

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 29 avril 1983.

30 Priorité :

43 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 44 du 2 novembre 1984.

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

71 Demandeur(s) : ŒUVRES HOSPITALIÈRES FRANÇAISES
DE L'ORDRE DE MALTE. — FR.

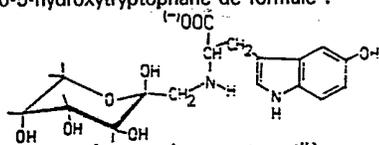
72 Inventeur(s) : Laszlo Mester De Parajd et Madeleine
Szadeczky-Kardoss épouse Mester De Parajd.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) : Harlé et Phélip.

54 Nouveaux dérivés glucidiques du 5-hydroxytryptophane, obtention et application comme médicaments.

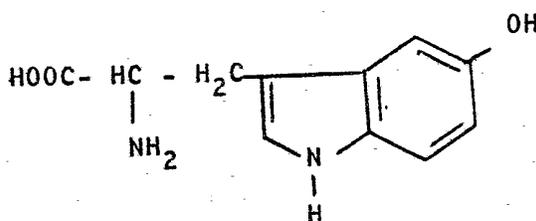
57 Nouveaux dérivés glucidiques du 5-hydroxytryptophane, obtention et application comme médicaments. Dans les nouveaux dérivés du 5-HTP, l'un au moins des atomes d'hydrogène du groupe amine primaire du 5-HTP est substitué par un groupe désoxy-1 céto-2 sucre. Un composé préféré est le N-1-désoxy-fructo-5-hydroxytryptophane de formule :



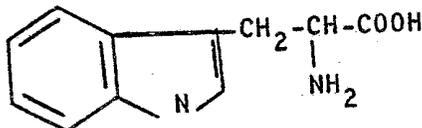
Ces nouveaux composés sont des agents antilépéux de valeur.

L'invention concerne de nouveaux dérivés glucidiques du 5-hydroxytryptophane, consistant en des N-1-désoxy-2-céto-glycosyl-5-hydroxytryptophane. Elle a également pour objet un procédé pour l'obtention de ces composés ainsi que l'application de ceux-ci comme médicaments et comme agents actifs dans des compositions pharmaceutiques, en particulier pour le traitement de la lèpre.

Le 5-hydroxytryptophane est un composé connu répondant à la formule:



Ce composé existe sous les formes L, D et du mélange D, L. Il peut être préparé en faisant agir une enzyme, la tryptophane-hydroxylase, sur le tryptophane, acide aminé de formule:



30 Sa synthèse chimique a été également effectuée: voir A. EK et B. WITKOP dans J. Am. Chem. Soc. 76, 5579 (1954). Le 5-hydroxytryptophane (en abrégé 5-HTP) est déjà proposé comme médicament, en particulier à titre de précurseur de la sérotonine: voir par exemple Dictionnaire VIDAL, Ed. 1980, p. 973, la spécialité disponible sur le marché sous la dénomination PRETONINE, ou MERCK Index, 9ème Edition, p. 645, composé n°4769.

35 On trouvera encore des indications précises sur la structure du 5-hydroxytryptophane dans l'article

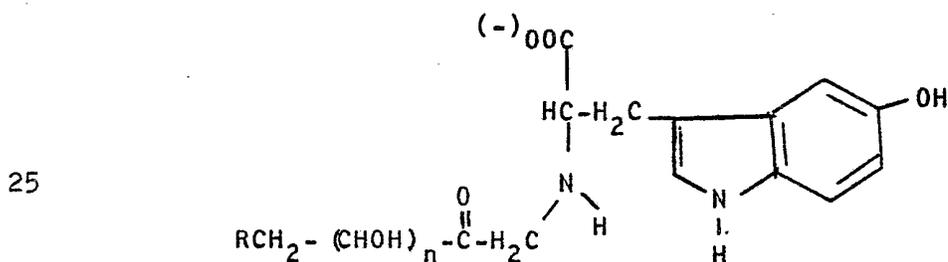
de Akio WAKAHARA et al, Bulletin of the Chemical Society of Japan, vol. 46, 2475-2480 (1973).

La présente invention concerne de nouveaux dérivés glucidiques du 5-hydroxytryptophane (5-HTP) dans lequel l'un au moins des atomes d'hydrogène du groupe amine primaire du 5-hydroxytryptophane est substitué par un groupe désoxy-1 céto-2 sucre. La substitution s'effectue sur l'atome de carbone 1 du sucre.

Des exemples préférés de sucres convenant pour les composés de l'invention sont les suivants:

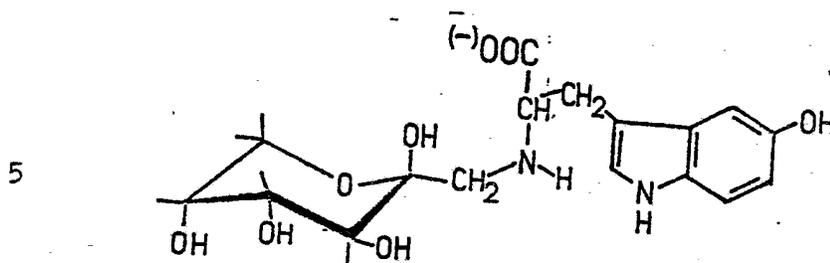
D-glucose (hexose),
 D-ribose (pentose),
 L-fucose (méthylpentose),
 melibiose (disaccharide),
 erythrose (tetrose),

Lorsqu'un seul des atomes d'hydrogène du groupe amine primaire est substitué, et lorsque le groupe glucidique est dans sa forme ouverte, les nouveaux dérivés peuvent être en particulier représentés par la formule:



30 dans laquelle R représente un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle et n est un nombre entier de 0 à 5.

Un composé particulièrement préféré selon l'invention est le N-1-désoxyfructo-5-hydroxytryptophane qui dérive du D-glucose et du 5-HTP et peut être représenté par la formule:



10 Les composés de l'invention peuvent être préparés par un procédé basé sur une réaction de type Amadori et caractérisé en ce qu'on met en présence au sein d'un solvant le 5-hydroxytryptophane et le sucre correspondant au dérivé sucré à préparer.

15 Les conditions générales de la réaction d'Amadori sont bien connues de l'homme de l'art et sont notamment décrites dans "Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. 2, Academic Press, N.Y. 1963, page 99", ainsi que dans l'article de John E. Hodge intitulé "The Amadori
20 rearrangement" dans "Advances in Carbohydrate Chemistry, vol. 10, Acad. Press 1965, p. 169. Toutefois, les conditions de mise en oeuvre du procédé de l'invention se distinguent de celles qui sont utilisées habituellement pour ce genre de réaction d'Amadori, lesquelles imposent
25 la présence d'un agent donneur de protons, tel qu'un acide, dans le milieu réactionnel. Selon l'invention, le procédé est grandement simplifié par le fait qu'il est inutile de recourir à un tel agent donneur de protons et qu'il suffit de mettre en présence dans un solvant
30 approprié le 5-HTP et le sucre choisi jusqu'à obtention du dérivé désoxy-1 céto-2 sucre voulu. Le groupe carboxyle du 5-HTP procure en effet les conditions réactionnelles favorables à la formation du dérivé du 5-HTP selon l'invention. Bien entendu, on peut aussi travailler en présence
35 d'un acide ou d'une amine.

Le milieu solvant est de préférence anhydre et comprend en général un alcool, tel qu'un alcool infé-

rieur, par exemple le méthanol, l'éthanol, le propanol ou l'isopropanol ou le dioxane, le diméthylformamide ou l'acétonitrile ou des mélanges compatibles de tels solvants, ou tout autre solvant usuel pour la synthèse des dérivés Amadori.

Il convient de mettre en présence au moins des quantités équimolaires de 5-HTP et d'aldose, mais pour augmenter le rendement et rendre la réaction complète, il est avantageux d'utiliser un excès de sucre, par exemple des proportions voisines de 1,5 moles de sucre pour 1 mole de 5-HTP. Le composé recherché précipite hors du milieu réactionnel. L'excès de sucre s'élimine ainsi très aisément.

Pour accélérer et favoriser la réaction, il est recommandé de chauffer le milieu réactionnel, en particulier jusqu'à la température d'ébullition du solvant (reflux). La réaction est poursuivie à une telle température jusqu'à devenir complète.

Le procédé décrit ci-dessus est d'application générale et permet de préparer n'importe quel composé désiré selon l'invention en partant de 5-HTP et du sucre approprié. On a indiqué précédemment des composés préférés de l'invention, mais il va sans dire que celle-ci englobe les dérivés obtenus à partir de l'un quelconque des aldoses suivants: le glycérose, le thréose, l'érythrose, le ribose, l'arabinose, le xylose, le lyxose, le gulose, l'idose, le glucose, le mannose, le galactose, le talose, l'allose, l'altrose, le rhamnose, le fucose, le 6-désoxyglucose ainsi que des disaccharides réducteurs tels que le melibiose, le maltose, le cellobiose et le lactose. Parmi les disaccharides réducteurs, on préfère le mélibiose. Avec les autres disaccharides, tels que le maltose, le cellobiose ou le lactose, la vitesse de la réaction et les rendements sont plus faibles, mais le procédé de l'invention est applicable. On notera qu'on peut mettre en oeuvre dans le procédé de l'invention

des sucres de la série D ou de la série L. De même les sucres épimères sont utilisables. L'invention englobe les dérivés obtenus quelle que soit la forme isomère optique des sucres de départ.

5 On notera aussi que les composés de l'invention peuvent être présents sous leur forme acide ou sous forme de sels. Compte-tenu de la destination des composés de l'invention, il est avantageux que les sels soient pharmaceutiquement acceptables. Les sels alcalins et
10 alcalino-terreux, les sels d'ammonium, les sels avec des amines primaires, secondaires ou tertiaires sont utilisables: les sels de sodium, de potassium, d'ammonium, de magnésium et d'amines primaires inférieures, telles que l'éthanolamine, sont préférés.

15 Les nouveaux composés de l'invention sont caractérisés notamment par leur pouvoir réducteur, qui peut être mesuré par le réactif de Tillman ou dichloro-2,6-phénol-indophénol [voir la référence H.V. EULEUR et al. Arkiv S. Kemi, 12, 85, (1957)]. Les sucres dont
20 ils dérivent sont sans effet sur un tel réactif. Pour apprécier le pouvoir réducteur, on peut également faire appel à d'autres réactifs connus de l'homme de l'art et capables, par exemple, d'agir sur l'acide ascorbique. Cependant, le moyen de caractérisation le plus commode
25 est le réactif de Tillman.

Les nouveaux composés de l'invention, qu'ils soient sous forme libre ou sous forme de leurs sels, sont des agents actifs comme médicaments. Leur principal intérêt est d'être des agents antilépreux.

30 On a déjà décrit l'activité antilépreuse de certains dérivés de la sérotonine, voir les articles:

P. Jayaraman, P.R. Mahadevan, M. Mester et L. Mester "Inhibition of the incorporation of (³H)-DOPA in Mycobacterium leprae by desoxyfructo-serotonin",
35 Biochem-Pharm., 29, 2526 (1980)
et L. Mester et S. Balakrishnan "Desoxyfructo-serotonin:

first human metabolite with antileprosy activity, Acta Leprologica, n°83, 21 (1981).

Ainsi, l'activité antilèpreuse de la désoxyfructosérotinine in vitro et in vivo a-t-elle été déjà
5 décrite. Les dérivés désoxy-1 céto-2 sucre de la sérotonine possèdent d'autres propriétés pharmacologiques: par exemple, ils sont efficaces comme radioprotecteurs et ils inhibent l'agrégation plaquettaire induite par la sérotonine. De tels dérivés, en particulier la désoxy-
10 fructo-sérotinine, ont fait l'objet de la demande de brevet français 75 22 577 (publication n° 2.317.937) au nom de l'Etablissement public dit: Agence Nationale de Valorisation de la Recherche (Anvar) ayant pour titre "Nouveaux dérivés de la sérotonine". Ladite demande
15 est introduite à titre de référence dans la présente description et son enseignement est accessible à l'homme de l'art. Elle décrit aussi l'obtention de tels dérivés de la sérotonine par un procédé mettant en jeu la réaction d'Amadori en présence d'un agent donneur de protons.

20 Les nouveaux composés de l'invention sont des agents anti-lèpreux plus avantageux que les dérivés de la sérotonine, car, à activité égale, ils ont une action de plus longue durée. Leur toxicité est nettement plus faible dans les mêmes conditions. On donne également
25 ci-après les résultats d'une étude comparative concernant les métabolites des dérivés désoxy-céto-sucres de la sérotonine d'une part et du 5-hydroxytryptophane d'autre part. Ces résultats montrent que les métabolites mis en évidence dans le sang des animaux traités sont différents, ce qui indique un mécanisme d'action différent.
30 Il apparaît donc que, dans l'action antilèpreuse, les dérivés selon l'invention du 5-hydroxytryptophane ne se comportent pas comme des précurseurs des dérivés correspondants de la sérotonine, contrairement à ce qui
35 aurait pu être prévu étant donné que le 5-hydroxytryptophane seul est un précurseur de la sérotonine. Les déri-

vés désoxy-1 céto-2 sucres du 5-hydroxytryptophane ne sont pas, en revanche, de simples précurseurs des dérivés correspondants de la sérotonine. Leur comportement propre dans l'activité antilèpreuse constitue une caractéristi-
5 que importante et inattendue de la présente invention.

Ainsi qu'on l'a mentionné précédemment, les nouveaux composés de l'invention sont utiles comme agents actifs de médicaments, surtout comme agents antilè-
preux. Ils peuvent cependant recevoir aussi d'autres
10 applications dans des domaines où le 5-hydroxytryptophane est déjà connu comme possédant une action thérapeuti-
que, par exemple comme psychotropes.

L'invention concerne aussi des compositions pharmaceutiques, contenant une quantité efficace d'au
15 moins un composé de l'invention ou d'un de ses sels physiologiquement acceptables en association avec un véhicule convenant pour l'administration considérée.

Des compositions convenant à l'administra-
tion orale se présentent par exemple sous forme de gélules
20 ou de comprimés. Les excipients à utiliser sont traditionnels et entièrement à la portée de l'homme de l'art. D'autres compositions utilisables sont celles convenant à l'administration locale, et qui se présentent par exem-
ple sous forme de lotions ou de pommades. Les lotions
25 à base aqueuse sont faciles à préparer car les nouveaux composés sont aisément solubles dans l'eau. On peut encore utiliser les produits de l'invention en injections sous-cutanées, par exemple dans la technique connue sous le nom de mésothérapie. Une forme galénique intéres-
30 sante consiste en une composition injectable par voie intraveineuse, qu'on obtient, par exemple, par dissolution du composé actif dans l'eau distillée avec addition éventuelle de tensioactifs ainsi qu'il est bien connu de l'homme du métier.

35 Pour le traitement de la lèpre, la posologie à employer dépend de la voie d'administration et

de la gravité des zones atteintes par la maladie. En règle générale des doses de 20 mg par kg de poids et par jour sont des doses maximales. Les quantités efficaces se situent le plus souvent entre 2 et 10 mg/kg et 5 par jour en administration orale. De telles doses sont à absorber quotidiennement en plusieurs prises.

Des études in vitro et in vivo chez la souris ont mis en évidence l'activité antilèpreuse des nouveaux composés de l'invention. La durée du traitement, 10 avec la posologie mentionnée ci-dessus, pourra évidemment varier dans de larges limites. Des durées prolongées sont rendues possibles grâce à la faible toxicité des nouveaux composés. De plus ceux-ci exercent une action plus durable que les dérivés correspondants de la sérotonine. 15

L'invention est encore illustrée, sans être aucunement limitée, par la description ci-après qui concerne des exemples de préparation de composés représentatifs de la présente invention et des résultats 20 d'études pharmacologiques.

EXEMPLE 1

Préparation de N-1-désoxyfructo-5-hydroxytryptophane

220 g (1 mole) de 5-hydroxytryptophane et 270 g (1,5 mole) de D-glucose sont chauffés à environ 25 64°C dans 10 l de méthanol pendant 8 heures.

On évapore la solution ainsi obtenue à la moitié de son volume. Par addition de 40 l d'acétate d'éthyle on précipite 400 g de désoxyfructo-5-hydroxytryptophane. Si nécessaire, on peut renouveler la précipitation afin de purifier le produit. 30

	C%	H%	N%
<u>Desoxyfructo-5HTP</u>			
$C_{17}H_{22}O_8N_2 = 382,36$	Calculé: 53,40	5,80	7,33
	Trouvé: 53,68	6,28	7,76
	53,78	6,08	7,45

Le produit se caractérise par son pouvoir réducteur mesuré sur le réactif (solution) de Tillman: on trouve que 1/20 mMole réduit 12 ml de solution de Tillman.

5 Le 1-désoxyfructo-5-hydroxytryptophane est facilement soluble dans l'eau. Il est insoluble dans le benzène, l'acétate d'éthyle et le chloroforme.

Les valeurs caractéristiques des spectres RMN du carbone-13 sont indiquées dans le Tableau 1 qui
10 suit.

Il a été également mis en évidence par une variante de la méthode RMN du carbone 13, dite NORD Voir "Carbon-13 NMR Spectroscopy" J.B. Stothers, Academic Press, 1973 que le carbone en position 2 est quaternaire, ce qui prouve la présence d'un produit Amadori.
15 EXEMPLES 2 à 5

On a préparé d'autres composés de l'invention en chauffant à 64°C environ, une mole de 5-hydroxytryptophane et 1,5 mole environ de sucre dans le méthanol
20 pour obtenir des 1-désoxy-2-cétoglycosyltryptophanes conformément à la technique de l'exemple 1.

Après migration sur couche mince de cellulose dans un mélange de butanol: eau: acide acétique (5:3:2), et révélation par la ninhydrine ou par TTC,
25 chacun de ces dérivés glucidiques montre une tache différente du produit de départ.

Les sucres ci-après ont été utilisés comme matières premières: D-ribose (exemple 2), L-fucose (exemple 3), mélibiose (exemple 4), érythrose (exemple 5).

30 Avec le réactif de Tillman, les volumes de solution de réactif capables d'être réduits par 1 mMole/20 sont les suivants:

	5-HTP + D-ribose (exemple 2)	: 12 ml
	5-HTP + L-fucose (exemple 3)	: 10 ml
35	5-HTP + melibiose (exemple 4)	: 8 ml
	5-HTP + erythrose (exemple 5)	: 6 ml

Les analyses élémentaires ont donné les résultats ci-après:

		C%	H%	N%	
	<u>Desoxyribulo-5HTP (Ex. 2)</u>				
5	$C_{16}H_{20}O_7N_2 = 352,34$	Calculé :	54,54	5,72	7,95
		Trouvé :	54,40	6,02	7,12
			54,35	6,02	7,08
	<u>Desoxyfucosyl-5HTP (Ex. 3)</u>				
10	$C_{17}H_{22}O_7N_2 = 366,36$	Calculé :	55,73	6,05	7,65
		Trouvé :	55,18	6,69	6,59
			54,92	6,57	6,32
	<u>Desoxymelibio-5HTP (Ex. 4)</u>				
	$C_{23}H_{32}O_{13}N_2 = 544,50$	Calculé :	50,70	5,92	5,17
15		Trouvé :	48,52	6,78	4,97
			48,80	6,64	4,97
	<u>Desoxyerythro-5HTP (Ex. 5) sous forme de méthanolate</u>				
	$C_{16}H_{22}O_7N_2 = 354,35$	Calculé :	54,23	6,26	7,91
		Trouvé :	53,70	6,06	7,75
			53,43	5,96	7,74

20 Les valeurs caractéristiques des spectres RMN du carbone-13 des divers composés sont rassemblées dans le tableau 1.

TABLEAU 1
VALEURS CARACTERISTIQUES DES SPECTRES RMN DU CARBONE 13
DES DERIVES DESOXY-1 CETO-2 GLYCOSYL DU 5-HYDROXYTRYPTOPHANE

5

Composés dans D ₂ O	5-HTP	DF-5HTP (Ex. 1) D-Glucose	DRi-5HTP (Ex. 2) D-Ribose	DFu-5HTP (Ex. 3) L-Fucose	DM-5HTP (Ex. 4) Melibiose	DEr-5HTP (Ex. 5) Erythrose
10						
C ₂	126,9	127,0	126,7	127,0	127,1	127,0
15						
C ₃	106,7	107,5	107,1	107,2	107,5	107,9
C ₄	113,6	113,7	113,4	113,6	113,9	113,7
C ₅	149,7	149,9	149,6	149,8	150,1	149,7
20						
C ₆	112,7	112,5	112,5	112,5	112,6	112,5
C ₇	103,2	103,8	103,4	103,4	103,7	103,4
C ₈	132,4	132,6	132,3	132,5	132,7	132,5
C ₉	128,1	128,4	127,9	128,0	128,5	128,0
25						
α	54,4	62,7	63,6	62,6	62,3	62,4
β	26,7	27,4	26,3	27,5	26,0	27,5
C ₁		50,0	50,8	50,7	50,6	50,6
30						
C ₂		96,2	103,7	103,6	102,5	206,3
C ₃		71,4	72,4	73,4		72,8
C ₄		70,8	73,5	76,8		62,7
C ₅		69,9	78,3	79,9		- -
35						
C ₆		64,0	- -	19,2		- -
COOH	173,2	174,2	173,7	175,6	174,2	175,6

Les autres
signaux de
60 à 100 ppm
correspondent au
mélibiose

Etudes pharmacologiques des dérivés glucidiques du 5-hydroxytryptophane

Les études pharmacologiques effectuées avec les dérivés glucidiques du 5-hydroxytryptophane n'ont montré aucune toxicité ou effet secondaire indésirable. La valeur DL_{50} i.p. pour tous ces dérivés a été trouvée voisine de 800 mg/kg et la valeur DL_{50} i.v. est supérieure à 5 g/kg.

Les études suivantes ont été exécutées:

- 10 1. Profil pharmacologique général du désoxyfructo-5-hydroxy-tryptophane ou DF-5-HTP (composé de l'exemple 2)
2. Profil pharmacologique général du désoxyribulo-5-hydroxytryptophane (composé de l'exemple 3).
- 15 3. Activité anti-stress du DF-5 HTP
4. Activité cardiovasculaire du DF-5 HTP
5. Activité du DF-5HTP sur l'incorporation de la DOPA dans les Mycobactéries de la lèpre.
- 20 6. Activité du DF-5 HTP sur les M. Leprae sur les pattes des souris.
- 7.. Inhibition exercée par le DF-5HTP sur l'enzyme DOPA-oxydase par comparaison avec la désoxyfructosérotinine (DFS).
- 25 8. Métabolisme in vivo du DF-5HTP comparé à celui de la DFS.

Les résultats relatifs au profil pharmacologique général du DF-5HTP sont rassemblés dans le tableau 2, qui contient aussi les informations correspondantes relevées dans les mêmes conditions pour le 5-HTP. Les mesures ont été faites à 15,30 et 60 minutes après l'administration par voie intrapéritonéale (i.p.) à des souris.

Le tableau 3 est un tableau similaire au tableau 2, qui rassemble les résultats concernant le 5-HTP et le désoxyribulo-5HTP (composé de l'exemple 2); les mesures ont été faites 15 minutes après l'administration.

Aux tableaux 2 et 3, les mesures des divers paramètres étudiés ont été faites conformément aux protocoles indiqués dans les références bibliographiques suivantes:

- 5 Activité motrice spontanée: MODIGH, K., Central and peripheral effects of 5-hydroxytryptophan on motor activity in mice. *Psychopharmacologia* (Berlin), 23, 48, 1972.
Cadence respiratoire: GARATTINI, S., and VALZELLI, L. Serotonin and cardiovascular system, Chapter 9, in "Serotonin", Elsevier Publ.Co.Amsterdam 1965.
- 10 COHEN, Y. and BLANCHARD, P. Influence de la chélation du calcium sur les effets tensionnels de la sérotonine chez le chien. *J. Physiol.*, 52, 569, 1960.
BRAUNWALD, E. Control of myocardial oxygen consumption:
15 Physiologic and clinical considerations. *Am. J. Cardiol.*, 27 (4), 416, 1971.

- "Rotarod": KINNARD, Wm. J. jr. and CARR, C.J. A preliminary procedure for evaluation of central-nervous-system depressants. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 121, 354,
20 1957.

- Activité anticonvulsivante (MES): % de protection
Temps de sommeil au pentobarbital: WYATT, R.J., ZARKONE, V. ENGELMANN, K., DEMENT, W.C., SMYDER, F. and SJOERDSMA, A., Effects of 5-Hydroxytryptophan on the sleep of normal
25 human subjects. *Electroencephaly and Clinical Neurophysiology*, 30, 505, 1971.
Catatonie: BOISSIER, J.R. and SIMON, P., Catalepsie...
Thérapie, 18, 1257, 1963.

Le tableau 4 contient des indications résumées sur l'activité anti-stress du DF-5HTP comparée à celle du 5-HTP. Les essais ont été réalisés conformément aux protocoles indiqués dans les références bibliographiques ci-après:

BONFILS, S., LIEFOOGHE, GK, ROSSI, G. and LAMBLING, A.

L'ulcère de contrainte du Rat blanc. Modifications de la fréquence lésionnelle par différents procédés opératoires et pharmacodynamiques. C.R. Soc. Biol., 151, 1149, 1957.

- 5 BONFILS, S., ROSSI, G., LIEFOOGHE, G. and LAMBLING, A.,
 Ulcère expérimental de contrainte, I.: Méthodes, fréquence des lésions, modifications par certains procédés techniques et pharmacologiques. Rev. franç. Etudes clin. biol., 4, 146, 1959.

- 10 La leucocytose a été induite par injection sous-cutanée de 0,1 ml de lait avant le traitement d'essai, selon le protocole de BREKHMANN, I.I. and DARDYMOV, I.V. Substances of plant origin which increase non specific resistance. Annu. Rev. Pharmacol. 9, 419, 1969.

- 15 Au tableau 4, la lettre N désigne le nombre d'animaux (souris). Un astérisque indique une activité importante. Deux astérisques indiquent une possibilité d'activité positive. Dans l'essai d'endurance à la nage, on a observé les souris jusqu'à 540 minutes, la durée
 20 moyenne de nage pour les souris témoins étant de 385 ± 31 minutes.

- Le tableau 5, contient des résultats d'essais concernant l'activité cardiovasculaire du DF-5HTP comparée à celle du 5-HTP. Le protocole expérimental
 25 était celui décrit dans "Sugar Derivatives of Indolamines. Part V: Cardiovascular Effects and "Anti-stress" Activity of Desoxyfructose Derivative of Serotonin and 5-Methoxy-tryptamin", L. Mester, M. Mester, K.P. Bhargava, C. Labrid, G. Dureng and M. Cheucle, THROMBOSIS RESEARCH,
 30 15, 245, 1979.

- Le tableau 6 rassemble des résultats d'essai concernant l'activité du DF-5HTP sur l'incorporation de la DOPA dans les Mycobactéries de la lèpre. Le protocole expérimental était celui décrit dans JAYARAMAN,
 35 P., MAHADEVAN, P.R., MESTER, M. and MESTER, L. Inhibition of the incorporation of ^3H -DOPA in Mycobacterium

leprae by Desoxyfructo-serotonin. Biochem. Pharm., 29
2526,1980.

5 On a inoculé 5×10^6 M.leprae par tube; le milieu
était un tampon phosphate à pH 6,8. La quantité de 3H-DOPA
était de 1μ Ci/tube.

Le tableau 7 contient les résultats d'essai concer-
nant l'activité du DF-5HTP sur les M.leprae sur les pattes
de souris. Le protocole expérimental était le suivant:
MESTER, L., and BALAKRISHNAN, S., Desoxyfructo-serotonin:
10 First Human Metabolite with Antileprosy Activity. Acta
Lepr. N°83, 21,1981.

La dose de DF-5HTP était de 0,5 mg par 5 g de nourri-
ture et par souris. Cette dose était administrée tous les
jours à partir de la date d'inoculation. Les essais ont porté
15 sur un lot de 24 souris.

D'autres essais ont été entrepris pour mesurer l'inhi-
bition exercée par la DF-5HTP dans le système DOPA-oxydase
+ DOPA, par comparaison avec la désoxyfructosérotinine
(DFS). Pour ce qui concerne l'inhibition de la DOPA-oxydase,
20 on pourra se reporter à la méthode de N.H. Horowitz, M.Fling et
et G. Horn "Tyrosinase", dans Methods in Enzymology
Vol.XVII-A, p.615, Editors: Tabor and Tabor, Ac. Press,
1970.

L'effet de la désoxyfructo-sérotinine sur les
25 Mycobactéries de la lèpre est attribué à son effet inhibi-
teur sur la DOPA-oxydase de M.leprae. Une DOPA-oxydase
semblable, isolée de champignons, est commercialisée (SIGMA)
et a servi comme modèle afin de comparer l'effet inhibiteur
de la DFS et du désoxyfructo-5-hydroxytryptophane sur cette
30 DOPA-oxydase. La figure 1 montre que le dérivé sucré
du 5-hydroxytryptophane possède un effet inhibiteur propre
et différent de celui de la DFS.

TABLEAU 2

	5 HTP		DF-5HTP		
	50 mg/kg (ip)	100 mg/kg (ip)	100 mg/kg (ip)	174 mg/kg (ip)	
Activité motrice spontanée	sans effet	d'abord légère augmentation et ensuite diminution	légère augmentation	augmentation	
Cadence respiratoire	sans effet	légère augmentation	sans effet	sans effet	
Hypersensibilité au bruit	+	++	"	"	
Défécation	+	++	"	"	
Essai à la tige Rotarod Min.	Défaut de coordination musculaire observé (Nbre de souris)				
15	1/5	4/5	0/5	0/5	
30	1/5	3/5	0/5	0/5	
60	0/5	3/5	0/5	0/5	
Tamis incliné					
15					
30	Pas d'effets neurotoxiques				
60	"				
Activité anticonvulsivante					
MES*	15	20	50	0	20
% protection	30	25	33,3	0	20
	60	25	-	0	0
Temps de sommeil au pentobarbital % du témoin (témoin = 100)	15	285	295	140	93
	30	222	276	114	95
	60	136	279	103	91

*MES = acide 2-(N-morpholino) éthane sulfonique

TABLEAU 3

	5HTP 100 mg/kg i.p.	Désoxy ribulo-5HTP 100 mg/kg i.p.
Activité motrice spontanée	Légère augmentation	sans effet
Cadence respiratoire	Légère augmentation	sans effet
Hypersensibilité au bruit	oui	oui (à un degré moindre)
Défécation	oui	oui (à un degré moindre)
Essai à la tige Rotarod	Défaut de coordination neuromusculaire observé (4 souris sur 5)	Défaut de coordination neuromusculaire présent à un très faible degré (1 souris sur 5)
Tamis incliné	Pas d'effet neurotoxique	Pas d'effet neurotoxique
Essai de grimpe sur un baton vertical	Sans effet	Sans effet
Activité motrice (Photactametre)	Utilisé comme témoin pour comparer le dérivé sucre	Augmentation pendant les 40 premières min. et ensuite diminution
Temps de sommeil au pentobarbital % du témoin (Témoin à 100)	467,7 min.	309,2 min.
Activité anticonvulsivante		
1.MES	60%	20%
2.Pentylène-tetrazol	0%	0%
Essai à la morphine	Négatif (pas d'antagonisme)	Négatif (pas d'antagonisme)
DL ₅₀ (ip) en toxicité aigue	> 800 mg/kg	> 800 mg/kg
Catatonie	non	non

TABLEAU 4
 ACTIVITE ANTI-STRESS DE 5-HTP ET DF 5-HTP

Composés	Dose mg/kg i.p.	Endurance à la nage		Effet anti-ulcère chez le rat (18 heures sous con- trainte		ACTIVITE (Effet sur la leu- cocytose induite par le lait	Performance à l'essai Rotarod
		% d'aug- mentation	% Ulçè- ration	Indice d'UL- cération (N)	Moyenne T.L.C./Cmm (N)		
1. Témoin	Solution saline		90	34 (10)	23866 ± 214 (10) (lait seulement)	11,3 ± 3,1 (30)	
2. 5-HTP	100	40**	100	30 (4)	10100 ± 68* (10)	66,2 ± 6,4* (30)	
3. DF-5HTP	174	40**	50	10** (4)	10468 ± 130* (8)	16,4 ± 2,4 (30)	

(N) - représente le nombre d'animaux

* - activité importante

** - activité positive possible

Pour l'endurance à la nage, les souris ont été observées jusqu'à 540 min, la durée moyenne de nage chez les souris témoins était de 385 ± 31 min.

*** - La leucocytose a été induite par 0,1 ml de lait (sous-cutané) avant traitement avec le médicament.

TABLEAU 5
EFFETS CARDIOVASCULAIRES DU 5-HYDROXYTRYPTOPHANE ET DE SES DERIVES GLUCIDIQUES

Composé	Tension sanguine (en mm Hg)				Rythme cardiaque (pulsations/min)				REPONSE CO ⁺⁺ (mm)						
	EFFET Valeur base	Modifi- cation	Mesure (Min)	Pic (Min)	Durée (Min)	EFFET Valeur base	Modifi- cation	Mesure (Min)	Pic (Min)	Durée (Min)	EFFET Valeur de base	Modifi- cation	Mesure (Min)	Pic (Min)	Durée (Min)
DF 5-HTP*	76	- 12	1	5	50	180	- 20	30	75	non mani- festée à 150	28	+ 18	30	30	120
-do- ⁺	76	- 26	immé- diat	1	30	170	- 20	5	10	45	28	- 8	1	1	45
5-HTP*	78	- 32	1	15	240	160	- 40	5	30	non mani- fes- tae jus- qu'à 240	32	- 24	1	10	105
-do- ⁺	76	- 28	1	10	60	140	+ 20	1	30	60	32	+ 20	5	15	45

* : administration d'une dose de 10 mg par voie cérébroventriculaire
+ : injection d'une dose de 100 mg par voie intraveineuse
++ : réponse à l'obstruction de la carotide

TABLEAU 6

INHIBITION PAR LA DESOXYFRUCTO-SEROTONINE (DF-5HT) ET LA DESOXYFRUCTO-5-HYDROXY
TRYPTOPHANE (DF-5HTP) DE L'INCORPORATION DE ³H-DOPA PAR M. LEPRAE IN VITRO

ESSAIS:	Armadillo M. Leprae N° 2275/5	Armadillo M. Leprae N° 2457/103	Armadillo M. Leprae N° 2275/5	Armadillo M. Leprae N° 2457/103	Tués par la chaleur
<u>Tubes frais</u> (témoins)	5977	4215	915	2855	
+ <u>DF-5HT:</u>					
1 µg/ml	2431	2575	410	2110	
5 µg/ml	2264	1485	566	1640	
+ <u>DF-5HTP:</u>					
1 µg/ml	2922	2555	1008	2660	
5 µg/ml	1599	1930	732	2675	

Protocole: Chaque tube de 0,5 ml est inoculé de 5×10^6 M. leprae et de 1 µCi de ³H-DOPA
Après 6 heures, l'incorporation de la DOPA radioactive est enregistrée en DPM
selon la technique utilisée dans JAYARAMAN, P., MAHADEVAN, P.R., MESTER, M. and
MESTER, L. Inhibition of the Incorporation of ³H-DOPA in Mycobacterium leprae
by Desoxyfructo-serotonin. Biochem. Pharm., 29, 2526, 1980.

TABLEAU 7

INHIBITION DE LA MULTIPLICATION DE M. LEPRAE SUR LES PATTES DES SOURIS
PAR ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE DE 20 MG/KG DE DF-5HTP

Mois après inoculation	Témoins	Traité par DF-5HTP
4	33,8 X	2,8 X
6	38,4 X	Négatif

Protocole: Sur la patte de chaque souris on a inoculé 5×10^6 M.leprae montrant un index morphologique (I.M.) = 2%. Les chiffres suivis par X indiquent la multiplication de M. leprae initialement inoculé. (Pour la méthode utilisée voir MESTER, L., and BALAKRISHNAN, S., Desoxyfructo-serotonin: First Human Metabolite with Antileprosy Activity, Acta Lepr. N° 83, 21, 1981.

TABLEAU 8

Indication par électrophorèse à haute tension des métabolites de la désoxyfructo-sérotinine et du désoxyfructo-5-hydroxytryptophane radioactifs dans le plasma des hamsters après administration par voie buccale de ces produits

Produits administrés 2 h plus tôt	Métabolites radioactifs (DPM/ml plasma)			
	DF-5HT	DF-5HTP + 5HTP	5-HT	HIAA* + IAA**
DF-5HT	35,000	- - - -	5.000	5.000
DF-5HTP	6.000	25.000	5.000	19.000
Produits administrés 5 h plus tôt				
DF-5HT	7.000		2.000	2.000
DF-5HTP	5.000	16.000	4.000	13.000
Produits administrés 24 h plus tôt				
DF-5HT	1.000		500	1.000
DF-5HTP	3.000	6.000	3.000	3.000

HIAA* = acide 5-hydroxy indol-acétique

IAA** = acide indol-acétique

La figure 1 est un graphique dans lequel on a porté en abscisses la concentration de l'agent de traitement utilisé et en ordonnées les valeurs de la coloration du milieu mesurée à 540 m μ , celles-ci étant en effet représentatives de la concentration en substance capable de colorer le milieu. En présence d'un inhibiteur, la formation de la coloration est empêchée. Ainsi, plus les valeurs portées en ordonnées sont faibles, meilleure est l'inhibition procurée par le composé essayé. On notera qu'aux concentrations habituellement utilisées, qui sont inférieures à 10^{-4} M, l'activité inhibitrice du DF-5HTP est comparable à celle de la DFS.

Les essais ci-dessus démontrent in vitro et in vivo l'efficacité du DF-5HTP comme agent antilepreux. En particulier, l'administration de DF-5HTP empêche la multiplication des mycobactéries M. Leprae sur les pattes de souris.

On a également fait des essais pour apprécier le métabolisme in vivo du DF-5HTP par comparaison avec la DFS. Le tableau 8 contient les résultats obtenus avec la DFS et le DF-5HTP radioactifs et les conditions dans lesquelles l'expérimentation a été réalisée.

La mesure de la radioactivité des diverses fractions isolées du sang des hamsters traités permet de caractériser les métabolites, lesquels sont ainsi isolés et identifiés par électrophorèse. Les métabolites acides HIAA et IAA sont séparés ensemble. L'examen des résultats montre des différences importantes de comportement entre le DF-5HTP et la DFS. Les métabolites acides issus du DF-5HTP sont en beaucoup plus grande quantité que ceux provenant de la DFS. Le DF-5HTP ne se transforme que faiblement en DFS, et contrairement à la DFS, il subsiste une quantité considérable de DF-5HTP non transformé. Ainsi le DF-5HTP ne se comporte pratiquement pas en précurseur de la DFS.

La figure 2 est un graphique illustrant le

métabolisme de la DFS et du DF-5HTP dans le plasma du hamster (essai in vivo). On a porté le temps en abscisses (exprimé en heures) et en ordonnées le pourcentage du composé caractérisé dans le plasma. La courbe (A) indique le pourcentage de DFS non transformée, la courbe (B) (en pointillés) représente le pourcentage du DF-5HTP non transformé et la courbe (C) représente le pourcentage cumulé du DF-5HTP non transformé et de la DFS formée au cours du métabolisme du DF-5HTP.

On constate que le niveau de la DFS tombe à une valeur insignifiante au bout de 4 heures. Par contre, le taux du DF-5HTP reste considérable même après 24 heures.

D'autres études pharmacologiques ont été entreprises, en particulier pour apprécier la toxicité aigue chez la souris. Les divers produits étudiés sont administrés à doses croissantes en progression arithmétique à des lots de 5 souris femelles SWISS, EOPS, NMRI/Han pesant 23 à 24 g.

Les produits sont solubilisés dans l'eau distillée. Les DL 50 sont calculées par la méthode de BEHRENS (B.) et KARBEL (C.). Le nombre d'animaux survivants dans les différents lots est vérifié 15 jours après l'administration des produits. La toxicité aigue (DL 50) exprimée en g/kg est supérieure à 5, avec la voie d'administration i.v. pour le DF-5HTP un produit représentatif selon l'invention.

On a également effectué des essais sur les tremblements qu'on constate après l'administration du 5-HTP en les comparant aux résultats obtenus avec le DF-5HTP selon l'invention. Les conditions expérimentales étaient les suivantes:

Chez des souris prétraitées par un inhibiteur de la MAO (Harmaline 25 mg/kg/P.O.), l'injection de 5HTP (1 heure après l'IMAO) entraîne l'apparition de tremblements plus ou moins généralisés, accompagnés.

ou non d'hyperactivité motrice et qui sont dus à l'accumulation de sérotonine non dégradée au niveau des récepteurs post-synaptiques cérébraux. On peut établir pour chaque souris une cotation chiffrée suivant l'intensité des symptômes observés au cours du temps (cotation toutes les 5 min. entre la 5ème et la 45ème min. après l'injection de 5 HTP puis toutes les 15 min. jusqu'à la 75ème min.).

On additionne en un score total tous les chiffres obtenus aux différents temps sur des lots de 5 ou 10 souris.

Les actions du 5 HTP ont été comparées à celles du DF-5HTP.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 9 qui suit.

TABLEAU 9

Produits	Doses mg/kg	Voie	Score total	Nombre d'animaux
5 HTP	75	S.C.	146	5
DF-5HTP	150*	S.C.	0	5
	500	S.C.	0	5

* dose correspondant à 75 mg/kg de 5 HTP mole à mole

Dans ces conditions expérimentales le DF-5HTP se révèle inactif. Les activités indésirables du 5-HTP, par exemple le tremblement, disparaissent en cas d'utilisation du DF-5HTP.

On a encore effectué des essais pour apprécier la quantité de sérotonine (5-HT) libérée dans le cerveau lors de l'administration des produits de l'invention par comparaison aux résultats obtenus avec le 5-HTP. Les quantités de sérotonine ont été estimées par une méthode spectrophotofluorométrique, telle que décri-

te par Solomon et al. Biochem. Pharmacology 14, 831 (1965).
Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le Tableau
10 ci-après.

TABLEAU 10

Quantités de 5-HT (dans tout le cerveau) après administra-
tion de 5-HTP et ses dérivés sucrés

5	N°	Composé	Dose mg/kg i.p.	Quantités de 5-HT*		
				15 min.	30 min.**	60 min.**
	1.	Solution Saline	-	60,0	107	100
	2.	5-HTP	100	187,5	248,6	150,9
10	3.	DF-5HTP	100	87,5	-	-
	4.	DF-5HTP	174	75,0	200,4	160,8
	5.	D-Ribulo- 5HTP	160	92,5	-	-

15

* Chaque valeur représente la moyenne de quatre animaux
d'expérience (souris)

** La concentration de 5-HT est exprimée par gramme de
20 tissu frais (cerveau).

Les résultats du tableau 10 montrent notam-
ment que des quantités équimoléculaires de 5-HTP (100 mg)
et de DF-5HTP (175 mg) libèrent au bout d'une heure la
même quantité de sérotonine dans le cerveau. Une telle
25 observation est très importante d'autant qu'en même temps
les effets secondaires indésirables du 5-HTP disparaissent
lors de l'administration du DF-5HTP.

Il est également intéressant de noter qu'à une concentration de 10^{-4} Mol et à 25°C, la desoxyfructosérotinine (DF-5HT) inhibe à 90% l'incorporation de la sérotonine (5-HT) dans les cellules des neuroblastomes in vitro, tandis que le DF-5HTP est sans effet à cette température sur ce phénomène. Ceci permet de supposer une restauration plus rapide des réserves de sérotonine de l'organisme en utilisant le desoxyfructo-5-HTP.

Ces résultats sont mis en évidence dans le tableau 11 ci-après.

TABLEAU 11

INHIBITION DE L'INCORPORATION DE LA SEROTONINE
DANS LES CELLULES NERVEUSES PAR LA DF-5HT ET LE DF-5HTP

Inhibiteurs	% Inhibition à 25°C	% Inhibition à 0°C
DF-5HT	90	95
DF-5HTP	0	50

En résumé, les résultats ci-dessus montrent que le DF-5HTP n'est pas un précurseur de la DFS et que, pour un effet anti-lépreux sensiblement équivalent, l'action du DF-5HTP se poursuit dans le temps largement au-delà de celle de la DFS. Cette propriété, ajoutée à la toxicité nettement moindre du DF-5HTP, prouve la supériorité du nouveau composé vis-à-vis de la DFS.

Ainsi, l'invention procure de nouveaux dérivés glucidiques du 5-hydroxytryptophane, en particulier le DF-5HTP, qui sont des agents antilépreux de valeur.

REVENDEICATIONS

1. Nouveaux dérivés glucidiques du 5-hydroxytryptophane (5-HTP) dans lequel l'un au moins des atomes d'hydrogène du groupe amine primaire du 5-hydroxytryptophane est substitué par un groupe désoxy-1 céto-2 sucre.

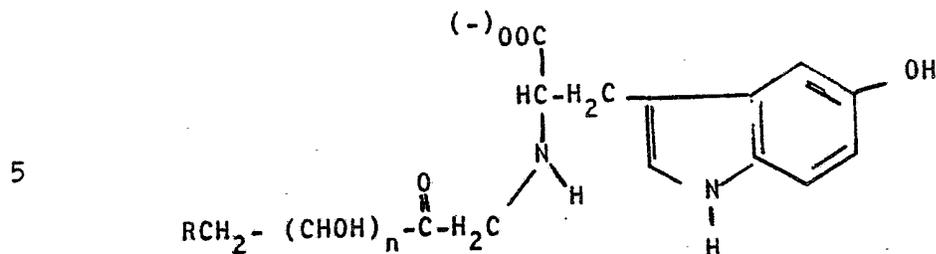
2. Dérivés glucidiques du 5-HTP selon la revendication 1 caractérisés en ce que le composant sucré provient de l'un quelconque des aldoses suivants: le glycérose, le thréose, l'érythrose, le ribose, l'arabinose, le xylose, le lyxose, le gulose, l'idose, le glucose, le mannose, le galactose, le talose, l'allose, l'altrose, le rahamose, le fucose, le 6-désoxyglucose ou de disaccharides réducteurs, tels que le melibiose, le maltose, le cellobiose et le lactose.

3. Dérivés glucidiques du 5-HTP selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisés en ce que le composant sucré appartient à la série D et/ou à la série L.

4. Dérivés glucidiques du 5-HTP selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que le composant sucré est choisi parmi les composés ci-après ou leurs isomères:

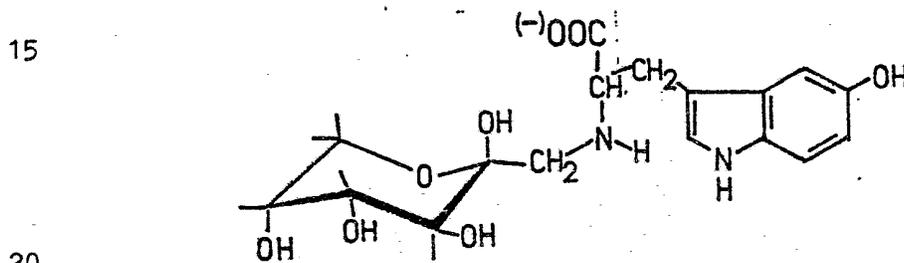
D-glucose (hexose),
D-ribose (pentose),
L-fucose (méthylpentose),
melibiose (disaccharide),
érythrose (tetrose)

5. Dérivés glucidiques du 5-HTP selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 répondant à la formule



dans laquelle R représente un atome d'hydrogène ou un
groupe hydroxyle et n est un nombre entier de 0 à 5.

6. Le N-1-désoxyfructo-5-hydroxytryptophane ou DF-5HTP de formule:



7. Dérivés glucidiques du 5-HTP selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, sous forme libre (acide) ou sous forme de leurs sels, en particulier les sels pharmaceutiquement acceptables, tels que les sels alcalins et alcalino-terreux, les sels d'ammonium, ou avec des amines primaires, secondaires ou tertiaires.

8. Procédé pour l'obtention des dérivés glucidiques du 5-HTP selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 par une réaction de type Amadori, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'on met en présence au sein d'un solvant le 5-hydroxytryptophane et le sucre correspondant au dérivé sucré à préparer.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le solvant est un alcool, tel qu'un alcool inférieur, par exemple le méthanol, l'éthanol, le

propanol ou l'isopropanol ou le dioxane, le diméthylformamide ou l'acétonitrile ou des mélanges compatibles de tels solvants, ou tout autre solvant usuel pour la synthèse des dérivés Amadori.

5 10. Procédé selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce qu'on utilise un excès de sucre par rapport au 5-HTP, par exemple environ 1,5 mole de sucre par mole de 5-HTP.

10 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce qu'on travaille dans une gamme de température allant de la température ambiante jusqu'à la température de reflux du solvant, cette dernière étant préférée.

15 12. Application à titre de médicaments des dérivés glucidiques du 5-HTP selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et des composés obtenus par le procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 11.

20 13. Médicament contre la lèpre contenant à titre d'agent actif, au moins un dérivé glucidique du 5-HTP selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou un des composés obtenus par le procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 11.

25 14. Composition pharmaceutique contenant une quantité efficace d'au moins un composé de l'invention ou d'un de ses sels physiologiquement acceptables en association avec un véhicule convenant pour l'administration considérée.

30 15. Composition pharmaceutique selon la revendication 13 pour le traitement de la lèpre.

35 16. Compositions pharmaceutiques selon l'une des revendications 13 ou 14 convenant à l'administration orale et présentées, notamment, sous forme de gélules ou de comprimés, ou bien à l'administration locale et présentées, notamment, sous forme de lotions ou pommades ou bien encore à l'injection sous-cutanée et

intra-veineuse.

17. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, pour le traitement de la lèpre, procurant une quantité efficace d'agent
5 actif allant jusqu'à 20 mg par kg de poids et par jour, des doses de 2 à 10 mg/kg/jour étant préférées.

1/2

- 1: Dopaoxydase+ Dopa.
- * 2: Dopaoxydase+ DF-5-HTP+Dopa.
- 3: Dopaoxydase + DFS + Dopa.

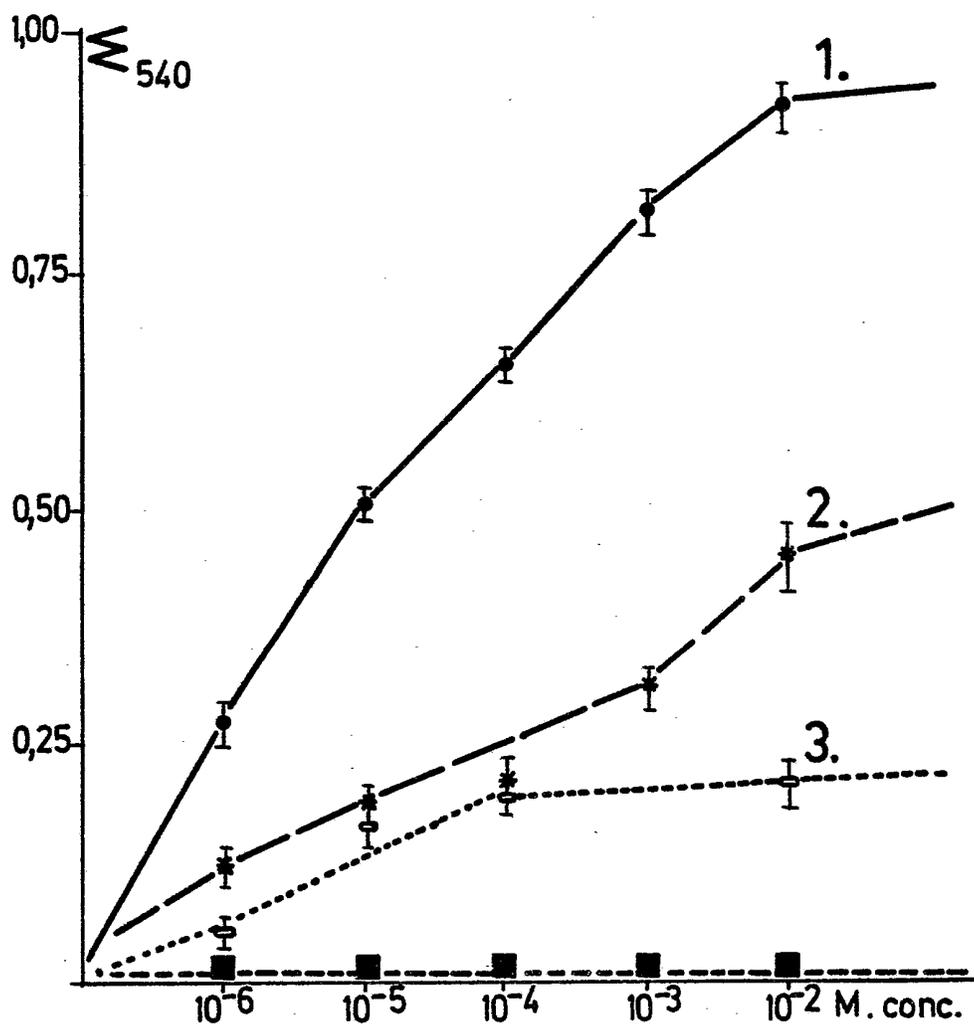


FIG.1

FIG.2

