

Brevet N°

84465

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG

du 10 novembre 1982

Titre délivré : 13 JUIN 1983



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, à POMEZIA (Rome) Italie, représentée par Monsieur
Jacques de Muyser, agissant en qualité de mandataire (2)

dépose(nt) ce dix novembre 1900 quatre-vingt-deux (3)
à 15 heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg :

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :
"Nouveau sel de l'hexaméthylènetétramine, son procédé de (4)
préparation et son application en thérapeutique".

2. la délégation de pouvoir, datée de POMEZIA le 11 octobre 1982

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 10 novembre 1982

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :
- Leonardo DE VINCENTIIS, Isonzo Street 42, à ROME, Italie (5)

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de
(6) brevet déposée(s) en (7) Italie
le 1er mars 1982 (No. 19900 A/82) (8)

au nom de la déposante (9)
domicile
élu(enient) pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg
35, bld. 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 :

10 novembre 1982

à 15 heures



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

A 68007

(1) Nom, prénom, firme, adresse — (2) s'il a lieu «représenté» agissant en qualité de mandataire — (3) date du dépôt
en toutes lettres — (4) titre de l'invention — (5) noms et adresses — (6) brevet, certificat d'addition, modèle d'utilité — (7)
pays — (8) date — (9) déposant original — (10) adresse — (11) 6, 12 ou 18 mois.

Brevet N° **84465**
 du 10 novembre 1982
 Titre délivré :

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG



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, à POMEZIA (Rome) Italie, représentée par Monsieur
Jacques de Muyser, agissant en qualité de mandataire (2)

dépose(nt) ce dix novembre 1900 quatre-vingt-deux (3)
 à 15 heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg :

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :
"Nouveau sel de l'hexaméthylènetétramine, son procédé de (4)
préparation et son application en thérapeutique".

2. la délégation de pouvoir, datée de POMEZIA le 11 octobre 1982
 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 10 novembre 1982

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :
- Leonardo DE VINCENTIIS, Isonzo Street 42, à ROME, Italie (5)

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de
 (6) brevet déposée(s) en (7) Italie
 le 1er mars 1982 (No. 19900 A/82) (8)

au nom de la déposante (9)
domicile
élit(éissent) pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg
35, bld. 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)

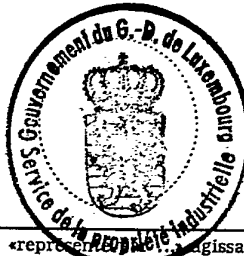
Le mandataire

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 :

10 novembre 1982

à 15 heures



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

REVENDICATION DE LA PRIORITE

de la demande de brevet / du modèle d'utilité /

En ITALIE

Du 1er mars 1982

Mémoire Descriptif

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

au

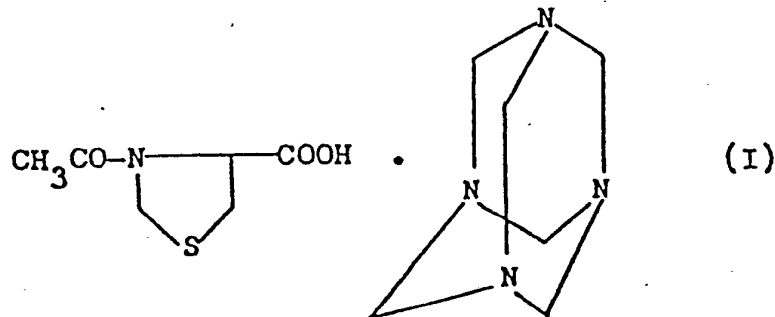
Luxembourg

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

pour :

"Nouveau sel de l'hexaméthylènetétramine, son procédé de préparation et son application en thérapeutique".

La présente invention concerne un composé nouveau, à savoir le N-acétyl-thiazolidine-4-carboxylate d'hexaméthylènetétramine, répondant à la formule (I) :



15 L'hexaméthylènetétramine est un médicament connu utilisé depuis des années comme agent chimiothérapeutique pour le traitement des infections des voies urinaires ; l'hexaméthylènetétramine est facilement absorbée et éliminée dans l'urine sous une forme inchangée (90 %) ; dans une urine acide, l'hexaméthylènetétramine est convertie en son métabolite pharmacologiquement actif, à savoir le formaldéhyde (environ 15 % de la dose totale). On peut consulter à ce propos Martindale - The Extra Pharmacopoeia 27 ème Edition, page 1006.

20 Pendant le traitement chimiothérapeutique par l'hexaméthylènetétramine, on doit acidifier l'urine du patient ; c'est aussi dans ce but que pour les traitements thérapeutiques on utilise les sels d'hexaméthylènetétramine, les sels les plus connus étant l'hippurate et le mandélate.

25 L'hippurate d'hexaméthylènetétramine est toutefois contre-indiqué chez les patients souffrant d'une insuffisance hépatique et on est obligé d'employer des agents acidifiants à chaque fois que des bactéries destructrices de l'urée sont présentes dans l'urine. On doit constamment utiliser des substances acidifiantes lorsqu'on administre le mandélate d'hexaméthylènetétramine à des fins thérapeutiques.

30 On a maintenant trouvé que le N-acétyl-thiazolidine-4-carboxylate d'hexaméthylènetétramine (I) ne possède pas seulement une activité antibactérienne plus forte que celle de l'hexaméthylènetétramine, mais est également doté de propriétés mucosécrétoytiques remarquables et d'une activité protectrice contre les affections du foie, ce qui rend ce produit particulièrement approprié pour soigner des patients souffrant de maladies du foie d'un type aigu et chronique.

35 L'invention concerne donc également des compositions pharmaceutiques

contenant, à titre d'agent actif, le composé de formule (I).

Enfin l'invention concerne un procédé de préparation du composé (I), caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir dans des solvants polaires l'acide N-acétyl-thiazolidine-4-carboxylique et l'hexaméthylènetétramine en
5 des proportions sensiblement stoechiométriques, puis à isoler le sel (I) par une précipitation effectuée à l'aide de solvants non polaires. Parmi les solvants polaires, on préfère les alcanols inférieurs tels que le méthanol, l'éthanol et l'isopropanol. Parmi les solvants non polaires, on préfère l'éther diéthylique et l'éther diisopropylique. En variante, on peut isoler
10 le sel (I) par évaporation du solvant.

L'exemple suivant sert à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

EXEMPLE

On dissout dans 1 litre de méthanol 1 mole d'acide N-acétyl-thiazolidine-4-carboxylique et 1 mole d'hexaméthylènetétramine (urotropine).
15 On soumet au reflux le mélange résultant pendant 30 minutes puis distille 800 ml de méthanol. On ajoute de l'éther isopropylique jusqu'à ce que le mélange devienne nettement trouble. On laisse le mélange résultant au repos
20 dans de la glace jusqu'à précipitation complète (pendant 10 à 48 heures).

On sépare par filtration le produit cristallin formé et on sèche sous vide à 30°C environ. Le rendement est presque quantitatif.

Le sel (I) ainsi obtenu présente un point de fusion de 240 à 245°C (déc.) ; il est extrêmement soluble dans l'eau, soluble dans les alcanols inférieurs et insoluble dans l'acétone et l'éther.

Analyse élémentaire

$C_{12}H_{21}N_5O_3S$ (poids moléculaire : 315,28) |

Calculé : C = 45,71 % ; H = 6,71 % ; N = 22,20 %

5 Trouvé : C = 45,58 % ; H = 6,79 % ; N = 22,03 %

Spectre IR (pâte au nujol ; les bandes d'absorption sont exprimées en cm^{-1}) :

Elongation O - H 3400
 Elongation C - H thiazolidine 2980-2810
 10 Elongation C - H urotropine 2460-2600
 Elongation C = H amide et carboxylate 1650-1620

Spectre RMN- H^1 (détecté dans le sulfoxyde d'hexadeutérodiméthyle standard interne TMS ; les déplacements chimiques sont exprimées en δ) :

15 2,1 (d, 3H, CO-CH₃) ; 3,1-3,4 (m, 2H, S-CH₂-COOH) ;

4,3-4,9 (m, 15H, 12H d'urotropine ; N-CH₂-S ; N-CH-COOH) ;

7,5 (s, 1H mobile).

20 Les caractéristiques biologiques du composé (I), qu'on désignera par la suite par l'abréviation AFP 829 dans un but de brièveté, sont mises en évidence dans ce qui suit :

TOXICITE

25 On détermine la toxicité aiguë de AFP 829 par comparaison avec l'acide thiazolidine-4-carboxylique (TCA) et l'hexaméthylènetétramine (EMTA), par voie orale chez des souris Swiss et des rats Wistar et on calcule cette toxicité par le procédé de Litchfield et Wilcoxon [J. Pharm. Exp. Therap. 96. 99-113 (1949)].

30 La DL₅₀ indiquée dans le tableau I ci-dessous montre que le composé testé ne possède qu'une très faible toxicité.

TABLEAU I

Espèce	Voie d'administration	DL ₅₀ (mg/kg)		
		AFP 289	EMTA	TCA
souris	orale	1350	1500	400
rats	orale	2100	1050	800

ACTIVITE ANTIBACTERIENNEActivité in vitro

On détermine l'activité antibactérienne in vitro de AFP 829 par comparaison avec l'hexaméthylènetétramine (EMTA), à l'égard de 90 souches de différentes espèces bactériennes Gram-positives et Gram-négatives qui ont été récemment isolées à partir d'échantillons cliniques, en déterminant la concentration inhibitrice minimum (C.I.M.) c'est-à-dire la plus faible concentration antibactérienne capable d'inhiber la croissance des bactéries.

Pour effectuer ces essais, on utilise les souches bactériennes ci-après :

10 Gram-positives (35 souches) :

- Staphylococcus aureus (15 souches)
- Streptococcus pyogenes (15 souches)
- Streptococcus faecalis (5 souches)

15 Gram-négatives (55 souches) :

- Salmonella spp (10 souches)
- Pseudomonas aeruginosa (10 souches)
- Proteus spp (10 souches)
- E. coli (10 souches)
- 20 - Klebsiella spp (7 souches)
- Serratia spp (5 souches)
- Citrobacter spp (3 souches).

Comme milieu de culture, on utilise l'agar-agar Mueller Hinton à pH 5,5. On dissout les composés à tester dans une solution saline stérile et on les dilue avec cette solution ; on verse 1 ml de chaque solution diluée ainsi obtenue dans une boîte de Pétri et on ajoute ensuite 19 ml d'agar-agar Mueller Hinton.

Les concentrations finales d'hexaméthylènetétramine (EMTA) sont 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6, 7,8 et 3,9 µg/ml.

Les concentrations de AFP 829 sont équimolaires à celles de EMTA.

On effectue l'inoculation des bactéries à l'aide d'un inoculateur à points multiples et un bouillon de culture après une croissance de 18 heures, pour chaque souche à examiner. Avec ce procédé, l'inoculat bactérien est égal à environ 10^5 unités de formation de colonies (UFC) par point. On lit les résultats après avoir soumis les plaques à une culture pendant 18 heures à 37°C.

Les résultats sont présentés dans les tableaux II et III et on peut constater que AFP 829 est actif à l'égard de tous les micro-organismes utilisés aussi bien Gram-positifs que Gram-négatifs ; aucun micro-organisme n'est résistant à des concentrations supérieures à 125 µg/ml et on notera que le médicament témoin EMTA est lui-même un peu moins actif.

TABLEAU II

Concentrations inhibitrices minimum (C.I.M) exprimées en $\mu\text{g/ml}$ (Procédé des totaux cumulatifs)

Souche bactérienne	Nombre de souches	Médicament	Concentrations (°) en $\mu\text{g/ml}$									
			≤3,9	7,8	15,6	31,2	62,5	125	250	500	1000	≥2000
Salmonella	10	EMTA				9	10					
		AFP 829 (*)			1	10						
Pseudomonas	10	EMTA				10						
		AFP 829 (*)				10						
Proteus	10	EMTA				10						
		AFP 829 (*)			3	10						
E. coli	10	EMTA				8	10					
		AFP 829 (*)				10						
Klebsiella	7	EMTA				6	7					
		AFP 829 (*)				7						
Serratia	5	EMTA				4	5					
		AFP 829 (*)				4	5					
Citrobacter	3	EMTA				1	3					
		AFP 829 (*)				3						

(°) EMTA

(*) Les concentrations de AFP 829 sont équimolaires à celles de EMTA.

TABLEAU III

Concentrations inhibitrices minimum (C.I.M.) exprimées en $\mu\text{g/ml}$ (Procédé des totaux cumulatifs)

Souche bactérienne	Nombre de souches	Médicament	Concentrations (°) en $\mu\text{g/ml}$									
			$\leq 3,9$	7,8	15,6	31,2	62,5	125	250	500	1000	≥ 2000
S. aureus	15	EMTA				10	14	15				
		AFP 829 (*)				13	15					
Streptococcus	15	EMTA		7		11	13	14	15			
		AFP 829 (*)		.5		12	15					
Enterococcus	5	EMTA				4	5					
		AFP 829 (*)			1	5						

(°) EMTA

(*) Les concentrations de AFP 829 sont équimolaires à celles de EMTA.

Activité in vivoExcrétion urinaire

L'excrétion urinaire de AFP 829 comparée à l'excrétion d'hexaméthylène-tétramine (EMTA) est déterminée sur des rats Sprague Dawley privés de nourriture pendant 16 heures et pesant chacun en moyenne 300 g. On dissout les composés à tester dans de l'eau ordinaire à des doses équimolaires : AFP 829 = 135 mg/rat : EMTA = 60 mg/rat.

Chaque groupe d'animaux reçoit les substances par voie i.p. dans 50 ml d'une solution saline stérile ; on place les animaux dans des cages métaboliques en laissant un libre accès à l'eau. On recueille les échantillons d'urine aux intervalles de temps suivants :

0 - 1,30 heure
1,30 - 2,30 heures
2,30 - 4,30 heures
4,30 - 6,30 heures

1 ml d'un bouillon nutritif à pH 5,5 contenant environ $1,10^{-5}$ unité de formation de colonies d'une souche de Ps. aeruginosa sensible à l'action des deux substances, est ajouté à 1 ml de l'urine ou de la solution témoin des deux médicaments dissous dans l'eau distillée.

On dilue successivement les échantillons de la solution témoin et d'urine à deux reprises en utilisant le même bouillon contenant les micro-organismes, jusqu'à obtenir une dilution de 1 : 2048.

Après une incubation durant une nuit à 37°C, on détermine la dilution maximale (dilution limite) des substances ou échantillons inhibant la croissance bactérienne.

On détermine ensuite la concentration des substances dans les échantillons urinaires en utilisant la formule ci-dessous :

Dilution limite de l'urine	
<u>étudiée</u>	X
Dilution limite de la	Concentration initiale de la solution
solution témoin	témoin

Les tests montrent que les deux substances sont excrétées dans l'urine sous une forme biologiquement active ; cependant AFP 829 est excrété avec un degré nettement supérieur d'activité antibactérienne par rapport à EMTA utilisée comme composé témoin de référence (voir tableau IV).

TABLEAU IV
Excrétion urinaire chez les rats Sprague-Dawley de la molécule de AFP 829
administrée par voie orale.

Intervalle de temps (heures)	$\mu\text{g/ml}$ d'urine AFP 829 EMTA	Quantité totale d'excrétion (μg) AFP 829 EMTA	% d'excrétion AFP 829 EMTA	% d'excrétion totale AFP 829 EMTA
0 - 1,30	2000	3000 1600	1,6 0,88	
1,30 - 2,30	4000	12800 11200	7,0 6,2	17,0 11,4
2,30 - 4,30	4000	14000 7200	7,6 4,0	
4,30 - 6,30	1000	1000 800	0,54 0,44	

Activité mucosécrétoiytique

On détermine l'activité mucosécrétoiytique chez les rats Wistar mâles après une administration de AFP 829 par voie orale. Pour cette détermination, on utilise le procédé décrit par H. Mawatari [H. Mawatari, Kagoshima Daiagaku, Igaku Zasshi, 27, 561 (1976)]. Comme témoin de référence, on utilise un médicament ayant une activité connue à savoir le carboxyméthylcystéine.

Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau V.

TABEAU V

Composé	Dose administrée mg/kg/p.o.	Nombre d'animaux	% d'augmentation de fluorescéine sodique par comparaison avec les témoins
AFP 829	250	10	96,1
Carboxyméthyl- cystéine	250	10	33,4

Les valeurs ci-dessus montrent que AFP 829 possède une activité mucosécrétoiytique puissante, nettement plus élevée que celle de la substance témoin (carboxyméthylcystéine).

Facteurs pharmacocinétiques

Les essais effectués sur des animaux de laboratoire après administration par voie orale de doses équimoléculaires de AFP 829 et EMTA montrent que l'administration de AFP 829 permet une absorption plus rapide et une excrétion urinaire plus rapide de EMTA par comparaison avec les témoins traités avec EMTA.

AFP 829 et EMTA apparaissent sélectivement dans l'urine simultanément avec leurs métabolites actifs.

Ces considérations soulignent l'utilité du composé (I) en qualité d'agent chimiothérapeutique pour les voies urinaires et intestinales.

La présente invention concerne également tous les aspects industriels en rapport avec l'emploi de AFP 829 en qualité d'agent pour le traitement des affections bactériennes des voies urinaires et des voies intestinales et pour le traitement du catarrhe de la vessie et du catarrhe intestinal. En conséquence, un aspect essentiel de l'invention réside dans les compositions pharmaceutiques contenant des quantités prédéterminées de AFP 829. Le composé selon l'invention peut être administré par voie orale, par exemple sous forme de comprimés, pilules, gélules, sachets, sirops, etc.

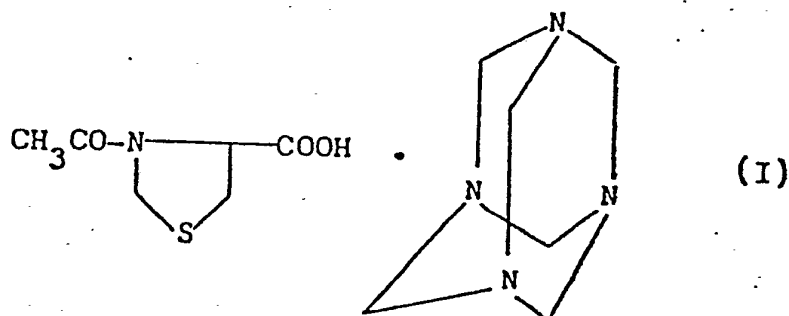
Les compositions ci-après sont présentées à titre d'exemple :

- (a) comprimés et pilules contenant 500 à 1000 mg de AFP 829 ainsi que des excipients, des agents de désintégration, etc, d'un usage courant en pharmacie ;
- (b) gélules de 500 mg de AFP 829 ;
- 5 (c) sachets à dose unique contenant chacun 500 à 1000 mg de AFP 829 ;
- (d) sirop, suspension ou gouttes contenant 5 à 10 % de AFP 829 ainsi que des édulcorants, des agents aromatisants et des agents de conservation dont l'emploi est courant dans l'industrie pharmaceutique.

Enfin, le nouveau dérivé selon l'invention pourra avantageusement
10 être administré chez l'humain, à des doses de l'ordre de 500 à 2000 mg/jour.

REVENDEICATIONS

1. Nouveau dérivé de l'hexaméthylènetétramine, caractérisé en ce qu'il est le N-acétyl-thiazolidine-4-carboxylate d'hexaméthylènetétramine répondant à la formule (I) :



15 2. Procédé de préparation du composé (I) selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir dans des solvants polaires l'acide N-acétyl-thiazolidine-4-carboxylique et l'hexaméthylènetétramine en des proportions sensiblement stoechiométriques, puis à isoler le sel (I) en le précipitant par addition de solvants non polaires.

20 3. A titre de médicament, le composé selon la revendication 1.

4. Compositions pharmaceutiques ayant notamment une activité anti-bactérienne et mucosécrétoiytique, caractérisées en ce qu'elles contiennent à titre d'agent actif le N-acétyl-thiazolidine-4-carboxylate d'hexaméthylène-tétramine de formule (I) en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

25