoxyribose (0,6 mM), de H_2O_2 (0,85 mM) et de l'acide thiobarbiturique (0,6 mM) dans 3 ml de tampon phosphate pH 7,4 (0,024 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - 0,15 M NaCl). La réaction est initiée par l'addition du complexe Fer/EDTA (0,13 mM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$; 0,143 mM EDTA).

15 Après 15 minutes d'incubation à 37°C , la réaction est arrêtée par l'addition de 1,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) froid (2,8%).

1 ml de cette solution est mélangé avec 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) (1% dans 0,05 M NaOH) et chauffés pendant 15 minutes à 100°C . Ensuite, les échantillons sont refroidis et quantifiés à 532 nm.

20

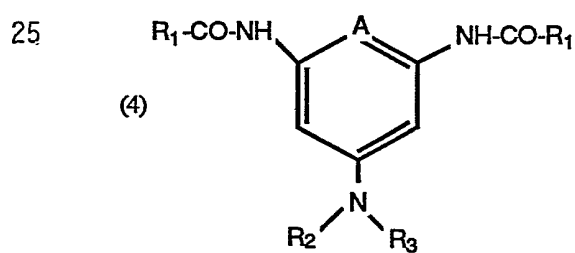
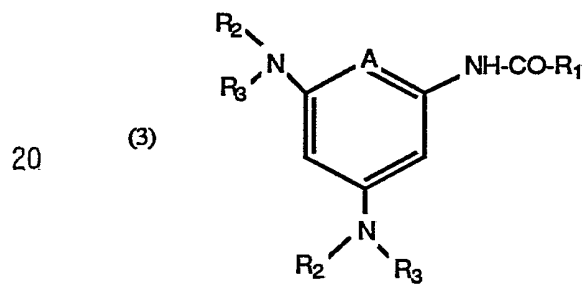
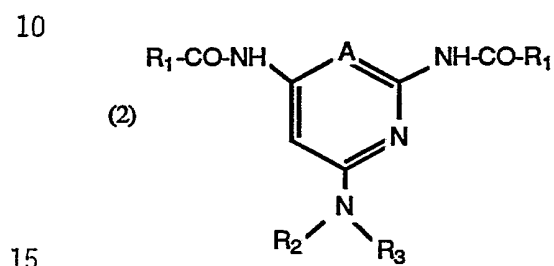
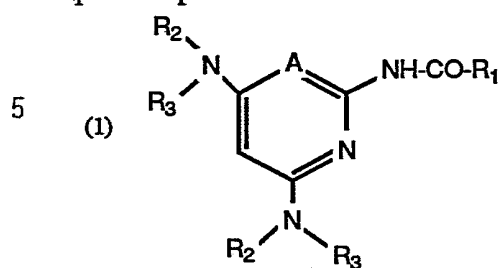
25

30

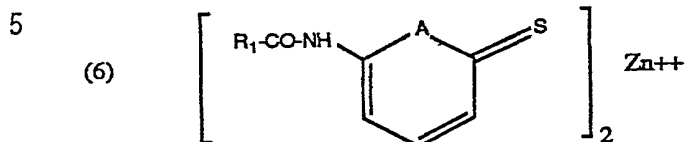
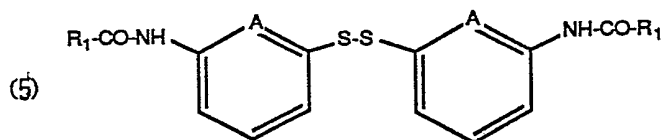
35

REVENDICATIONS

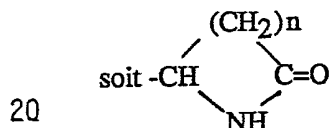
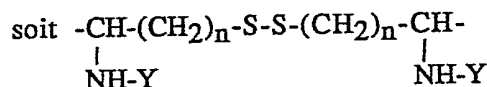
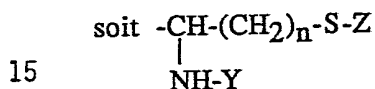
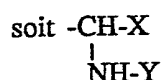
1. Amides dérivant des aminopyrimidines et des aminopyridines caractérisés en ce qu'ils répondent aux formules 1 à 6.



16



10 A peut-être soit un atome d'azote, soit un groupement N-oxyde de structure $N^{\pm}-O^{-}$
 R1 peut être



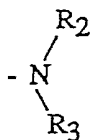
25 X et Y peuvent être l'hydrogène, un groupe alkyle linéaire, ramifié, éventuellement hydroxylé, un groupe aryle, un groupe alkylaryle, un groupe aminoalkyle, un groupe aminoaryle, un groupe carboxyalkyle, un groupe carboxyaryle.

Z peut être l'hydrogène, un groupe alkyle, un groupe aryle,
 n vaut 1 à 6, de préférence 1 ou 2.

30 R₂ et R₃ peuvent être l'hydrogène, un groupe alkyle linéaire, ramifié, éventuellement hydroxylé, un groupe aryle, un groupe aminoalkyle, un groupe aminoaryle, un groupe hétérocyclique.

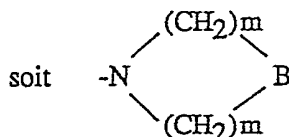
-CO-R₁ peut être une structure peptidique comprenant deux ou plusieurs acides aminés dont les fonctions acides ou amines terminales ou ramifiées peuvent être libres ou engagés dans des groupements esters ou amides.

-17



peut être une structure cyclique

5 soit - N $\bigcirc$ (CH₂)_n, n vaut préférentiellement 4 à 6



10 m vaut préférentiellement 2, B est un hétéroatome, préférentiellement un O, un NH ou amine substituée par un groupe alkyle linéaire, ramifié, éventuellement hydroxylé, un groupe aryle.

La fonction amine -NH-Y, Y étant un hydrogène, peut également exister sous forme de sels minéral ou organique, et sous forme d'amide soit pour Y la structure
15 CO-R₄, R₄ étant identique à R₂ en excluant l'hydrogène.

2. Amides selon la revendication 1, dérivant de monoamino-, de diamino- et de triamino-pyrimidines et de monoamino-, de diamino- et de triamino-pyridines.

3. Amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 2 dus à la combinaison entre une amino-pyrimidine et des acides aminés ou peptides non soufrés, tel par
20 exemple, l'acide glutamique, l'acide pyroglutamique, la tyrosine, l'histidine, l'arginine, la citrulline ou des acides aminés ou peptides soufrés tels la méthionine, la cystéine, la S-méthylcystéine, la S-benzylcystéine, la cystine, le glutathion, le glutathion oxydé.

4. Amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 2 dus à la combinaison entre une amino-pyridine et des acides aminés ou peptides non soufrés, tel par
25 exemple, l'acide glutamique, l'acide pyroglutamique, la tyrosine, l'histidine, l'arginine, la citrulline ou des acides aminés ou peptides soufrés tels la méthionine, la cystéine, la S-méthylcystéine, la S-benzylcystéine, la cystine, le glutathion, le glutathion oxydé.

5. Amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 dus à la combinaison entre le minoxidil et des acides aminés ou peptides non soufrés, tel par exemple,
30 l'acide glutamique, l'acide pyroglutamique, la tyrosine, l'histidine, l'arginine, la citrulline ou des acides aminés ou peptides soufrés tels la méthionine, la cystéine, la S-méthylcystéine, la S-benzylcystéine, la cystine, le glutathion, le glutathion oxydé.
35

18

6. Amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 dus à la combinaison entre des lazaroïdes, la substitution aminée en position 6 de la 2,4-diaminopyrimidine étant une pipérazine substitué par un 21-aminostéroïde non glucocorticoïde et des acides aminés ou peptides non soufrés, tel par exemple, l'acide glutamique, l'acide pyroglutamique, la tyrosine, l'histidine, l'arginine, la citrulline ou des acides aminés ou peptides soufrés tels la méthionine, la cystéine, la S-méthylcystéine, la S-benzylcystéine, la cystine, le glutathion, le glutathion oxydé.
7. Amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 répondant aux formules 1 à 4 dus à la combinaison entre une diaminopyrimidine et une diaminopyridine et une fonction carboxyle d'un acide aminé ou de peptide, conduisant à un dérivé monosubstitué ou à un dérivés disubstitué.
8. Amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 et 5 et 7 répondant à la formule 2 dus à la combinaison entre le minoxidil et une fonction carboxyle d'acide aminé ou de peptide, conduisant à un dérivé monosubstitué ou à un dérivé disubstitué.
9. Amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 présentant une structure pyrimidinique ou pyridinique couplée à une structure amide, dont le carbonyle est d'origine amino-acide ou peptidique, ces structures permettant une très bonne fixation au niveau de la peau, en particulier au niveau de l'épiderme.
10. Amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 présentant une structure pyrimidinique ou pyridinique couplée à une structure amide dont le carbonyle est d'origine amino-acide ou peptidique présentant par ailleurs des groupements soufrés, ces structures permettant une très bonne fixation au niveau de la peau, en particulier au niveau de l'épiderme.
11. Amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 présentant une structure pyrimidinique ou pyridinique couplée à une structure amide, dont le carbonyle est d'origine amino-acide ou peptidique, ces structures permettant une capture de radicaux libres, en particulier la capture de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle.
12. Amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 présentant une structure pyrimidinique ou pyridinique couplée à une structure amide dont le carbonyle est d'origine amino-acide ou peptidique présentant par ailleurs des groupements soufrés, ces structures permettant une capture de radicaux libres, en particulier la capture de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle.

13. Amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 présentant une structure pyrimidinique ou pyridinique couplée à une structure amide, dont le carbonyle est d'origine amino-acide ou peptidique, ces structures permettant une réduction de la pression artérielle résultant d'une relaxation sélective des fibres musculaires lisses et artérioles périphériques.
14. Amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 présentant une structure pyrimidinique ou pyridinique couplée à une structure amide dont le carbonyle est d'origine amino-acide ou peptidique présentant par ailleurs des groupements soufrés, ces structures permettant une réduction de la pression artérielle résultant d'une relaxation sélective des fibres musculaires lisses et artérioles périphériques .
15. Amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 présentant une structure pyrimidinique ou pyridinique couplée à une structure amide, dont le carbonyle est d'origine amino-acide ou peptidique, ces structures permettant la croissance des kératinocytes in vitro et in vivo, et la pousse des cheveux chez l'homme et la repousse et l'accélération de la pousse des poils chez l'animal.
16. Amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 présentant une structure pyrimidinique ou pyridinique couplée à une structure amide dont le carbonyle est d'origine amino-acide ou peptidique présentant par ailleurs des groupements soufrés, ces structures permettant la croissance des kératinocytes in vitro et in vivo, et la pousse des cheveux chez l'homme et la repousse et l'accélération de la pousse des poils chez l'animal.
17. Amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 contenant des groupements aminoalkyles ou aminoaryles salifiés, par exemple sous forme de chlorhydrate, ou des sels organiques ou minéraux d'une fonction carboxylique libre pour ajouter une nouvelle propriété d'hydrosolubilité, les autres composés étant plutôt liposolubles.
18. Procédé pour l'obtention des amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir un acide aminé N-substitué, par exemple N-acétylé sur le ou les groupements aminés d'une aminopyrimidine et d'une aminopyridine au moyen d'un réactif de synthèse peptidique, par exemple le dicyclohexylcarbodiimide.
19. Procédé pour l'obtention des amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir un acide aminé N-substitué, par exemple N-acétylé sur le ou les groupements aminés d'une aminopyrimidine N-oxyde et d'une aminopyridine N-oxyde au moyen d'un réactif de synthèse peptidique, par exemple le dicyclohexylcarbodiimide.

20. Procédé pour l'obtention des amides selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 caractérisé en ce qu'il consiste à transformer un dérivé aminopyrimidine N-oxyde et un dérivé aminopyridine N-oxyde en son amine correspondante en faisant réagir du zinc en milieu chlorhydrique en solution éthanolique.
- 5 21. Procédé pour l'obtention des amides aminopyrimidine N-oxyde et aminopyridine N-oxyde selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 caractérisé en ce qu'il consiste à transformer l'amine hétérocyclique en faisant réagir du perhydrol en solution éthanolique.
22. Produits selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 utilisés comme
10 médicament par voie générale par exemple comme anti-hypertenseur en combinaison avec des excipients appropriés sous forme de comprimés, de gélules par exemple.
23. Produits selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 utilisés dans des compositions dermopharmaceutiques ou cosmétologiques en combinaison avec un
15 véhicule approprié, solution, émulsion, spray par exemple, le tout étant à appliquer à la surface de la peau de l'homme.

INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE

PRELIMINAIRE

de la
PROPRIETE INDUSTRIELLEétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 486772
FR 9307821

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	GB-A-2 175 901 (SERONO OTC) * page 1 - page 4 * ---	1, 5, 19-23
A	WO-A-86 00616 (BAZZANO) * revendications * -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)
		C07D A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
7 Mars 1994		Francois, J
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		