

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

②

N° 82 20476

-
- ⑤④ Dérivés N-(vinblastinoyl-23) d'acides amines, leur préparation et leur application thérapeutique.
- ⑤① Classification internationale (Int. Cl.³). C 07 D 519/04; A 61 K 31/475.
- ②② Date de dépôt 7 décembre 1982.
- ③③ ③② ③① Priorité revendiquée : LU, 8 décembre 1981, n° 83.822.

- ④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 23 du 10-6-1983.

-
- ⑦① Déposant : Société anonyme dite : OMNICHEM. — BE.

- ⑦② Invention de : André Benoît Léon Trouet, Jean Alfred A. J. Hannart et Kandukuri Sivaprasada
Bushana Rao.

- ⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

- ⑦④ Mandataire : Cabinet Beau de Loménie,
55, rue d'Amsterdam, 75008 Paris.

Dérivés N-(vinblastinoyl-23) d'acides aminés, leur préparation et leur application thérapeutique.

La présente invention se rapporte à de
 5 nouveaux alcaloïdes bis-indoliques. Plus particulière-
 ment, l'invention est relative à de nouveaux produits
 de couplage d'acides aminés avec des dérivés de la vin-
 blastine, à leur procédé de préparation, à leur appli-
 10 cation en tant qu'agents antitumoraux et aux composi-
 tions pharmaceutiques les contenant.

Ces nouveaux dérivés de la vinblastine peuvent
 être utilisés pour le traitement des leucémies et des
 15 tumeurs malignes chez l'homme.

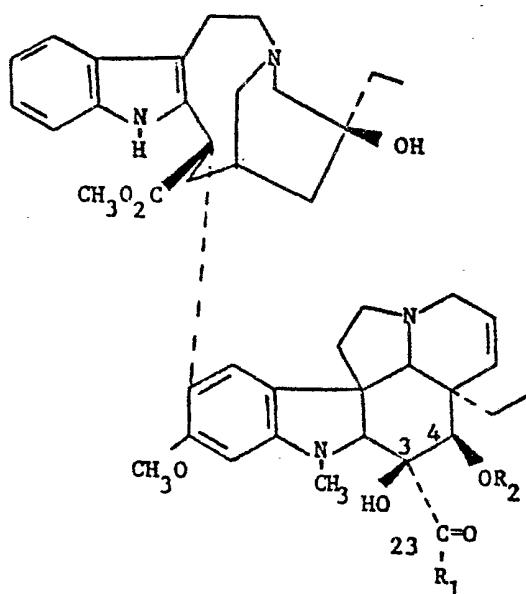
Les alcaloïdes bisindoliques du type de la
 vinblastine sont des composés bien connus possédant
 20 le squelette carboné de la formule générale suivante :

20

25

30

35



On citera à titre d'exemple la vincaléukoblastine (brevet américain 3 097 137), la leurocristine ou vincristine et la leurosidine (brevet américain 3 205 220), le vinglycinate (brevet belge 659 112) et la vindésine (brevet belge 813 168). Ce dernier composé a été obtenu par transformation chimique de la vinblastine naturelle (I, $R_1 = OCH_3$, $R_2 = COCH_3$), qui elle-même est obtenue par extraction à partir de feuilles de Catharanthus roseus.

10

La vinblastine, la vincristine et la vindésine sont commercialisées pour leur utilisation en thérapeutique humaine, plus particulièrement pour le traitement de leucémies et de certaines tumeurs solides.

15

Ces médicaments possèdent néanmoins des effets secondaires défavorables. La vincristine est neurotoxique et la vinblastine est fortement toxique au niveau des tissus hématopoétiques.

20

Leur mécanisme d'action est analogue à celui qui a été postulé pour l'action antimitotique de la colchicine. Ces médicaments agiraient par inhibition de la polymérisation de la tubuline en microtubules et arrêt subséquent de la division cellulaire en métaphase.

25

L'utilisation de complexes 1:1 d'alcaloïdes bisindoliques antitumoraux avec la tubuline a été décrite dans le brevet belge 854 053.

30

Dans certains cas, il peut en résulter une toxicité moindre et une activité chimiothérapeutique plus importante que celles des alcaloïdes libres correspondants.

35

D'autres dérivés obtenus par modification chimique de la vinblastine ont été testés. Ainsi le sulfate de vinglycinate (I, sulfate, $R_1 = OCH_3$, $R_2 = COCH_2N(CH_3)_2$, Cancer Research 1967, 27, 221-227) a été étudié en expérimentation clinique mais ne s'est généralement pas révélé supérieur à la vinblastine et à la vincristine.

Le brevet belge 813 168 décrit la vindésine (I, $R_1 = NH_2$, $R_2 = H$) et d'autres dérivés carboxamide en C_3 de la vinblastine. Des publications postérieures ont confirmé l'intérêt thérapeutique de la vindésine ou carboxamide-3 déacétyl-0-4 vinblastine, mais ce composé s'est cependant révélé inactif pour le traitement de tumeurs L 1210 transplantées chez la souris (C.J. Barnett et al., J. Med. Chem. 21, 88, 1978).

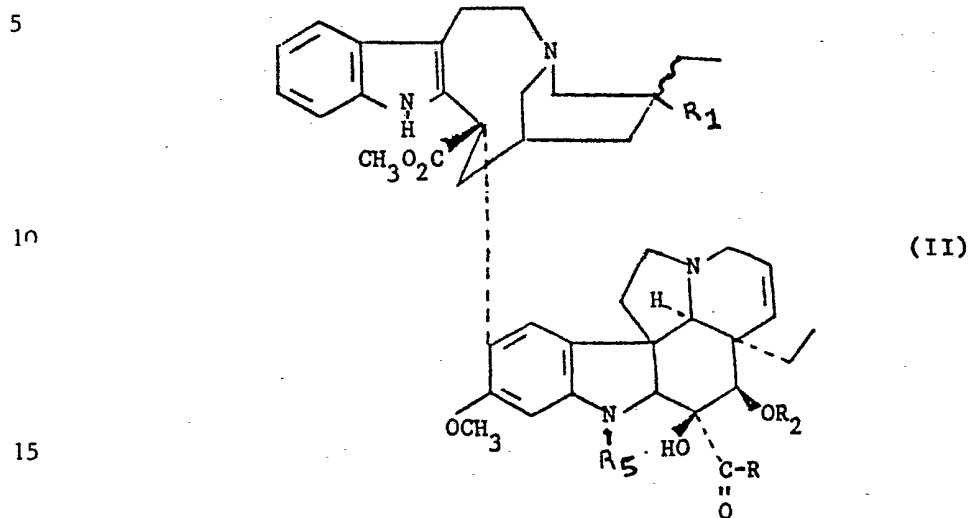
Les nouveaux composés décrits dans la présente invention sont capables de retarder efficacement la mort de souris auxquelles on a transplanté par voie intraveineuse des tumeurs P 388 et L 1210.

Les activités sur ces tumeurs expérimentales P 388 se sont révélées, de manière surprenante, très supérieures à celles des alcaloïdes Vinca de référence. De nombreuses rémissions complètes ont été observées.

Les dérivés de l'invention possèdent en outre d'autres avantages importants et inattendus comparative-ment à la vinblastine et à ses analogues connus, en particulier la vindésine.

En particulier, les toxicités observées sont généralement inférieures à celles correspondant à la vindésine ou à la vincristine.

La présente invention concerne, les dérivés de la vinblastine répondant à la formule générale II suivante :



20 dans laquelle

R représente un ester d'acide aminé, éventuellement protégé, couplé au fragment vinblastinoyl-23 par un lien amide, le groupe ester ramifié ou non possédant de 2 à 9 atomes de carbone, R₁ représente un

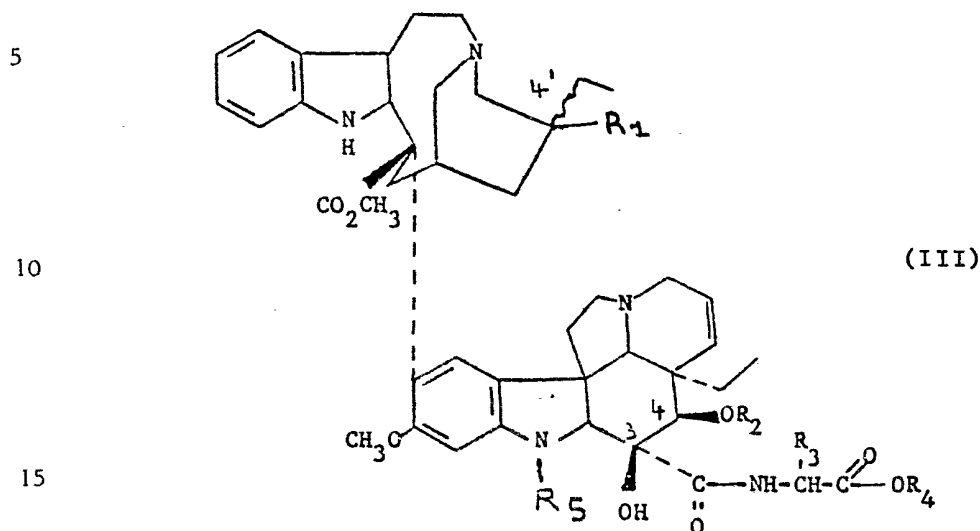
25 atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle,

R₂ représente un atome d'hydrogène, un groupe formyle ou acyle comportant de 2 à 9 atomes de carbone,

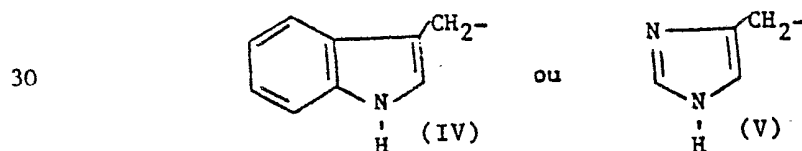
R₅ représente un atome d'hydrogène un groupe méthyle ou un groupe formyle, à l'exclusion du cas où R₅ représente un groupe méthyle et R₁ représente un groupe β-hydroxyle

30 ainsi que ses sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques.

Les nouveaux composés de l'invention répondent plus particulièrement à la formule générale III.



dans laquelle R_1 représente un groupe hydroxyle ou un
 20 atome d'hydrogène, R_2 représente un atome d'hydrogène,
 un groupe acyle ou formyle comportant de 1 à 9 atomes de
 carbone; R_3 représente chaque fois indépendamment, un
 atome d'hydrogène, un groupe alkyle ramifié ou non
 comportant de 1 à 8 atomes de carbone, un groupe hydroxy
 25 Cl-C8 alkyle, amino-hydroxy Cl-C8 alkyle, carboxy-Cl-C8
 alkyle, amido Cl-C8 alkyle, guanadino Cl-C8 alkyle, amino
 Cl-C8 alkyle, thiol Cl-C8 alkyle, cystéinyl méthyle,
 thiométhyl-éthyl, benzyle, hydroxybenzyle,

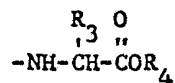


ou R_3 représente avec l'atome de carbone auquel il est
 attaché et l'azote du groupe amide, un cycle azole ou

hydroxyazole;

R₅ représente un atome d'hydrogène, un groupe méthyle ou un groupe formyle, et R₄ représente un groupe alkyle, linéaire ou ramifié possédant de 1 à 8 atomes de carbone, ou un groupebenzyle, à l'exclusion des composés où R₁ = β-OH et R₅ = CH₃, COOR₄ représente de préférence un groupe carboéthoxy ou carbométhoxy, ainsi que leurs sels d'addition avec des acides minéraux ou organiques.

Plus particulièrement, le fragment structural de la formule III



représente un ester de n'importe lequel des acides aminés naturels et de leurs isomères optiques de configuration D, notamment :

la glycine	acide aspartique	cystine
alanine	acide glutamique	méthionine
valine	asparagine	phénylalanine
leucine	glutamine	tyrosine
isoleucine	arginine	tryptophane
sérine	lysine	proline
thréonine	cystéine	histidine
hydroxyproline ou	hydroxylysine.	

On peut considérer ces composés comme étant des dérivés de la descarbométhoxy-3 désacétyl-0-4 vinblastine carboxamide-3. On préférera cependant les désigner comme étant des dérivés N-(vinblastinoyl-23) ou N-(vincristinoyl-23) d'acides aminés.

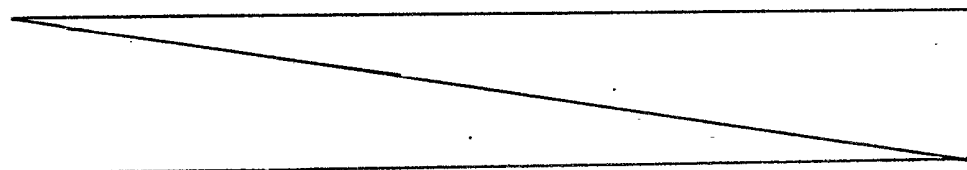
Les composés préférés de l'invention répondent à la formule II dans laquelle R_2 représente un atome d'hydrogène et la partie acide aminé est dérivée d'un des acides aminés suivants : L ou D tryptophane, leucine, valine, isoleucine, alanine et phénylalanine. Parmi ces derniers, le L-tryptophane, la L-isoleucine et la L-alanine se sont révélés plus particulièrement intéressants.

La présente invention divulgue plus particulièrement des produits de couplage d'acides aminés avec la vincristine, la désacétyl-04-vincristine, la desformyl-désacétyl-0-4-vincristine et la désoxy-vinblastine β .

Ce dernier composé peut être obtenu par hydrogénation de l'anhydrovinblastine obtenue par déshydratation de la vinblastine ou par couplage de la vindoline à la catharantine (Potier et al, JACS 98 7017 1976). Le composé préféré de la présente invention est le N-(désacétyl-04 déoxy-4'vinblastinoyl-23) tryptophanate d'éthyle.

Lorsque l'acide aminé contient des groupes fonctionnels dans la chaîne latérale R_3 (formule III), comme la lysine ou la cystéine, il peut être nécessaire de protéger ces groupes fonctionnels en utilisant les méthodes bien connues de l'homme de l'art.

Cette protection peut être effectuée, selon la nature du groupe à protéger, par le greffage d'un groupe benzyle, t-butyle, benzyloxy-carbonyle, t-butoxy-trifluoroacétyl carbonyle ou trityle. D'autres agents bien connus en chimie peptidique peuvent être avantageusement utilisés.



Selon le procédé mentionné ci-dessus, les composés suivant l'invention peuvent être obtenus à partir des dérivés correspondants de la vinblastine, de manière classique, par hydrazinolyse suivie de nitrosation, puis couplage avec l'ester d'acide aminé selon le schéma réactionnel I

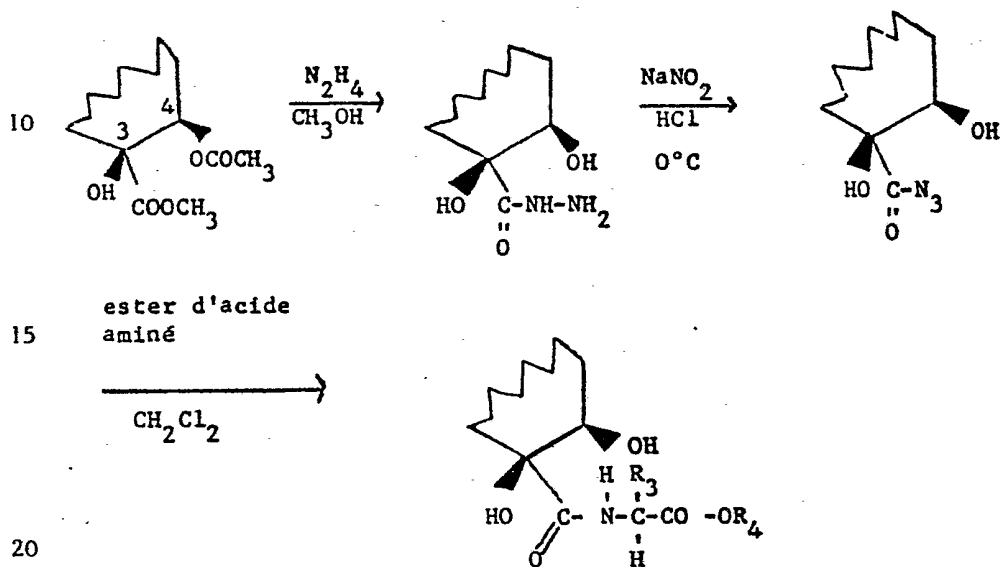


Schéma I

25

La première étape consiste à additionner un excès d'hydrazine anhydre à une solution de vinblastine base dans le méthanol anhydre. Le mélange réactionnel est alors chauffé sous atmosphère inerte pendant 12 heures à 12 jours à une température comprise entre 30 et 70°C. De préférence, la température sera maintenue vers 60°C.

L'hydrazide du dérivé bis-indolique est alors isolé par addition d'eau, extraction au dichlorométhane

35

et concentration. Le composé peut être ultérieurement purifié par chromatographie préparative (silice neutre). Dans le cas de la vincristine, le produit obtenu est la 0-4 désacétyl déformyl-vincristine carboxhydrazide.

5

Lors de la deuxième étape, la fonction hydrazide de la vinblastine modifiée est transformée en azoture d'acide. Cette transformation est effectuée de manière connue, par addition de nitrite de sodium à l'hydrazide en solution dans un mélange eau-méthanol-acide.

10

L'acide utilisé peut être l'acide chlorhydrique.

15

La température de réaction est maintenue entre 0 et 5 °C. Après extraction par un solvant aprotique non soluble dans l'eau, de préférence le chlorure de méthylène la phase organique est partiellement concentrée.

20

L'azoture d'acide lui-même n'est de préférence pas isolé, mais directement mis en présence de l'ester d'acide aminé ou, le cas échéant, le dérivé correspondant protégé, en solution dans le chlorure de méthylène.

25

La quantité d'acide aminé mise en oeuvre est de 1 à 5 équivalents de vinblastine carboxazide modifiée.

30

Le milieu réactionnel est maintenu entre - 3 et + 10 °C pendant 8 à 72 heures, le plus souvent environ 15 heures. La réaction est facilement suivie par chromatographie sur couche mince. Après concentration, on isole le composé de l'invention III qui peut être transformé en sulfate ou un autre sel d'acide minéral ou organique par cristallisation à partir d'une solution méthanolique de l'acide correspondant.

35

Les composés de l'invention sont purifiés en utilisant les techniques bien connues de chromatographie et de recristallisation.

5 Le cas échéant, le dérivé de désacétyl-0-4 vinblastine ainsi obtenu peut être réacétylé soit directement pour donner le dérivé de la vinblastine II dans lequel $R_2 = \text{COCH}_3$ (J. Med. Chem. 22, 391, 1979) ou par formation préliminaire du dérivé diacétoxy-3, 4 suivie
10 d'une hydrolyse sélective du groupe acétoxy en position 3. Le groupe hydroxyle en C_4 peut être, de manière connue en soi, estérifié par d'autres dérivés actifs d'acides comportant de 2 à 9 atomes de carbone. Les dérivés 0-4 formylés sont obtenus par formylation (acide formique -
15 anhydride acétique) des 0-4 désacétyl correspondants, voir brevet belge 660.843.

La présente invention s'étend également aux applications industrielles et notamment pharmaceutiques
20 des composés bisindoliques nouveaux.

Les composés de l'invention présentent en particulier des propriétés antitumorales particulièrement intéressantes et susceptibles d'être utilisées en thérapeu-
25 tique humaine.

Ces dérivés d'acide aminé peuvent être, en particulier, utilisés pour le traitement des leucémies du type L 1210, P 388, de gliomes, lymphosarcomes et d'autres
30 leucémies ou tumeurs malignes.

En thérapeutique humaine, ils sont utilisés pour le traitement de la maladie de Hodgkin et pour d'autres tumeurs pouvant bénéficier d'un traitement avec
35 la vinblastine, la vincristine et la vindésine.

Ces composés peuvent également être utilisés en médecine vétérinaire pour le traitement des tumeurs chez les animaux.

5 D'autres applications thérapeutiques intéressantes peuvent être envisagées pour ces nouveaux dérivés d'alcaloïdes bisindoliques. Il a en effet été relevé que la vinblastine pourrait être utilisée dans le traitement de certaines arthrites (brevet des Etats-
10 Unis d'Amérique n° 4 208 411) et la vincristine pour le traitement de psoriasis (brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3 749 784).

15 Pour leur application thérapeutique, les composés de l'invention, éventuellement sous forme lyophilisée sont de préférence administrés par voie parentérale, dissous dans un solvant pharmaceutiquement acceptable, sous la forme d'une base ou d'un sel d'addition d'un acide pharmaceutiquement acceptable. Parmi
20 les sels d'addition, on préférera les sels non toxiques, pharmaceutiquement acceptables, tels que les sels d'acides minéraux comme l'acide chlorhydrique, l'acide phosphorique et l'acide sulfurique, ou d'acides organiques comme l'acide acétique, propionique, succinique, tartrique,
25 que, oxalique, méthanesulfonique, benzènesulfonique.

L'eau physiologique ou d'autres solutions salines tamponnées, par exemple avec un phosphate, sont des solvants appropriés. D'une manière générale, ces
30 composés peuvent être utilisés en s'inspirant des techniques et des limitations qui sont connues pour les traitements thérapeutiques avec les autres alcaloïdes de la classe des Vinca.

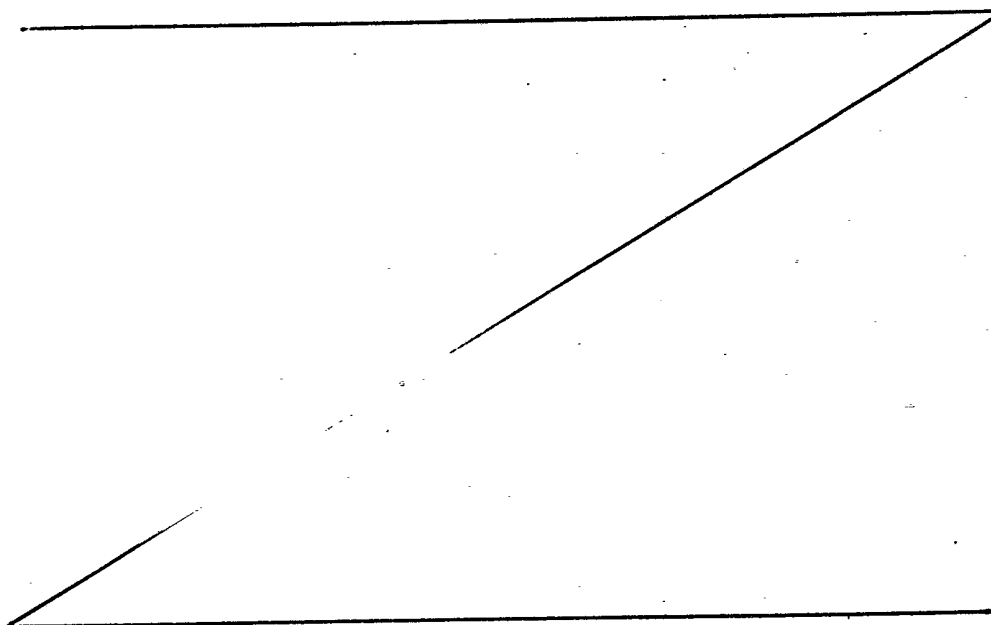
35 La substance active est généralement administrée à une posologie pouvant varier de 0,01 mg à environ 5 mg/kg, en fonction du dérivé utilisé et du schéma thérapeutique

adopté. Les doses hebdomadaires totales varieront généralement de 0,1 mg à environ 35 mg/kg.

5 Les compositions selon l'invention sont présentées sous des formes d'administration contenant le principe actif à la dose unitaire de 2 à 900 mg.

10 Les composés de l'invention peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec un ou plusieurs agents carcinostatiques incluant par exemple les agents alkylants, les antimétabolites tels que le méthotrexate, le fluoro-5-uracile, la mercapto-6 purine, la thio-6 guanine, les arabinosides de la cytosine et les anti-
15 biotiques tels que l'actinomycine D, la daunorubicine, l'adriamycine, et le cis-diamino-dichloro-platine. En particulier, ces nouveaux dérivés de la vinblastine peuvent être utilisés en association entre eux.

20 Les exemples suivants illustrent de manière non limitative le procédé conduisant aux composés de l'invention.



Exemple 1

1. Préparation de la 0-4-désacétyl-N-desformyl-vincristine monohydrate A.

5

985 mg de vincristine base sont mis en solution dans un mélange de 10 ml d'hydrazine anhydre et 10 ml de méthanol. Le milieu réactionnel est porté à 60°C sous agitation pendant 22 heures. Le mélange réactionnel est alors traité à l'eau puis à l'eau saturée en NaCl. La solution aqueuse est extraite 8 fois par 15 ml de dichlorométhane. Les phases organiques rassemblées sont traitées avec 20 ml d'eau puis 25 ml d'eau saturée en NaCl puis séchées sur Na₂SO₄. Après filtration et concentration sous vide on obtient 900 mg de 0-4 désacétyl vincristine monohydrate (pureté supérieure à 90 %).

10

15

20

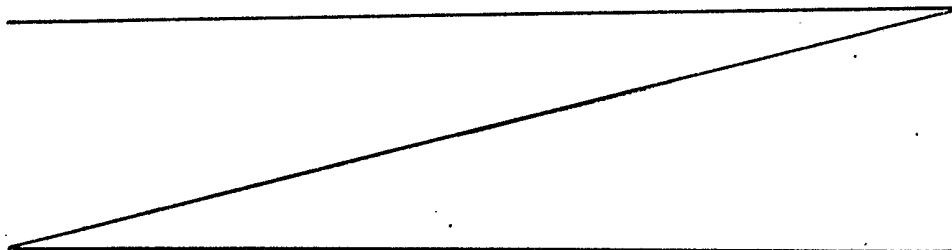
Spectre de résonance magnétique nucléaire (CDC13,360 MHz)

25

9,76 (s,1H), 8,37 (s,1H), 8,06 (s,1H), 7,53 (d,1H)
7,24 et 7,07 (m,3H), 6,82 (s,1H), 6,22(s,1), 5,87
(dd,1h), 5,67 (d,1H), 5,43(s,1H), 4,03(s,1H), 3,94
s,3H), 3,86(s,1H) 3,73(s,3H), 3,52(s,3H)
2,82(s,2H), 2,51(s,1H) 0,93(2t, 2 x 3H).

30

Spectre de masse (ionisation impact électronique)
154, 294, 355, 413, 524, 555, 695, 710, 723, 736,
739, 755 (M + 1) - 768, 769, 782
calculé pour C₄₂H₅₄N₆O₇ 754.942



2. Préparation de l'azoture d'acide de la vincristine modifiée.

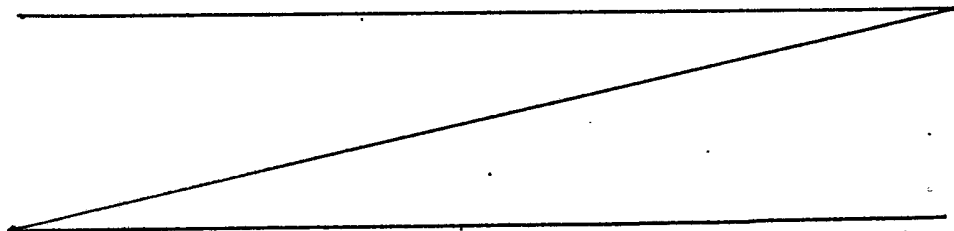
5 Une solution de 850 mg de vincristine monohydrate A dans 20 ml de méthanol est traitée par 63 ml de HCl1N et 175.5 mg de nitrite de sodium pendant 15 minutes à 0°C.

10 La solution, maintenue à 0°C, est alors neutralisée par NaHCO₃ à 0°C puis extraite six fois avec 15 ml de dichlorométhane. Les phases organiques rassemblées sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis concentrées sous vide sans chauffer jusqu'à l'obtention d'une solution d'environ 10 ml.

15

3. Couplage avec le tryptophanate d'éthyle

20 300 mg de tryptophanate d'éthyle sont alors ajoutés sous agitation à environ 4°C et la réaction est suivie par ccm. Après 10 jours, le produit de couplage est purifié par séparation chromatographique (40 g silica-gel 60, solvant d'élution éther, méthanol sat en NH₃ 96:4, v:v). On recueille
25 ainsi des fractions de 15 ml qui sont contrôlées par ccm. L'acide aminé non couplé est d'abord recueillie (fractions 30 à 40). On change d'éluant (éther, méthanol sat en NH₃ 86 : 14) et on recueille
30 les dérivés couplés en trois portions : fractions 44 et 45 30 mg, fractions 46-53 257 mg, fractions 54-60 115 mg).



La deuxième portion est constituée de N-(0-4-désacétyl-
desformyl-vincristine-23-oyl) tryptophanate d'éthyle
la homogène en ccm.

5 Spectre de masse : 984, 970, 956 ($M^+ + 1$) 913, 912,
899 (DCJ isobutane) calculé pour $C_{55}H_{66}N_6O_9$: 955,
181.

Spectre UV (CH_3OH) :

10 max : 282 (4,20) - 290 (4,18) - 322 (3,96)
min : 254 - 287 - 305

Spectre IR : (cm^{-1})

15 3400 - 2920 - 1720 - 1660 - 1610 - 1485 - 1450
1370 - 1345 - 1330 - 1290 - 1220 - 1165 - 1130
1025 - 1005 - 920 - 885 - 830 - 740.

Spectre RMN ($CDCl_3$) 360 MHz (ppm)

20 8,50 (s, 1H)
8,03 (s, 2H)
7,77 (d, 1H)
7,60 (d, 1H)
7,57 (d, 1H)
6,95 (s, 1H)
25 6,35 (s, 1H)
5,89 (d.d., 1H)
5,78 (d, 1H)
4,75 (q, 1H)
3,88 (s, 3H)
30 3,67 (s, 3H)
1,23 (t, 3H)
0,98 (t, 3H)
0,89 (t, 3H)

N-(0-4-désacétyl-vincristine-23-oyl)-tryptophanate
d'éthyle Ib.

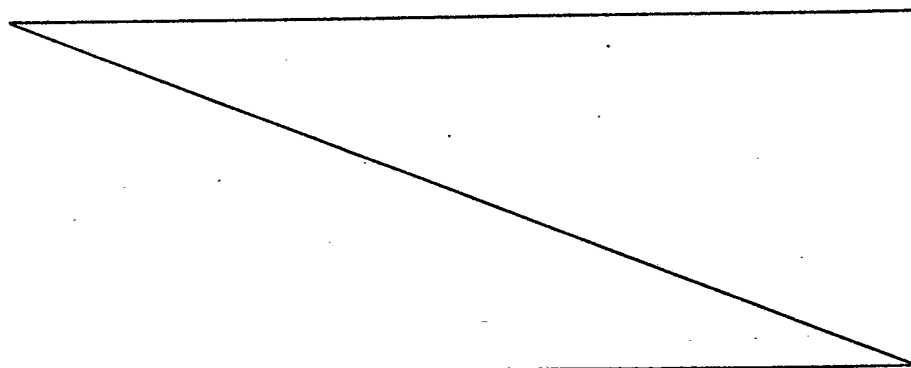
5 Le dérivé déformylé Ia (257 mg) est reformylé en
appliquant la méthode décrite dans le brevet belge
811.110.

10 Le produit brut ainsi obtenu est purifié par sépara-
tion chromatographique en utilisant une colonne de
20 cm (silica gel, 30 g) et en utilisant successive-
ment 3 éluants : ether/MeOH sat. en NH_3 92 : 8,
88 : 12, 86 : 14. L'effluent est récolté par fractions
de 15 ml. Les fractions 44 à 54 (34.1 mg) contiennent
le dérivé N-reformylé Ib.

15 Spectre de masse (DCI à l'isobutane) : 1011, 997,
983 ($\text{M}^+ + 1$), 970, 982, 996, 998, 999, 1012.
calculé pour $\text{C}_{56}\text{H}_{66}\text{N}_6\text{O}_{10}$ = 983, 192.

20 Spectre UV (CH_3OH)
max : 270 (4,18) - 290 (4,11)
plateau 280 (4,12) épaulement (4,03)

Spectre I.R. (KBr)
25 bandes à 3400 - 3040 - 2960 - 2920 - 2880 - 2850 -
1735 - 1725 - 1680 - 1670 - 1665 - 1610 - 1490 -
1450 - 1225 - 745.



Exemple 2

N-(0-4-désacétyl désoxy - 4' vinblastine - 23 - oyl - β)
tryptophanate d'éthyle (Ic).

5

La 0-4-désacétyl désoxy vinblastine hydrazide est préparée selon le mode opératoire repris dans le brevet US 4 203 898 (Lilly, colonne 24 ligne 51 et suivantes).

10

500 mg de l'hydrazide dans 12 ml de méthanol sont alors traités avec 37 ml de HCl 1N et 104 mg de NaNO_2 pendant 15' à 0°C.

15

La solution est ensuite neutralisée avec NaHCO_3 puis extraite six fois avec 15 ml de dichlorométhane. Les phases organiques sont séchées sur Na_2SO_4 et concentrées jusqu'à obtenir un volume de 10 ml environ.

20

L'azide en solution est alors mis en présence de tryptophanate d'éthyle (300 mg) à 4°C sous agitation. La réaction est suivie par ccm (éther, MeOH). Après 6 jours la réaction est terminée et le produit de couplage est purifié par chromatographie sur colonne de silica-gel (18 cm, 30 g) élution par fractions de 15 ml.

25

Les éluants suivants ont été successivement utilisés :

éther 96	MeOH sat avec NH_3	4	fraction 1 - 49
92		8	fractions 50 - 57
86		14	fractions 71 - 90.

30

Les fractions 50-57 contiennent le produit de couplage désiré (108 mg) Ic.

35

Le sulfate est préparé par précipitation dans l'éther. (2 % H_2SO_4 / éthanol).

Spectre UV du sulfate (CH₃OH)

max : 224 (4,63) - 272 (4,32)
 min : 247 (4,03)
 5 épaulement : 286 (4,22) - 312 (3,72)

Spectre IR (KBr) du sulfate

3420 - 3060 - 2960 - 2930 - 2880 - 2600 (faible) - 1725
 10 1660 - 1615 - 1500 - 1455 - 1430 - 1375 - 1230 - 1105 -
 1060 - 1015 - 920 - 745 cm⁻¹.

Spectre RMN (CDCl₃) 360 MHz de la base en ppm.

15	9,46	s 1H	3,58	s RH
	8,34	s 1H	3,47	s 1H
	7,92	s 1H	2,82	s 2H
	7,67	d 1H	2,77	s 3H
	7,59	d 1H	2,59	s 1H
20	7,53	d 1H	1,14	t 3H
	7,30	d 1H	0,95	t 3H
	6,51	s 1H	0,87	t 3H
	6,04	s 1H		
	m. presque s. centré sur 5,81			
25	4,94	q 1H		
	4,18	d 1H		
	4,05	q 2H		
	3,77	s 3H		

30 Spectre de masse de la base

DCI isobutane

M + 1⁺ à 954 M + 14 + 1⁺ à 968 M + 28 + 1⁺ à 982

ions à 153 - 155 - 157 - 171 - 172 - 185 - 186 - 199
 35 213 - 223 - 227 - 255 - 257 - 279 - 281 - 283 -
 285 - 349 - 398 - 459 - 516 - 569 - 952 - 953 -
 955 - 967 - 969 - 981 - 983.

Calculé pour $C_{56} H_{68} N_6 O_8$: 953,208

Exemple 3

5 N-(O-4-désacétyl-4'-désoxy-vinblastine-23-oyl- β)-isoleucinate
d'éthyle.

10 Une solution de O-4-désacétyl-4'-désoxy-vinblastine β
hydrazide (0,6g; 0,79 mN- voir brevet américain 4.203.898 -
colonne 24, ligne 51) dans un mélange de 15 ml de méthanol
et 45 ml HCl 1N est refroidi à $-7^{\circ}C$. On ajoute 0,15 g
de $NaNO_2$ à la solution et poursuit l'agitation pendant
13 minutes à $-7^{\circ}C$. Après addition d'une solution aqueuse
15 saturée de $NaHCO_3$ jusqu'à atteindre un pH de 9, la solu-
tion obtenue est extraite quatre fois par CH_2Cl_2 . Les
phases organiques combinées sont lavées par une solution
saturée de NaCl et séchées sur $MgSO_4$.

20 La solution est concentrée jusqu'à un volume de 15 ml et
de l'isoleucinate d'éthyle(1,25 mN) y est ajouté. Le
solvant est ensuite évaporé sous pression réduite. Le
résidu est purifié sur colonne de chromatographie
(SiO_2 , 60 g) et élué par éther CH_3OH / NH_3 (96:4).
On obtient 0,25 g d'un produit amorphe (rendement 35 %).

25

Spectre de masse :(Ionisation Molec. isobutane)

880(M^+), 894, 836, 849, 832, 445; 391, 355 cm^{-1}

$C_{51}H_{69}N_5O_8 = 880.1$

Point de fusion $180-190^{\circ}C$

30 $\alpha_D = 104^{\circ}$ (c=0.154)

IR ($CHCl_3$) 3470, 2970, 1728, 1655, 1612, 1502 cm^{-1}

UV (CH_3OH) 289, 268, 216 nm

RMN ($CDCl_3$) 7,9(NH), 6,54 et 6,06 H_9 , H_{12} , 5,81 ($H_{14}-H_{15}$)

4,60 ($CHCO_2(NH)$) 3,76 CO_2CH_3 , 3,58 CH_3-O , 3,33 et 2,8

35 (H_3A et H_3B), 2,73 (N- CH_3), 0,69 (H-15').

Toxicité aiguë - Détermination de la LD₅₀

5 La toxicité aiguë du composé de l'exemple 2
 N-(O-4-désacétyl-désoxy-4' vinblastine-23-oyl-β)
 triptophanate d'éthyle a été étudiée sur des souris
 NMRI femelles. Des doses croissantes de produit sont
 administrées par voie intraveineuse en une injection.
 10 Le pourcentage de mortalité est suivi en fonction
 du temps. Les valeurs de LD₅₀ obtenues pour le composé
 de l'exemple 2 (désoxy VTrpE) et un produit de
 référence (désoxy vinblastine = désoxy VBL) sont
 reprises ci-dessous :

15

Produit	LD ₅₀
Désoxy VBL	20
Désoxy VTrpE (Ic)	91.5

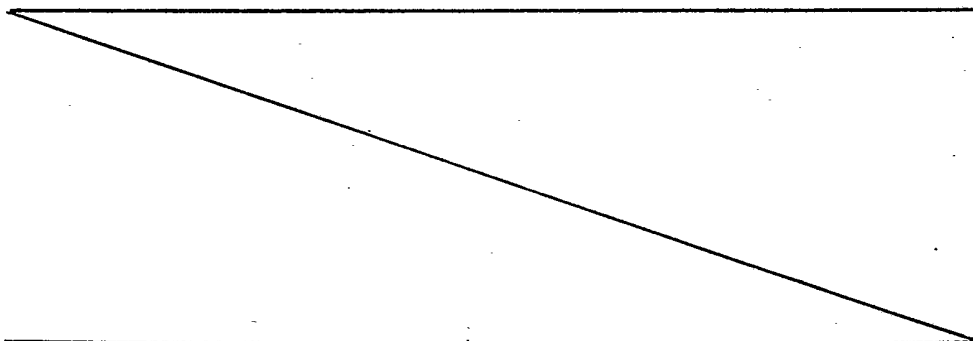
20

Le dérivé désoxy VTrpE est donc moins toxique que la
 composé de référence.

Activité antitumorale

25

L'activité chimiothérapique du sel sulfate de
 désoxy VTrpE a été étudiée sur les leucémies
 lymphoblastiques L1210 et P388.



1. L1210

5 Des souris DBA₂ femelles sont inoculées avec
10⁴ cellules leucémiques. Le produit est administré
par voie intraveineuse le lendemain de la greffe à la
dose de 50 mg/kg. La mortalité des animaux est suivie
en fonction du temps. Le tableau 1 reprend les résultats
obtenus avec le composé de l'exemple 2 (Ic).
10 A la dose testée le dérivé est plus actif que la VBL.
Cette supériorité a été confirmée par rapport à la
désoxy VBL.

2. P388

15

Des souris DBA₂ femelles reçoivent par voie
intraveineuse 10⁴ cellules leucémiques. Les produits
sont administrés par voie i.v. le lendemain de la
greffe. La mortalité des animaux est suivie au cours
20 du temps. Les résultats sont repris dans le tableau 1.
Le désoxy VTrpE est nettement plus actif que le composé
de référence et présente un pourcentage très important
de survivants à long terme.

Tableau I.

Tumeur	Produit	Dose	Nombre d'animaux	MST jour 30	ILS %	Pourcentage de survivants au jour 30	Pourcentage de survivants au jour 60
L1210	VBL	8	10	10,4	57,6	0	0
	VBL	19	10	5,8	-21,6	0	0
	Désoxy VTrpE	50	10	11,2	70	0	0
P388	Désoxy VBL	4	5	15,6	56	0	0
	Désoxy VBL	8	5	5,8	-42	0	0
	Désoxy VTrpE	30	10	16,5	58,7	0	0
		40	15	30	191	67	53
		50	15	30	191	87	73,3
		55	10	30	212	80	60
		60	10	30	212	90	90

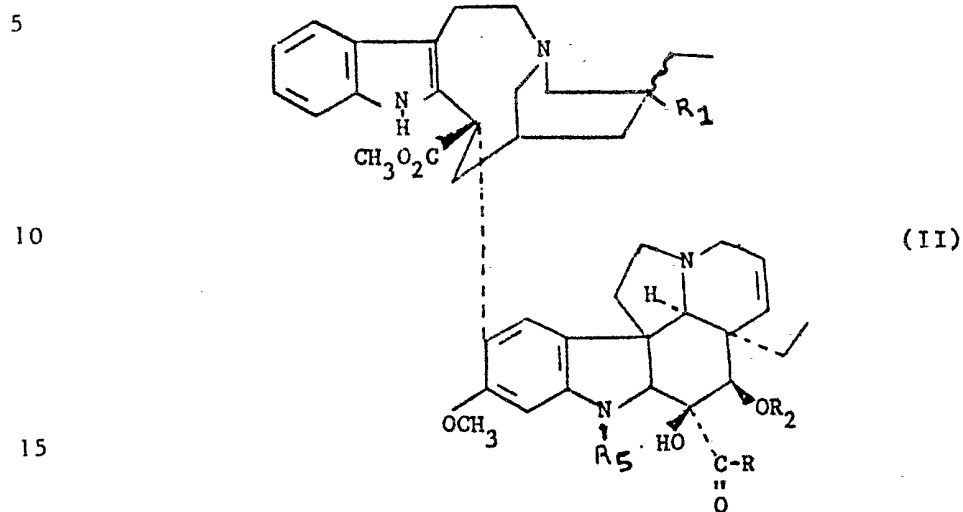
22

Des souris DBA₂ femelles sont inoculées par voie i.v. avec 10⁴ cellules leucémiques. Les produits sont administrés par voie i.v. aux doses et schémas précisés.
MST = median survival time = jour moyen de survie
ILS % = % of increase in life span = pourcentage d'augmentation de la durée de survie.

2517680

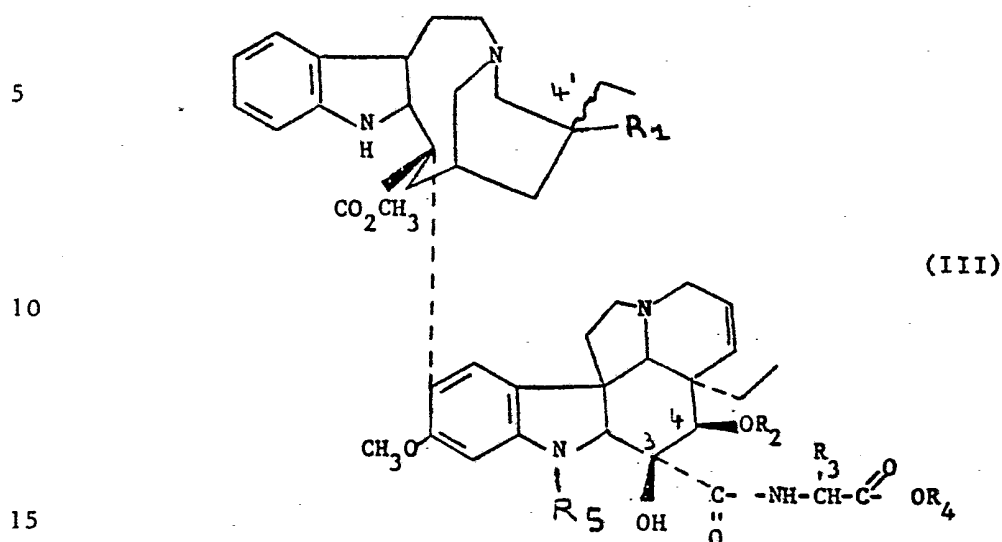
R E V E N D I C A T I O N S

1. A titre de composés nouveaux, les dérivés de la vinblastine répondant à la formule générale II suivante :

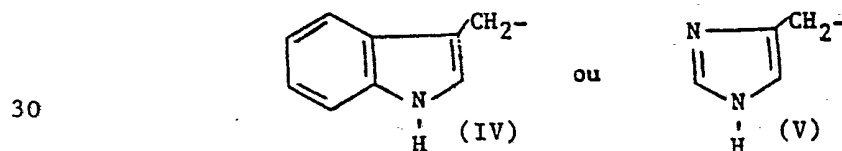


- 20 dans laquelle
- R représente un ester d'acide aminé, éventuellement protégé, couplé au fragment vinblastinoyl-23 par un lien amide, le groupe ester ramifié ou non possédant de 2 à 9 atomes de carbone, R₁ représente un
- 25 atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle,
- R₂ représente un atome d'hydrogène, un groupe formyle ou acyle comportant de 2 à 9 atomes de carbone,
- R₅ représente un atome d'hydrogène, un groupe méthyle ou un groupe formyle, à l'exclusion du cas où R₅ représente
- 30 un groupe méthyle et R₁ représente un groupe β-hydroxyle ainsi que ses sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques.

2. Composés de la formule générale III.



dans laquelle R_1 représente un groupe hydroxyle ou un atome d'hydrogène, R_2 représente un atome d'hydrogène, un groupe acyle ou formyle comportant de 1 à 9 atomes de carbone; R_3 représente chaque fois indépendamment, un atome d'hydrogène, un groupe alkyle ramifié ou non comportant de 1 à 8 atomes de carbone, un groupe hydroxy Cl-C8 alkyle, amino-hydroxy Cl-C8 alkyle, carboxy-Cl-C8 alkyle, amido Cl-C8 alkyle, guanadino Cl-C8 alkyle, amino Cl-C8 alkyle, thiol Cl-C8 alkyle, cystéinyl méthyle, thiométhyl-éthyl, benzyle, hydroxybenzyle,



ou R_3 représente avec l'atome de carbone auquel il est attaché et l'azote du groupe amide, un cycle azole ou hydroxyazole ;

R_5 représente un atome d'hydrogène, un groupe méthyle ou un groupe formyle, et R_4 représente un groupe alkyle, linéaire ou ramifié possédant de 1 à 8 atomes de carbone, ou un groupe benzyle, à l'exclusion des composés où $R_1 =$
5 β - OH et $R_5 = CH_3$, ainsi que leurs sels d'addition avec des acides minéraux ou organiques.

3. Composés suivant les revendications 1 et 2, caractérisés en ce qu'il s'agit du N(désacétyl-0-4 vincristinoyl-23)-L-tryptophanate d'éthyle ou de méthyle et
10 ses sels d'addition avec des acides pharmaceutiquement acceptables.

4. Composés suivant les revendications 1 et 2, caractérisés en ce qu'il s'agit du N-(désacétyl-0-4 desformyl vincristinoyl-23)-L-tryptophanate d'éthyle ou de
15 méthyle et ses sels d'addition avec des acides pharmaceutiquement acceptables.

5. Composés suivant les revendications 1 et 2, caractérisés en ce qu'il s'agit du N-(désacétyl-0-4-désoxy-vinblastinoyl-23- β)-L-tryptophanate d'éthyle, et
20 ses sels d'addition avec des acides pharmaceutiquement acceptables.

6. Composés suivant les revendications 1 à 5, caractérisés en ce qu'il s'agit de sels d'addition 1 : 1 avec l'acide sulfurique.

25 7. Composition pharmaceutique utilisée en médecine humaine et vétérinaire pour le traitement de maladies néoplasiques, caractérisée en ce qu'elle contient un ou plusieurs dérivés définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

30 8. Composition pharmaceutique selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle est sous une forme d'administration dans laquelle le principe actif est présent à une dose unitaire comprise entre environ 2 et 900 mg.

9. Composition pharmaceutique selon la revendication 7 caractérisée en ce que le principe actif est le N-(désacétyl-0-4 vincristinoyl-23)-L-tryptophanate d'éthyle, éventuellement sous la forme d'un sel d'addition avec un acide pharmaceutiquement acceptable.
- 5
10. Composition pharmaceutique selon la revendication 7, caractérisée en ce que le principe actif est le N-(désacétyl-0-4 desformyl vincristinoyl-23)-L-tryptophanate d'éthyle, éventuellement sous la forme d'un sel d'addition avec un acide pharmaceutiquement acceptable.
- 10
11. Composition pharmaceutique selon la revendication 7, caractérisée en ce que le principe actif est la N-(désacétyl-0-4 désoxy-4' vinblastinoyl-23 β)-L-tryptophanate d'éthyle ou le sulfate correspondant.
- 15