

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 573 760

②1 N° d'enregistrement national :

85 17541

⑤1 Int Cl⁴ : C 07 C 172/00; A 61 K 31/59.

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 27 novembre 1985.

③0 Priorité : US, 29 novembre 1984, n° 676.155.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 22 du 30 mai 1986.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : F. HOFFMANN-LA ROCHE & Cie, So-
ciété anonyme. — CH.

⑦2 Inventeur(s) : Enrico Guisepe Baggiolini, Gary Arthur
Truitt, Milan Radoje Uskokovic et Peter Michael Wovku-
lich.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Regimbeau, Corre, Martin,
Schrimpf, Warcoin, Ahner.

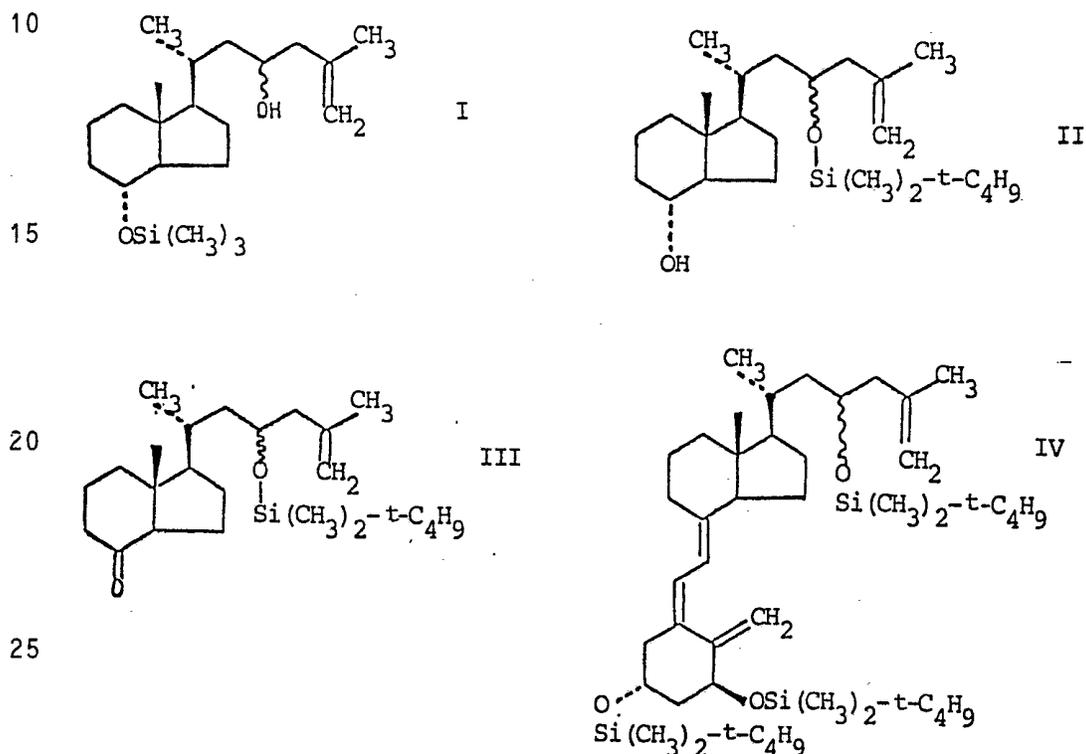
⑤4 Composés dérivés du cholécalciférol, composition pharmaceutique antitumorale et utilisation desdits composés
dans la préparation de cette composition pharmaceutique.

⑤7 Le nouveau 25,26-déhydro-1 α ,23-dihydroxycholécalciférol
sous forme de l'épimère 23S ou de l'épimère 23R ou sous
forme d'un de leurs mélanges possède des propriétés antitu-
morales.

FR 2 573 760 - A1

L'invention a pour objet le 25,26-dénydro-1 α ,23-dihydroxycholécalférol sous forme de l'épimère 23S ou de l'épimère 23R, ou de leurs mélanges, ainsi que les compositions pharmaceutiques comprenant ce composé comme substance active.

Les composés de l'invention peuvent être préparés en partant du composé correspondant de formule I ci-dessous par l'intermédiaire des composés de formules II à IV.



On peut faire réagir un composé I avec un halogénure de t-butyl diméthylsilyle, par exemple le chlorure, et une base organique, par exemple l'imidazole, avantageusement dans une atmosphère inerte, par exemple d'azote ou de préférence d'argon, et dans un solvant organique aprotique, par exemple un éther cyclique ou un formamide alkylé, de préférence leurs mélanges. Un solvant préféré est un mélan-

ge de diméthylformamide (DMF) et de tétrahydrofuranne (THF). Le composé II peut être obtenu par chromatographie, de préférence sur une résine échangeuse de cations, comme un acide sulfonique de type styrénique, suivie de gel de silice. Dans le traitement avec une résine échangeuse de cations, on utilise un mélange d'éther cyclique et d'alcool inférieur, de préférence de THF et de méthanol.

L'oxydation du composé II en composé III peut être réalisée avec un sel chromate avec une amine, par exemple un halogénochromate de pyridinium, de préférence le chlorochromate de 2,2'-bipyridinium, et un sel d'un acide carboxylique, de préférence l'acétate de sodium, dans un solvant inerte, par exemple un alcane halogéné, de préférence un chloroalcane, comme le chlorure de méthylène.

On fait réagir la cétone III obtenue avec l'oxyde de [3S-(3 α ,5 β ,Z)]-2-[2-méthylène-3,5-bis[(1,1-diméthyléthyl)diméthylsilyloxy]cyclohexylidène]éthylidiphénylphosphine pour obtenir le composé de formule IV correspondant. Cette réaction peut être réalisée à des températures réduites, par exemple inférieures à -50°C, de préférence à environ -78°C, dans une atmosphère inerte, par exemple une atmosphère d'argon, dans un solvant inerte, par exemple un éther cyclique, de préférence le THF. Il est souhaitable de transformer initialement l'oxyde de phosphine en carbanion correspondant, en traitant l'oxyde de phosphine avec un alkyl-lithium, de préférence le n-butyl-lithium, dans un solvant inerte, comme un alcane inférieur, par exemple l'hexane, à des températures réduites comme ci-dessus.

Dans la dernière étape, on élimine les groupes protecteurs de fonction hydroxyle du composé IV pour obtenir le composé de l'invention correspondant. Cette réaction peut être réalisée à la température ambiante en traitant avec le fluorure de tétraéthylammonium, en présence d'un solvant de type éther cyclique, de préférence le THF. Le composé obtenu peut être purifié par des techniques connues

en soi, par exemple par chromatographie sur gel de silice.

Les composés de l'invention sont des inducteurs spécifiques puissants de la différenciation cellulaire et des inhibiteurs de la prolifération cellulaire et sont par conséquent des agents utiles dans le traitement des maladies prolifératives, comme les tumeurs et les leucémies. Ils sont aussi utiles dans le traitement de l'ostéoporose. Ils peuvent être administrés en doses d'environ 0,10-3,0, de préférence de 0,25-2,0, μg par jour. On comprendra toutefois que les doses indiquées ci-dessus ne sont données qu'à titre d'exemple et ne limitent en aucun cas la portée de l'utilisation de cette invention. Les composés de l'invention peuvent être administrés oralement, par voie sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale ou topique. Ils peuvent être formulés en compositions, comme en comprimés, en capsules ou en élixirs pour l'administration orale, ou en solutions ou suspensions stériles pour l'administration parentérale. Environ 0,10-3,0, de préférence 0,25-2,0, μg sont mélangés avec un véhicule, support, excipient, pharmaceutiquement acceptable, par exemple le phosphate de calcium ; un liant, par exemple la gomme adragante ; un conservateur, un stabilisant, un agent de désintégration, par exemple l'amidon de maïs ; un lubrifiant, par exemple le stéarate de magnésium ; un agent édulcorant, par exemple le saccharose ; un agent aromatisant, par exemple la menthe poivrée. Diverses autres substances peuvent être présentes, comme des enrobages, par exemple "Shellac", ou pour modifier de toute autre manière la forme physique de la dose unitaire.

Les effets anti-prolifératifs et inducteurs de différenciation des composés de l'invention peuvent être mis en évidence en employant des techniques connues, comme celles décrites dans Cancer Research and Therapy, vol. 23 : Maturation Factors and Cancers, Ed. M.A.S. Moore, Raven Press, N.Y. 1982 ; Nature 270 (1977) 347-9 et Blood 54

(1979) 429-39. Ces effets anti-prolifératifs et inducteurs de différenciation sur des cellules HL-60 in vitro sont indiqués sur le tableau ci-dessous.

Tableau

| Composé (x 10 ⁻⁹ molaire) | Prolifération | | Différentiation | | | |
|---|---|---|--|--|---------|----|
| | Concentration ^{a)} par ml x 10 ⁻⁴ | Cellules HL-60 % de réduction du nombre des cellules | Réduction du NBT cellules formazan ⁺ / total cellules comptées % ⁺ / ⁺ | Phagocytose cellules phagocytiques/ total cellules comptées % ⁺ / ⁺ | | |
| Aucun | | | | | | |
| (témoin du milieu) | 79,1 ± 1,4 | - | 3/437 | <1 | 3/325 | <1 |
| Véhicule (0,01% d'éthanol) | 75,9 ± 2,0 | 0 | 3/431 | <1 | 2/364 | <1 |
| Composé 23S | 74,7 ± 2,2 | 2 | 2/419 | <1 | 3/335 | 1 |
| " | 75,2 ± 0,7 | 1 | 10/436 | 2 | 6/367 | 2 |
| " | 58,0 ± 2,0 | 24 | 100/434 | 23 | 60/354 | 17 |
| " | 35,7 ± 1,2 | 53 | 247/428 | 58 | 201/417 | 48 |
| " | 23,7 ± 0,5 | 69 | 361/400 | 90 | 315/383 | 82 |

a) La concentration finale du véhicule dans toutes les cultures expérimentales était de 0,01%, v/v, d'éthanol.

NBT : "nitroblue tetrazolium"

Les résultats indiquent que les composés de l'invention restreignent la prolifération des cellules tumorales promyélocytiques humaines in vitro même s'ils ne sont pas directement toxiques pour les cellules. En outre, des
5 cellules cultivées en présence de faibles doses de ces composés ($3 \text{ à } 100 \times 10^{-9}$ molaire) ont été induites pour se différencier en un type de cellules plus mûres comme le met en évidence l'acquisition d'une activité enzymatique et d'une fonction cellulaire. Les composés de l'invention
10 représentent donc une approche remarquable du contrôle des maladies cliniques dues à une prolifération et/ou à une différenciation cellulaire aberrante, par exemple les maladies néoplasiques.

Exemple 1

- 15 a) On agite sous atmosphère d'argon, pendant une nuit à la température ambiante, une solution de 0,352 g d'éther [1R-[1 α (R*,S*),3a β ,4 β ,7 α]]-octahydro-1-(3-hydroxy-1,5-diméthyl-5-hexényl)-7a-méthyl-1H-indène-4-ol-triméthylsilylique, 0,31 g de chlorure de t-butyldiméthylsilyle et 0,31 g
20 d'imidazole dans 5 ml de DMF anhydre et 3 ml de THF anhydre, puis on ajoute quelques morceaux de glace. Après avoir agité le mélange 30 minutes, on le reprend dans 200 ml d'hexane/éther (5 : 1) et on le lave avec 80 ml de H₂O et 10 ml de saumure et on le sèche sur Na₂SO₄. On filtre
25 le mélange et on élimine le solvant sous vide, ce qui donne 0,576 g de substance. On l'agite pendant 1 heure avec 0,1 g de résine échangeuse de cations dans 5 ml de THF et 15 ml de méthanol. On filtre le mélange et on élimine les solvants sous vide. On purifie le résidu par chromatographie sur gel
30 de silice en éluant avec de l'hexane/acétate d'éthyle (10 : 1), ce qui donne 0,316 g de [1R-[1 α (R*,S*),3a β ,4a β ,7a α]]-octahydro-1-[3-[(1,1-diméthyléthyl)diméthylsilyloxy]-1,5-diméthyl-5-hexényl]-7a-méthyl-1H-indène-4-ol que l'on utilise directement dans l'étape suivante.
- 35 b) On traite une solution de 0,24 g du produit de 1a)

dans 15 ml de chlorure de méthylène anhydre avec 0,35 g d'acétate de sodium anhydre et 0,71 g de chlorochromate de 2,2'-bipyridinium et on agite le mélange à la température ambiante pendant 3 heures. Après ce temps, on ajoute une
5 quantité supplémentaire de 0,355 g de chlorochromate. On agite le mélange pendant 2 heures, puis on ajoute 1 ml d'isopropanol, on agite le mélange pendant 20 minutes, puis on le dilue à l'eau et on l'extrait avec de l'éther/acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec de l'eau et
10 de la saumure, séchée sur du sulfate de sodium anhydre et filtrée. Les solvants sont éliminés sous vide. On purifie le résidu par chromatographie sur gel de silice en éluant avec de l'hexane/acétate d'éthyle, ce qui donne 0,238 g de
15 [1R-[1 α (R*,S*),3 $\alpha\beta$,7 $\alpha\omega$]]-octahydro-1-[3-L(1,1-diméthyl-éthyl)diméthylsilyloxy]-1,5-diméthyl-5-hexényl]-7 α -méthyl-1H-indène-4-one pure.

c) On refroidit une solution de 0,265 g d'oxyde de [3S-(3 α ,5 β ,Z)]-2-[2-méthylène-3,5-bis-[(1,1-diméthyléthyl)-diméthylsilyloxy]cyclohexylidène]éthylidiphényl-phosphine
20 dans 6 ml de THF anhydre à -78°C et on la traite goutte à goutte avec 0,276 ml d'une solution 1,6M de n-butyl-lithium dans l'hexane. Après avoir agité 5 minutes à -78°C, on traite la solution goutte à goutte avec 0,1 g du produit de
25 1b) dissous dans 2,5 ml de THF anhydre. Le mélange est agité 1,5 heures, puis trempé par addition de 3 ml d'un mélange 1 : 1 de bicarbonate de sodium 1N et de tartrate de sodium et de potassium 1N, on le laisse se réchauffer à la température ambiante, puis on le dilue à l'eau et on l'extrait avec de l'acétate d'éthyle. L'extrait organique est
30 lavé avec de l'eau et de la saumure, séché sur du sulfate de sodium anhydre et filtré. Les solvants sont éliminés sous vide. On purifie le résidu par chromatographie sur gel de silice en éluant avec de l'hexane/acétate d'éthyle, ce qui donne 0,130 g d'éther trisilylique. On le dissout dans
35 6 ml de THF et on le traite avec 1,3 ml de fluorure de té-

trabutylammonium 1M dans le THF et on l'agite à la température ambiante pendant 20 heures. Ensuite, on ajoute 0,5 ml de fluorure de tétrabutylammonium 1M dans le THF et on poursuit l'agitation pendant 4 heures. Le mélange est dilué à l'eau et extrait avec de l'acétate d'éthyle. L'extrait organique est lavé avec de l'eau et de la saumure, séché sur du sulfate de sodium anhydre et filtré. On élimine les matières volatiles sous vide. On purifie le résidu par chromatographie sur gel de silice en éluant avec de l'hexane/acétate d'éthyle, ce qui donne 0,079 g de (1 α ,3 β ,5Z,7E,-23S)-9,10-sécocholesta-5,7,10(19),25-tétraène-1,3,23-triol pur sous forme d'une poudre blanche amorphe.

$[\alpha]_D^{25} = +37,97^\circ$ (c = 0,2, EtOH).

Exemple 2

En suivant le mode opératoire de l'exemple 1, on transforme successivement l'éther [1R-[1 α (R*,R*)-3a β ,4 β ,7a α]]-octahydro-1-(3-hydroxy-1,5-diméthyl-5-hexényl)-7a-méthyl-1H-indène-4-ol-triméthysilylique en

[1R-[1 α (R*,R*),3a β ,4a β ,7a α]]-octahydro-1-[3-[(1,1-diméthyléthyl)diméthylsiloxy]-1,5-diméthyl-5-hexényl]-7a-méthyl-1H-indène-4-ol,

[1R-[1 α (R*,R*),3a β ,7a α]]-octahydro-1-[3-[(1,1-diméthyléthyl)diméthylsilyloxy]-1,5-diméthyl-5-hexényl]-7a-méthyl-1H-indène-4-ol et

(1 α ,3 β ,5Z,7E,23R)-9,10-sécocholesta-5,7,10(19),25-tétraène-1,3,23-triol.

Dans de nombreux exemples de formulations donnés ci-dessous, les composés de l'invention peuvent être utilisés sous forme de l'épimère 23S ou de l'épimère 23R ou sous forme de leurs mélanges.

Exemple A

| Numéro | Substance | mg/capsule | | |
|--------|-------------------------|------------|---------|---------|
| 1. | Composé de l'invention | 0,00010 | 0,00025 | 0,00050 |
| 2. | polyéthylène-glycol 400 | 200,00 | 200,00 | 200,00 |

| <u>Numéro</u> | <u>Substance</u> | <u>mg/capsule</u> | | |
|---------------|------------------|-------------------|-------|-------|
| 3. | hydroxyanisole | | | |
| | butylée | 0,100 | 0,100 | 0,100 |
| 4. | palmitate | | | |
| 5 | d'ascorbyle | 1,00 | 1,00 | 1,00 |

Les substances 1, 3 et 4 sont dissoutes dans la substance 2 sous azote et encapsulées.

Exemple B

| <u>Numéro</u> | <u>Substances</u> | <u>mg/capsule</u> | |
|---------------|-------------------------------|-------------------|---------|
| 10 | 1. Composé | 0,10 ml | 0,50 ml |
| | 2. 95% d'éthanol- 5% d'eau | 2,00 ml | 3,00 ml |

La substance 1 est dissoute la substance 2 sous azote et injectée par voie intramusculaire.

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

- 1.- 25,26-Déhydro-1 α ,23-dihydroxycholécalférol sous forme de l'épimère 23S ou de l'épimère 23R ou sous forme d'un de leurs mélanges.
- 2.- 25,26-Déhydro-1 α ,23S-dihydroxycholécalférol.
- 5 3.- Composé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est un agent antitumoral.
- 4.- Composition pharmaceutique, en particulier pour le traitement des tumeurs, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité efficace d'un composé selon la revendication 1
- 10 ou 2 comme substance active.
- 5.- Utilisation d'un composé selon la revendication 1 ou 2 dans la préparation d'une composition pharmaceutique selon la revendication 4, en particulier d'une composition ayant une activité antitumorale.

* * *