

Brevet N°	8 3 7 3 9	GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG
du	5 novembre 1981	
Titre délivré :	1 8 FEB 1982	



Monsieur le Ministre
de l'Économie et des Classes Moyennes
Service de la Propriété Intellectuelle
LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

La société dite : AUSONIA FARMACEUTICI s.r.l., Via Laurentina (1)
Km 24730, 00040 POMEZIA (Rome) (Italie), représentée par
Monsieur Jacques de Muyser, agissant en qualité de mandataire (2)

dépose(nt) ce cinq novembre 1981 quatre vingt et un (3)
à 15 heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg :

"α-(3,4,5-triméthoxybenzoylthio) propionylglycine, son (4)
procédé de préparation et compositions pharmaceutiques la
contenant."

2. la délégation de pouvoir, datée de Pomezia le 22.10.1981
3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires;
4. // planches de dessin, en deux exemplaires;
5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,
le 5 novembre 1981

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :
- Leonardo DE VINCENTIIS, Via Laurentina Km 24.730 (5)
POMEZIA (Rome), Italie

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de
(6) brevet déposée(s) en (7) Italie
le 11 novembre 1980 No. 25883 A/80 (8)

au nom de la déposante (9)

élit(é lisent) pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg
35, boulevard Royal (10)

sollicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les
annexes susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à / mois. (11)

Le mandataire

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des
Classes Moyennes, Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du :

5 novembre 1981

à 15 heures



Pr. le Ministre
de l'Économie et des Classes Moyennes,

P.

REVENDEICATION DE LA PRIORITE

de la demande de brevet / du modèle d'utilité

En ITALIE

Du 11 novembre 1980

Mémoire Descriptif

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

au

Luxembourg

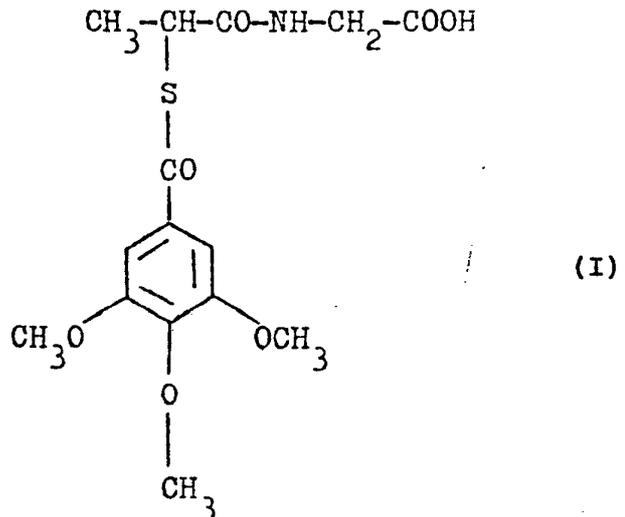
au nom de : AUSONIA FARMACEUTICI s.r.l.

pour : " α -(3,4,5-triméthoxybenzoylthio) propionylglycine, son procédé de préparation et compositions pharmaceutiques la contenant."

α -(3,4,5-Triméthoxybenzoylthio)propionylglycine,
son procédé de préparation

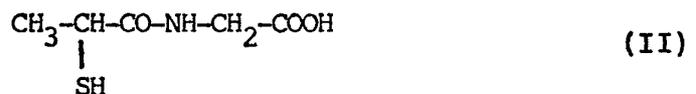
et compositions pharmaceutiques la contenant.

5 La présente invention concerne un nouveau composé, à savoir précisément l' α -(3,4,5-triméthoxybenzoylthio)propionylglycine, de formule (I)



15 L'invention concerne en outre un procédé pour la préparation du composé (I). Enfin, l'invention vise les compositions pharmaceutiques contenant comme principe actif, le composé (I), notamment adaptées au traitement des bronchopathies aiguës et chroniques, des hépatopathies et des séquelles d'intoxications.

25 On sait que la 2-mercaptopropionylglycine



30 possède une activité pharmacologique notable, qui la rend propre, en tant qu'hépatoprotecteur, au traitement des hépatopathies aiguës et chroniques et des séquelles d'intoxications. On sait toutefois aussi que la 2-mercaptopropionylglycine présente une faible stabilité, tant à l'état de poudre sèche qu'en solution, non seulement lorsqu'on la conserve dans des conditions ambiantes particulières et défavorables telles qu'une température élevée, un taux
35 d'humidité élevé ou une exposition à la lumière, mais également dans des conditions normales, à bas taux d'humidité relatif et à la température ambiante.

Cette mauvaise stabilité du produit, qui se manifeste déjà après une durée de conservation relativement brève, conduit à certains inconvénients, parmi lesquels le plus grave est sans aucun doute constitué par l'altération des caractéristiques organoleptiques, avec formation d'une odeur et d'une saveur réellement désagréables.

Cette caractéristique entraîne des effets psychologiques négatifs au niveau du patient et se répercute également sur les propriétés thérapeutiques de la formulation.

On a maintenant trouvé conformément à l'invention que l' α -3,4,5-triméthoxybenzoylthio)propionylglycine, de formule (I) représentée ci-dessus, outre le fait qu'elle est dotée d'une stabilité notablement supérieure à celle du composé (II) et qu'elle possède des caractéristiques pharmacologiques optimales qui la rendent aussi adaptée au traitement des hépatopathies aiguës et chroniques ainsi que des séquelles d'intoxications, présente également une activité protectrice dans la bronchite subaiguë et chronique considérablement supérieure à celle de l' α -mercaptopropionylglycine.

En outre, au cours de l'expérimentation, on a constaté une tolérance clinique optimale au niveau gastrique du composé (I), cette tolérance étant due à la stabilité du produit, et par suite à l'absence d'odeur et de saveur désagréables.

Conformément à l'invention, on prépare le composé (I) en faisant réagir le chlorure de 3,4,5-triméthoxybenzoyle avec la 2-mercaptopropionylglycine, en milieu aqueux et en présence d'une base, par exemple un carbonate ou bicarbonate d'un métal alcalin, en particulier de potassium ou de sodium.

L'exemple suivant illustre l'invention sans nullement la limiter.

35 EXEMPLE

On ajoute 21,8 g de chlorure de 3,4,5-triméthoxybenzoyle, sous agitation, à une solution contenant 18,0 g de 2-mercaptopropionylglycine et 40 g de K_2CO_3 dans 100 cm³ de

H₂O. On maintient l'agitation jusqu'à la disparition complète du chlorure, puis on amène à pH d'environ 3 avec H₂SO₄ à 10 %. On recueille sur un filtre le précipité qu'on lave avec de l'eau et fait cristalliser dans l'éthanol.
5 P.f. 175-177°C.

La structure du composé est confirmée par les valeurs analytiques et spectroscopiques (IR et RMN). Le composé obtenu a l'aspect d'une poudre blanche microcristalline, inodore et quasi sans saveur. Il est soluble dans une solution saturée de bicarbonate de sodium et dans d'autres solutions basiques. Il est insoluble dans l'eau mais soluble à chaud dans l'éthanol.
10

Les caractéristiques pharmaco-toxicologiques du composé (I) ressortent des observations expérimentales décrites ci-après. Pour raison de brièveté, on désignera, dans ce qui suit, le composé de l'invention par le sigle TBPG.
15

TOXICITE AIGUE

On étudie la toxicité aiguë en utilisant des souris albinos Swiss et des rats albinos Wistar, des deux sexes.
20

On administre le produit par voie orale et par voie endopéritonéale, la durée d'observation étant de 10 jours à partir du traitement. Les valeurs des DL₅₀ ainsi que les limites de confiance relatives de 95 %, calculées par la méthode des probits, sont rassemblées dans le Tableau I.
25

TABLEAU I - Toxicité aiguë chez la souris et chez le rat

Espèces	Voie d'administration	Nbre d'animaux	Dose mg/kg	Nbre animaux morts	% de morts	DL ₅₀ mg/kg (limites de confiance)
Souris	orale	20	3000	1	5	4863 (4539 - 5254)
		20	4000	6	30	
		20	5000	10	50	
		20	6000	15	75	
		20	7000	18	90	
	i.p.	20	1500	0	0	2534 (2192-2963)
		20	2000	8	40	
		20	2500	10	50	
		20	3000	13	65	
		20	3500	18	90	
Rats	orale	20	3000	1	5	5321 (4879-5873)
		20	4000	6	30	
		20	5000	9	45	
		20	6000	12	60	
		20	7000	17	85	
	i.p.	20	1500	0	0	2666 (2483-2887)
		20	2000	6	30	
		20	2500	9	45	
		20	3000	14	70	
		20	3500	17	85	

TOXICITE SUBCHRONIQUE

Le traitement par voie rectale de lièvres femelles ou hases pendant huit semaines consécutives avec la TBPG (2 suppositoires/jour/animal, soit 400 mg/kg) ne révèle pas d'anomalies du comportement et de la croissance corporelle des animaux.

De même, les expertises hématologiques, hématochimiques et celles des fonctions hépatiques et rénales, ainsi que les examens d'autopsie et les contrôles macro- et microscopiques des principaux organes, ne mettent pas en évidence des variations par rapport à la norme.

TOXICITE CHRONIQUE

On évalue la toxicité chronique de la TBPG chez le rat et chez le chien traités pendant 24 semaines avec le composé de l'invention à raison de 125 et 250 mg/kg par voie orale et 200 mg/kg par voie inhalatoire.

Le traitement se révèle absolument inoffensif en ce

que l'on n'observe pas de signes d'altération du comportement et que la mortalité s'avère nulle. De même, les autres paramètres considérés, tels que la croissance corporelle, les examens hématologiques et hématochimiques, les épreuves de fonctionnalités hépatique et rénale et les examens macro- et microscopiques des principaux organes, ne permettent pas de relever des altérations dignes d'être mentionnées, lesquelles entrent toutes dans le cadre de la normale.

10 TOXICITE FOETALE

On étudie la toxicité foetale de la TBPG chez le rat albinos Sprague-Dawley et chez le lapin Nouvelle Zélande. Chez le rat, aussi bien mâle que femelle, on commence le traitement 4 semaines après l'accouplement, puis on le poursuit, chez les femelles seulement, pendant les 20 jours de la gestation.

Chez les lapines, on effectue le traitement pendant les 28 jours de la gestation.

L'administration quotidienne de la TBPG par voie orale et par voie sous-cutanée aux doses de 250 et 500 mg/kg ne provoque aucune malformation foetale et à peine une influence sur le nombre et le poids des nouveaux-nés vivants.

PHARMACODYNAMIQUE

La TBPG montre jusqu'aux doses de 50 mg/kg i.v., une tolérance optimale chez le chat anesthésié.

En effet, elle provoque seulement une diminution modérée et temporaire de la pression artérielle sans aucun effet sur la fréquence cardiaque, sur la dynamique respiratoire et sur l'électrocardiogramme.

30 ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES

Activité protectrice dans la bronchite subaiguë induite par inhalation d'acide citrique chez le cobaye

Le produit TBPG, administré par voie orale, rectale ou inhalatoire aux doses de 50 et 200 mg/kg pendant 2 semaines, démontre une action protectrice efficace, dépendante de la dose, dans les tableaux bronchitiques induits expérimentalement chez le cobaye par inhalation d'une solution à 7,5 % d'acide citrique. Ce résultat est confirmé aussi bien par des examens macro- et microscopiques conduits au niveau pul-

monaire que par l'indice de mortalité, notablement réduit par le traitement avec la TBPG.

L'efficacité du médicament coïncide en outre avec celle de l' α -mercaptopropionylglycine, utilisée en tant que médicament de comparaison et administrée par voie orale à des doses équimolaires.

Activité protectrice sur la bronchite chronique induite par inhalation de SO₂ chez le rat

10 Les animaux chez lesquels on a provoqué des lésions bronchopulmonaires par administration de SO₂ en aérosol, sont traités pendant 2 semaines avec la TBPG aux doses de 100 et 400 mg/kg par voie orale, rectale ou inhalatoire.

15 Dans ce cas également, comme on l'observe dans l'expérience précédente, la TBPG montre un effet protecteur notable dans les épreuves concernant tant les lésions bronchopulmonaires que la mortalité. On obtient des résultats analogues avec des doses équimolaires d' α -mercaptopropionylglycine.

20 Activité sécrétoire chez le lapin

En utilisant la méthode décrite par E.M. Boyd et C.F. Boyd et modifiée par P.C. Braga et coll. (Ipersecrezione bronchiale, 1973), on évalue chaque heure, pendant 4 heures, la quantité de sécrétion bronchique provenant du tractus laryngo-trachéal et celle du tractus trachéo-bronchique de lapins. Le produit TBPG, administré par voie orale, rectale ou inhalatoire aux doses de 50 et 200 mg/kg, se montre en mesure de favoriser de façon significative et dépendante de la dose, la sécrétion laryngo-bronchique chez le lapin.

30 L'efficacité du médicament soumis à l'essai paraît se superposer à celle de l' α -mercaptopropionylglycine, dans l'évaluation de la sécrétion laryngo-trachéale (significativité : $P < 0,05$ par rapport aux témoins), tandis qu'on peut relever une activité plus marquée sur la sécrétion trachéo-bronchique (significativité de la TBPG : $P < 0,05$ par rapport aux témoins ; α -mercaptopropionylglycine : n.s.).

35 Activité bronchosécrétole chez le rat

On détermine l'activité sécrétole de la TBPG à raison de 300 mg/kg i.p. et de l' α -mercaptopropionylglycine

à raison de 135 mg/kg i.p. (doses équimolaires), en se fondant sur la méthode à la fluorescéine sodique décrite par H. Mawatari (Experimental studies on the expectorant action of several drugs, Kogoshima Daigaku Igaku Zasshi 27, 561, 1976).

D'après les résultats obtenus, on peut affirmer que l'activité bronchosécréto-lytique de la TBPG est nettement plus marquée que celle du médicament de comparaison (33,4 % contre 15,2 % des animaux traités avec l' α -mercaptopropionylglycine).

Activité antibronchospastique chez le cobaye

L'aérosol d'histamine détermine chez le cobaye des bronchospasmes accompagnés de convulsions, un collapsus irréversible et la mort.

La TBPG administrée par voie orale, rectale ou inhalatoire aux doses de 200 et 400 mg/kg, s'est avérée augmenter de façon nette et significative le temps s'écoulant entre l'administration de l'aérosol et la disparition du bronchospasme, avec une efficacité similaire à celle de doses équimolaires d' α -mercaptopropionylglycine.

Action hépatoprotectrice dans l'intoxication par CCl₄

Les animaux intoxiqués par CCl₄ pendant 7 jours, sont traités pendant ces mêmes jours et au cours des 7 jours suivants avec la TBPG aux doses de 200 et 400 mg/kg par voie orale et par l' α -mercaptopropionylglycine à raison de 90 et 180 mg/kg par voie orale.

Au 15^{ème} jour, on traite les rats avec la BSF à raison de 10 mg/kg i.v.

La détermination des concentrations hématiques de BSF permet de mettre en évidence que l'administration de la TBPG est en mesure de favoriser, d'une façon statistiquement significative, l'élimination de la BSF chez le rat intoxiqué par le CCl₄.

Cette action s'avère dépendante de la dose et est comparable à celle qui est exercée par des doses équimolaires d' α -mercaptopropionylglycine.

Action régénératrice dans l'hépatectomie partielle

La TBPG, administrée par voie orale aux doses de 200

et 400 mg/kg pendant 6 jours chez le rat préalablement soumis à une hépatectomie partielle (avec ablation de 70 % de l'organe entier), se montre en mesure de favoriser (d'une façon statistiquement significative et superposable à celle exercée par des doses équimolaires d' α -mercaptopropionylglycine) le processus de régénération tissulaire hépatique.

5

Action sur la durée du sommeil induit par barbituriques

L'efficacité de la TBPG, administrée pendant 2 jours aux doses de 200 et 400 mg/kg par voie orale, est évaluée d'après la diminution du temps de sommeil induit par le Nembutal chez le rat intoxiqué par le CCl_4 .

10

L'activité de la TBPG, qui se manifeste dans une mesure significative et avec une corrélation claire entre dose et effet, s'avère superposable à celle de doses équimolaires d' α -mercaptopropionylglycine.

15

Action sur la glutathionperoxydase (GSHP)

On effectue l'expérience pour évaluer l'éventuelle activité inhibitrice de la TBPG vis-à-vis de la GSHP, enzyme notoirement corrélée aux processus phlogistiques.

20

Les résultats obtenus en utilisant le système glutathion/NADPH/GSH-réductase/hydroperoxyde de cumène montrent que la TBPG est en mesure de développer une activité inhibitrice sur la GSHP avec un K_i apparent de $5,4 \cdot 10^{-3}$ molaire.

25 Etudes biochimiques sur le métabolisme

Après administration par voie orale chez le rat, de doses équimolaires de TBPG et d' α -mercaptopropionylglycine, la distribution dans les organes s'avère assez homogène à l'exception, pour les deux médicaments, de concentrations plus élevées au niveau rénal.

30

Pour la TBPG, on observe toutefois un contenu pulmonaire plus marqué, statistiquement significatif par rapport à l' α -mercaptopropionylglycine : ceci est vraisemblablement attribuable à un tropisme pulmonaire prononcé, inhérent à la TBPG.

35

Outre les avantages pharmacologiques déjà mentionnés ci-dessus, le composé de l'invention possède, par rapport à l' α -mercaptopropionylglycine, des caractéristiques organoleptiques nettement meilleures, dues à la stabilité supé-

rieure décrite avec plus de détails dans ce qui suit.

CARACTERISTIQUES ET LIMITES DE LA STABILITE DE LA TBPG PAR
COMPARAISON AVEC L' α -MERCAPTOPROPIONYLGLYCINE (MPG) ET PRO-

5 DUITS DE DEGRADATION EVENTUELS

Stabilité à température ambiante

On conserve 5 lots différents de TBPG et d' α -mercapto-
propionylglycine, à température ambiante dans des réci-
pients fermés pendant 36 mois. Aux fins de la conservation,
10 on détermine: la saveur et l'odeur, le chromatogramme et le
spectre I.R.

D'après les résultats obtenus, on peut voir que, alors
que les deux produits ne s'altèrent pas du point de vue phy-
sico-chimique, les caractéristiques organoleptiques de l' α -
15 mercaptopropionylglycine sont au contraire notablement
altérées.

Stabilité isothermique selon Garret

On conduit l'épreuve accélérée de stabilité sur les
produits en poudre (dans des flacons en verre, bouchés her-
métiquement avec des capsules à vis en matière plastique) et
20 sur des produits dissous dans l'eau (500 mg dans 10 ml, dans
des petits flacons en verre transparent de 20 ml, bouchés
avec des capsules à vis en matière plastique).

On recherche les formations éventuelles d'impuretés
25 dues à une dégradation des produits soumis à l'essai, par
chromatographie sur couche mince (CCM).

Les conditions adoptées, les temps et les résultats
obtenus sont mentionnés dans le Tableau II.

L'impureté chromatographique mise en évidence dans
30 l'échantillon de TBPG s'avère être l' α -mercaptopropionyl-
glycine, provenant de l'hydrolyse de la TBPG.

Stabilité à la lumière

La TBPG en poudre, exposée à la lumière d'une lampe de
60 watts pendant 3 mois, ne s'altère pas, tandis que la MTG
35 présente une coloration jaune intense, des produits de dé-
gradation, une odeur et une saveur désagréables.

TABLEAU II - Résultats des tests accélérés de stabilité

Température (°C)	Temps (h)	Impuretés chromatographiques			
		poudre		solution	
		TBPG	MPG	TBPG	MGP
60	0	-	-	absentes	absentes
	320	absentes	traces	"	0,5 %
	640	"	"	0,5 %	0,6 %
	960	"	1 %	0,7 %	1 %
	1280	"	1 %	1,2 %	1,5 %
	1600	"	2 %	1,3 %	2,5 %
70	120	absentes	traces	-	-
	180	-	-	absentes	1 %
	240	absentes	1 %	1,1 %	2 %
	480	"	2 %	1,2 %	2,5 %
80 90	45	absentes	1 %	absentes	1 %
	90	"	1 %	1,2 %	2,5 %
	120	-	-	1,3 %	1,5 %
	180	absentes	2 %	-	-

Stabilité à l'humidité

On conserve des échantillons de TBPG et de MPG dans des flacons ouverts à la température ambiante, dans des conditions d'humidité relative de 90 %, et à 50°C toujours avec une humidité relative de 90 %.

Après un mois d'exposition, on observe :

TBPG - t.a. = aucune décomposition,

50°C = légère coloration jaune, mais pas de produits de dégradation,

MPG - t.a. = altération notable des caractéristiques organoleptiques,

50°C = profonde altération de la couleur, de l'odeur et de la saveur, et produits de dégradation.

Stabilité en solution

Milieu acide : Les deux composés, mis en solution acide (HCl 0,1 N) à 10 % à 60°C pendant 5 jours, ne se dégradent pas.

Milieu alcalin : Les deux composés, mis en solution alcaline (NaOH 0,1 N) à 10 % à 60°C pendant 5 jours, se dégradent.

Milieu oxydant : Les deux composés, conservés en présence d'eau oxygénée à 3 % pendant 2 mois, présentent une décompo-

sition notable, mais l'altération est plus grande pour la MPG.

Milieu réducteur :

5 en présence de SO_2 - des solutions contenant respectivement 25 mg/ml de TBPG et de MPG en présence de bisulfite de sodium (calculé en SO_2) sont chauffées à reflux pendant 3 heures. Tandis que la TBPG ne subit aucune altération tant physico-chimique qu'organoleptique, la MPG subit au contraire
10 une altération sensible d'ordre physico-chimique comme organoleptique.

CONCLUSIONS

D'après les épreuves effectuées, on peut déduire que le produit TBPG est nettement plus stable que l' α -mercapto-
15 propionylglycine, tant à l'état sec qu'à l'état humide, dans différentes conditions de conservation.

L' α -mercaptopropionylglycine subit des altérations notables du point de vue organoleptique, tandis que ceci n'est pas observé avec la TBPG. Egalement du point de vue
20 physico-chimique, la TBPG est plus stable que l' α -mercapto-propionylglycine.

Le produit de l'invention peut être administré par voie orale ou parentérale, dans diverses formulations pharmaceutiques, telles que, par exemple :

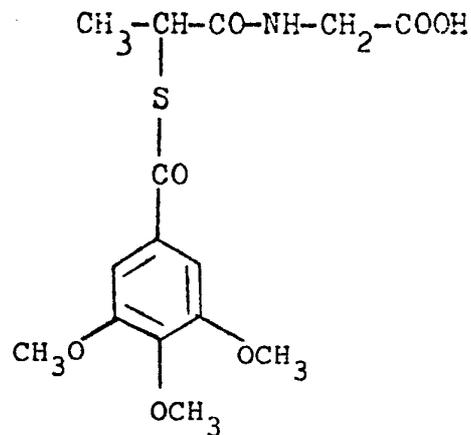
- 25 - capsules à 500 mg
- dragées à 500 mg
- comprimés à 500 mg
- flacons pour utilisation parentérale et en aérosol à 250-500-1000mg
- 30 - Sirop à 2 % - 3% - 4 %
- Suppositoires adultes à 400 mg
- Suppositoires enfants à 200 mg
- Suppositoires nourrissons à 100 mg
- Sachets de granulés à 4 %.

REVENDEICATIONS

1. α -(3,4,5-Triméthoxybenzoylthio)propionylglycine
de formule (I)

5

10



(I)

15

2. Procédé pour la préparation de α -(3,4,5-triméthoxybenzoylthio)propionylglycine, caractérisé par le fait que l'on fait réagir le chlorure de 3,4,5-triméthoxybenzoyle avec la 2-mercaptopropionylglycine en présence
20 d'une base.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que l'on opère en milieu aqueux.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé par le fait que l'on opère en présence d'une base telle que le
25 carbonate de potassium ou de sodium.

5. Médicament, notamment pour la thérapie des bronchopathies subaigües et chroniques, des hépatopathies aigües et chroniques et des séquelles d'intoxication, caractérisé en ce qu'il est constitué par α -(3,4,5-triméthoxybenzoylthio)propionylglycine de formule (I).
30

6. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend le médicament selon la revendication 5, en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable et approprié à l'administration par voie orale ou parentérale.