



BREVET D'INVENTION

NUMERO DE PUBLICATION : 1003068A4

NUMERO DE DEPOT : 8800080

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

Classif. Internat.: C07D

Date de délivrance : 12 Novembre 1991

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d' invention, notamment l' article 22;

Vu l' arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d' invention, notamment l' article 28;

Vu le procès verbal dressé le 22 Janvier 1988 à 14h10
à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA
Health Sciences Mall 2194 Room 331 I.R.C. Building, VANCOUVER B.C.(CANADA)

représenté(e)(s) par : DE PALMENAER Roger, BUREAU VANDER HAEGHEN, Rue
Colonel Bourg 108A, B-1040 BRUXELLES.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : PROCEDE DE SYNTHESE DE COMPOSES ALCALOIDES DIMERES.

INVENTEUR(S) : Kutney James P., McMullen Avenue 2327, Vancouver, B.C. (CA); Choi Lewis S.L., Kerrywood Cres. 7672, Burnaby, B.C. (CA); Nakano Jun, 1180-5, Kaqtsube-cho, Moriyama-shi, Shiga, (JP); Tsukamoto Hiroki, 122, Oyama-7, Kariya, Aichi (JP); Boulet Camille A., c/o G.C. Boulet, 265 Heath Rd. Edmonton, Alta (CA); McHugh Michael, c/o Sauchiehall 1019 St. Glasgow, Ecosse (GB)

Priorité(s) 22.01.87 CA CAA 527897 06.02.87 US USA 011810

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l' invention, sans garantie du mérite de l' invention ou de l' exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 12 Novembre 1991
PAR DELEGATION SPECIALE :


WUYTS L.
Directeur.

"Procédé de synthèse de composés alcaloïdes dimères"

La présente invention concerne un procédé nouveau et perfectionné destiné notamment à la production de composés alcaloïdes dimères, en particulier du groupe des alcaloïdes de Catharanthus (Vinca), et elle concerne en particulier un procédé perfectionné de production des composés antileucémiques (antineoplastiques) antiviraux, à savoir la vincristine et la vinblastine, de formule I

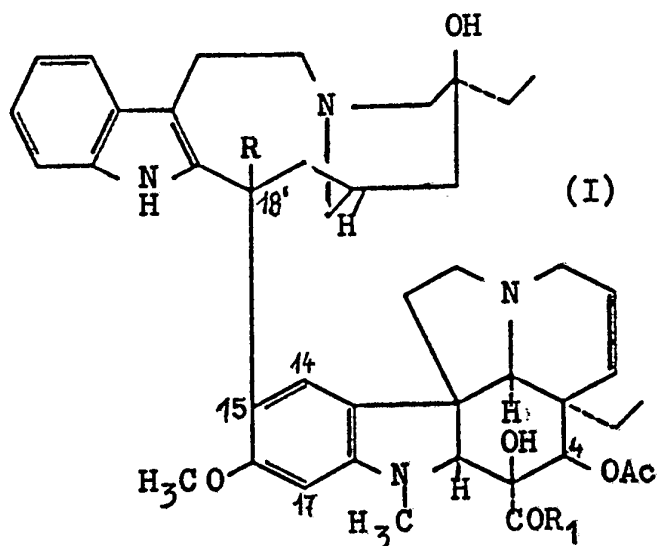
10

motif
indole
(Catharanthine)

15

20

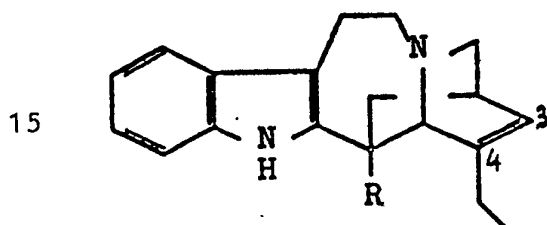
motif
dihydroindole
(Vindoline)



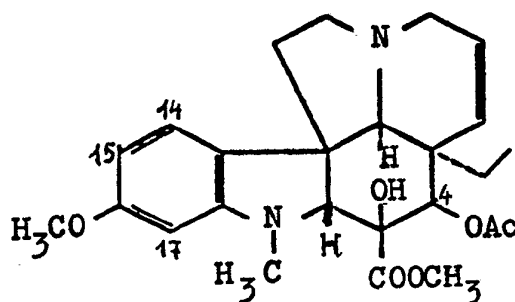
Le composé ci-dessus est la vinblastine (NSC 49482) lorsque R est un groupe COOCH_3 et R_1 est un groupe OCH_3 , et il est la vincristine (NSC 67574)

lorsque R est un groupe COOCH_3 , R_1 est un groupe OCH_3 et N_1 est un groupe N-CHO (N-formyle).

La présente série d'alcaloïdes dimériques, comprenant des agents antitumoraux importants, est formée à partir d'un indole tel que la catharanthine (formule II, $\text{R} = \text{COOCH}_3$) et d'un motif dihydro-indole, par exemple la vindoline (formule III), dont les moitiés sont attachées par une liaison carbone-à-carbone impliquant un centre aliphatique C_{18} dans le motif indole et un atome de carbone C_{15} aromatique dans la portion vindoline.



II



III

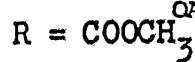
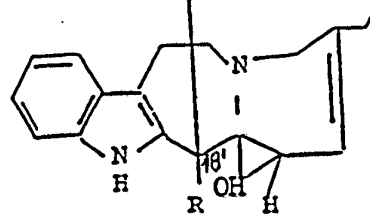
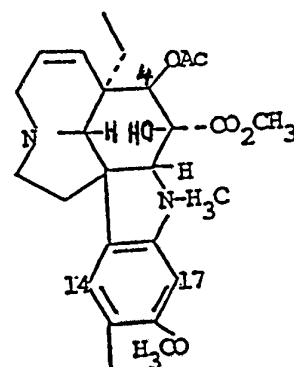
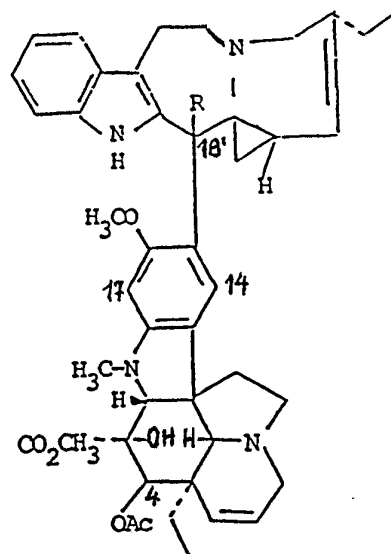
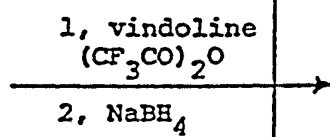
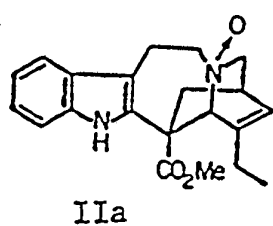
20

Les conditions de la réaction de couplage, comme décrit dans la présente invention, sont en rapport avec une modification importante du procédé mis au point dans ces laboratoires [brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 4 279 817 ; Helv. Chim. Acta, 59, 2858 (1976)] (schéma 1). En particulier, la modification selon l'invention permet la préparation et l'isolement du composé intermédiaire de dihydropyridinium VI ($\text{R} = \text{COOCH}_3$) très instable, qui est formé dans le couplage du N-oxyde de catharanthine (formule IIa) avec la vindoline (formule III).

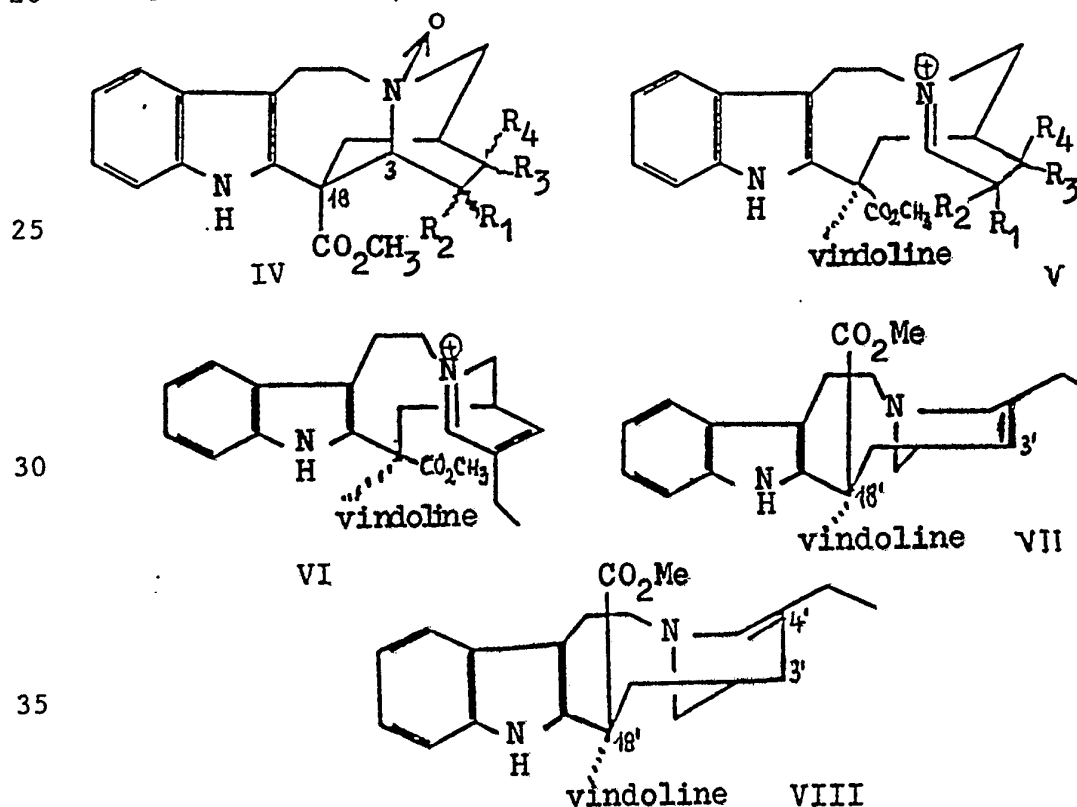
En général, le dérivé N_b -oxyde du motif indole (formule IIa) ou des analogues apparentés (formule IV, où $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{H}$ ou $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{H}$ et $\text{R}_1 =$ groupe alkyle de formule $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ dans laquelle

n a une valeur de 0 à 10) préparés avec un peracide tel que l'acide m-chloroperbenzoïque ou l'acide p-nitroperbenzoïque dans un solvant organique inerte tel que le chlorure de méthylène ou d'autres solvants organiques polyhalogénés, sont obtenus à des températures variées, par exemple -77°C, 0°C, la température ambiante et au-dessus. Le N-oxyde intermédiaire ainsi formé est utilisé pour l'étape suivante sans isolement. La réaction de fragmentation, qui fragmente la liaison C₅-C₁₈ du N_b-oxyde d'indole intermédiaire, est conduite en présence d'un réactif tel que l'anhydride trifluoracétique. Pour maximiser la réaction de couplage subséquente qui favorise la formation d'un dimère naturel lié au niveau de l'atome C₁₈ (motif indole) et de l'atome C₁₅ (motif dihydro-indole), le motif dihydro-indole peut être ajouté au mélange réactionnel avant la réaction de fragmentation. Comme autres réactifs pour le composant anhydride trifluoracétique utilisé dans la fragmentation et le couplage, on peut choisir l'anhydride trichloracétique, l'anhydride acétique, des halogénures d'acétyle et l'anhydride tosylique. Ces réactifs provoquent une fragmentation du type Polonovski de la liaison C₅-C₁₈ dans les composés représentés par les formules IIa et IV.

4

SCHEMA 1

Les conditions de réaction, à savoir température, temps et pression, sont en général analogues à celles qui sont utilisées dans la réaction de Polonovski qui, dans son application originelle, a impliqué la déalkylation d'amines tertiaires et hétérocycliques par acylation des N-oxydes correspondants avec l'anhydride acétique ou le chlorure d'acétyle (voir Merck Index, 8ème édition, 1968, page 1203). La température de la réaction de fragmentation et de couplage peut varier de -70°C à 40°C et elle se situe de préférence dans la partie basse de cette plage. Les étapes de la réaction relatives à la formation du N-oxyde peuvent être conduites à l'air libre ou en atmosphère de gaz inerte tel que de l'argon ou un autre gaz inerte du Groupe Zéro du Tableau Périodique tel que l'hélium, l'azote, le néon, etc. Les mêmes conditions en atmosphère inerte sont utilisées dans les étapes de fragmentation et de couplage de la réaction et avec un réglage positif de température de préférence dans l'intervalle de -40°C à -60°C .



A cause de la basse température nécessaire pour les réactions à un stade ultérieur, la durée de réaction peut varier de quelques heures à plusieurs jours.

5 Le premier composé intermédiaire dimérique indole-dihydro-indole formé, après la réaction (stéréospécifique) de couplage, possède une fonction sel d'iminium au niveau de l'atome N_b du groupement indole comme représenté par les formules V ou VI. La réduction
10 de ce sel d'iminium intermédiaire par réaction avec un borohydrure de métal alcalin (NaBH₄, KBH₄, LiBH₄) produit le ou les alcaloïdes dimériques comme décrit dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 4 279 817 précité.

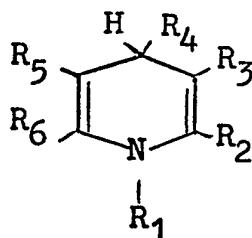
15 Dans la présente invention, le sel d'iminium intermédiaire (formule V ou VI) peut être isolé tel quel par une manipulation effectuée avec précaution. Lorsque la réaction de couplage est terminée, le mélange réactionnel est traité directement sur
20 un système chromatographique approprié tel que chromatographie sur colonne, chromatographie sur couche mince ou chromatographie en phase liquide à haute performance, de préférence avec inversion de phase et/ou par des opérations de séparation par exclusion
25 dimensionnelle. La température de l'opération peut varier de 4°C jusqu'à la température ambiante. En variante, des réactifs et des solvants volatils qui sont présents conjointement avec le sel d'iminium intermédiaire dans le mélange réactionnel peuvent
30 être éliminés sous pression et à température réduites, de préférence au-dessous de -10°C. La matière solide résultante (formule V ou VI) est ensuite dissoute dans divers solvants organiques tels que des hydrocarbures halogénés, des éthers, des alcools, l'acéto-
35 nitrile, etc., et/ou divers tampons aqueux. Le pH

du tampon peut varier de 2 à 10. La solution du sel d'iminium intermédiaire (formule V ou VI) peut ensuite être purifiée par les opérations chromatographiques décrites ci-dessus, avant d'autres caractérisations.

5 A titre de variante, la solution de sel d'iminium intermédiaire peut être utilisée directement pour des réactions subséquentes. L'utilisation d'une atmosphère inerte peut ou non être nécessaire.

Lorsque le motif indole de départ a une
10 double liaison en C₃-C₄ (par exemple la catharanthine (II)), le composé intermédiaire de couplage résultant contient un groupe fonctionnel iminium à non-saturation α,β comme représenté par la formule VI. La réduction de VI avec un borohydrure de métal alcalin (NaBH₄, KBH₄,
15 LiBH₄) donne des composés de 3',4'-déhydrovinblastine (formule VII). Le procédé de l'invention utilise un mode nouveau de réduction dans lequel la transformation du sel d'iminium intermédiaire (formule VI) en l'énamine (formule VIII) peut être réalisée. Des réactifs
20 utilisés pour cette réduction comprennent des composés de 1,4-dihydropyridine (que l'on appelle modèles de NADH) comme représenté par la formule IX :

25



IX

30

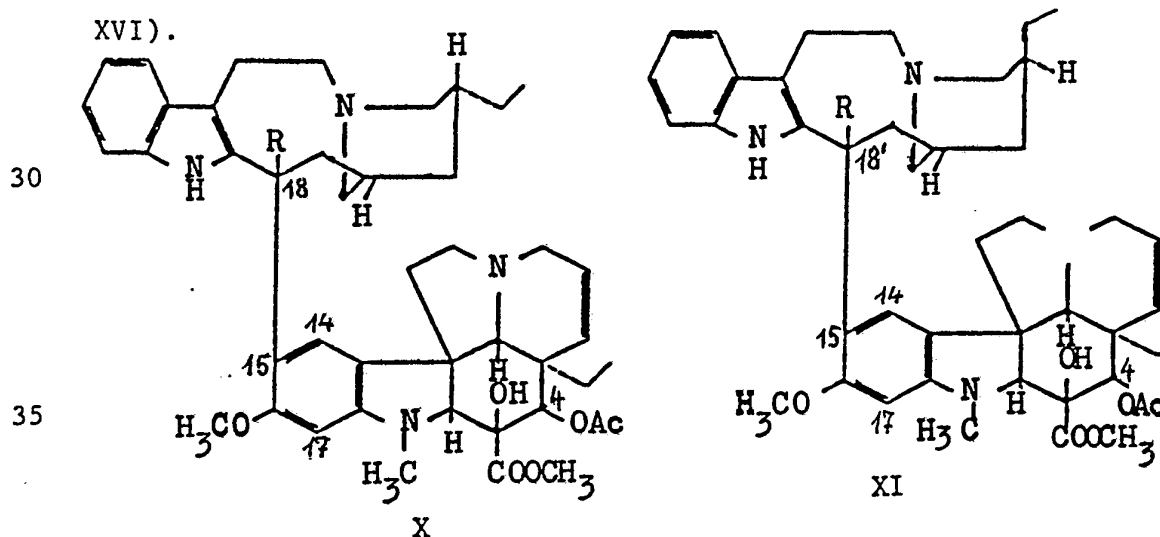
où R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ et R₆ peuvent être n'importe quel représentant du groupe comprenant H, un radical alkyle, alkyle substitué, aryle et aryle substitué. Deux séries de tels composés sont aisément disponibles
35 [Chem. Rev. 82, 232 (1982) ; Chem. Rev. 72, 1 (1972)].

La première série est connue sous le nom d'esters de Hantzsch où R_3 et R_5 dans la formule IX sont des esters carboxyliques, par exemple carbéthoxy (COOC_2H_5). La seconde série comprend les 1,4-dihydronicotinamides substitués sur l'atome d'azote (formle IX) où R_1 est une fonction alkyle substitué ou aryle substitué, par exemple benzyle, et R_3 est un groupe CONR_7R_8 dans lequel R_7 et R_8 peuvent être n'importe quel représentant du groupe comprenant l'hydrogène et les fonctions alkyle, alkyle substitué, aryle et aryle substitué.

Les réducteurs ci-dessus peuvent être utilisés individuellement ou en association. Lorsqu'on utilise des 1,4-dihydropyridines pour réduire le sel d'iminium VI, on se sert de solvants organiques tels que des alcools, l'acétonitrile ou des représentants supérieurs de cette série, le diméthylsulfoxyde, le diméthylformamide, divers éthers tels que le dioxanne, le tétrahydrofuranne, etc., des hydrocarbures chlorés, etc., normalement sans utiliser de tampon aqueux comme co-solvant. On contrôle la progression de la réduction par l'analyse directe du mélange réactionnel sur un système chromatographique approprié, de préférence par chromatographie en phase liquide à haute performance à inversion de phase. Ce procédé est utilisé pour optimiser la température, le temps et la pression de la réaction et la concentration des corps réactionnels. La température de réaction peut varier de -60°C à $+60^\circ\text{C}$ et de préférence de 4°C à la température ambiante. Le temps de réaction peut varier de quelques minutes à plusieurs jours selon d'autres paramètres. La réduction est conduite en vase clos dans des conditions inertes, par exemple sous argon ou dans un gaz inerte du Groupe Zéro du Tableau Périodique (azote, hélium, néon, etc.).

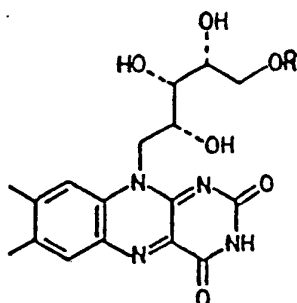
L'énamine (formule VIII) formée dans la réduction ci-dessus peut être utilisée directement pour la réaction subséquente ou isolée par une manipulation effectuée avec précaution. Le mélange réactionnel est traité directement sur un système chromatographique approprié, par exemple par chromatographie sur colonne, sur couche mince ou chromatographie en phase liquide à haute performance, de préférence avec inversion de phase, et/ou soumis à des opérations de séparation par perméation sur gel. La température de l'opération peut varier de 4°C à la température ambiante. A titre de variante, les réactifs et les solvants volatils présents dans le mélange réactionnel sont chassés sous pression et à température réduites, de préférence au-dessous de -10°C. Le résidu résultant peut être purifié par les opérations chromatographiques décrites ci-dessus avant d'être caractérisé ou transformé.

Le traitement de l'énamine VIII avec un borohydrure de métal alcalin (NaBH_4 , KBH_4 , LiBH_4) produit des composés de 4'-déoxovinblastine (formule X, $\text{R} = \text{COOCH}_3$) et des composés de 4'-déoxo-4'-épi-vinblastine (formule XI, $\text{R} = \text{COOCH}_3$). Tandis que dans des conditions oxydantes, l'énamine VIII peut être transformée en la série vinblastine/vincristine en passant par le sel d'iminium intermédiaire (formule XVI).



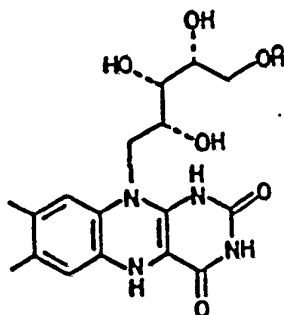
Des conditions oxydantes qui sont utilisées pour convertir une énamine (formule VIII) en un sel d'iminium intermédiaire (formule XVI) comprennent les suivantes :

- 5 (1) aération/oxygénation réglée ;
 (2) addition de coenzymes de flavine [riboflavine, formule XII, $R = H$; flavine-mononucléotide (FMN), formule XII, $R = PO_3^{2-}$; flavine-adénine-dinucléotide (FAD), formule XII, $R = (PO_3)_2^{2-}$ -adénosine]
 10 suivie d'une opération d'aération/oxygénation réglée;



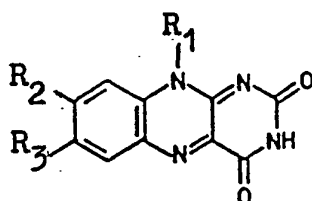
XII

- 20 (3) addition de la forme réduite des coenzymes de flavine [dihydroriboflavine, formule XIII, $R = H$; dihydroflavine-mononucléotide (FMNH₂), formule XIII, $R = PO_3^{2-}$; dihydroflavine-adénine-dinucléotide (FADH₂) ; formule XIII, $R = (PO_3)_2^{2-}$ -adénosine], suivie
 25 d'une opération d'aération/oxygénation réglée ;



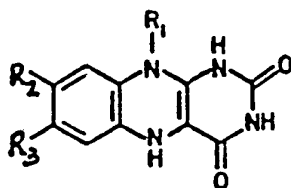
XIII

(4) addition d'analogues de coenzymes de flavine à structure d'iso-alloxazine comme représenté par la formule XIV dans laquelle R_1 , R_2 et R_3 peuvent être des représentants du groupe comprenant les fonctions alkyle, alkyle substitué, aryle et aryle substitué, suivie d'une opération d'aération/oxygénation réglée ;



XIV

(5) addition de la forme réduite (1,5-dihydro) des analogues de coenzymes de flavine ci-dessus, comme représenté par la formule XV dans laquelle R_1 , R_2 et R_3 peuvent appartenir au groupe comprenant les fonctions alkyle, alkyle substitué, aryle et aryle substitué, suivie d'une opération d'aération/oxygénation réglée ;



XV

(6) addition de peroxyde d'hydrogène et/ou d'hydroperoxydes comme représenté par la formule $R-OOH$, dans laquelle R peut être une fonction alkyle, alkyle substitué, aryle ou aryle substitué ;

(7) addition de peracides comme représenté par la formule $R-CO_3H$, dans laquelle R peut être une

fonction alkyle, alkyle substitué, aryle ou aryle substitué ;

(8) addition de superoxydes ;

(9) addition d'un radical hydroxyle (OH)
5 engendré de diverses façons, par exemple par l'utilisation de peroxyde d'hydrogène en présence de l'ion ferreux ;

(10) addition d'un ion métallique qui
est un bon accepteur d'électrons, par exemple l'ion
10 ferrique (Fe^{+3}) ; l'ion cuivrique (Cu^{+2}) ; l'ion cuivreux (Cu^{+1}), l'ion mercurique (Hg_2^{+2}) et l'ion argent (Ag^{+1}), suivie d'une opération d'aération/oxygénation réglée.

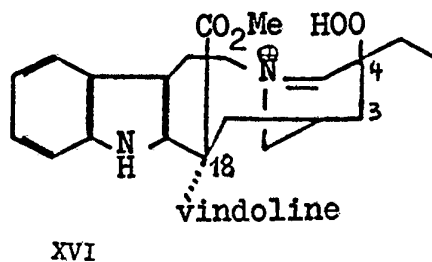
Les processus d'oxydation impliquant une
15 aération/oxygénation réglée (condition (1)), les analogues de coenzymes de flavine (conditions (4), (5)), des peroxydes (condition (6)), des peracides (condition (7)), des superoxydes (condition (8)), le radical hydroxyle (OH) (condition (9)) et des ions métalliques
20 capables d'un transfert d'électrons (condition (10)) peuvent être effectués dans des solvants organiques tels que des alcools, l'acétonitrile ou des représentants supérieurs de cette série, le diméthylsulfoxyde, le diméthylformamide, divers éthers tels que le dioxanne, le tétrahydrofuranne, des hydrocarbures aromatiques
25 tels que le benzène, le toluène, etc.

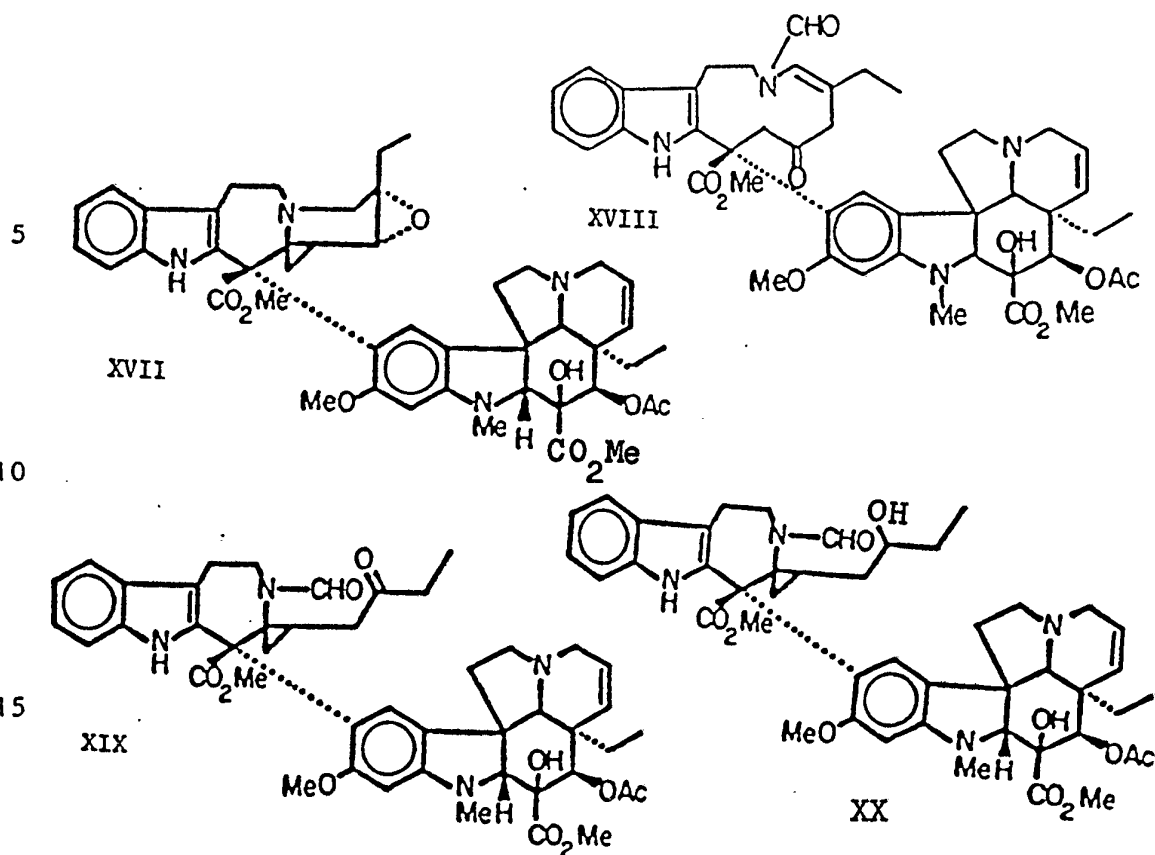
Les processus d'oxydation impliquant des coenzymes de flavine (conditions (2), (3)) nécessitent un tampon aqueux (par exemple tampons aux phosphates, au chlorhydrate de tris, au MES) à pH 5-9, mais
30 de préférence dans la plage de 6 à 8, comme solvant. Un co-solvant organique, par exemple des alcools, l'acétonitrile ou un membre supérieur de cette série, le dioxanne, le tétrahydrofuranne, le diméthylsulfoxyde, le diméthylformamide, peut être utilisé.
35

L'évolution du processus d'oxydation est contrôlée par l'analyse directe du mélange réactionnel sur un système chromatographique approprié, de préférence par chromatographie en phase liquide à haute performance avec inversion de phase. Cette méthode est utilisée pour optimiser la température, le temps, la pression de réaction et la concentration des corps réactionnels. La température de la réaction peut varier de -60 à +60°C et de préférence de 4°C à la température ambiante. La durée de la réaction peut varier de quelques minutes à plusieurs jours, selon les autres paramètres. La réaction est conduite à la pression atmosphérique.

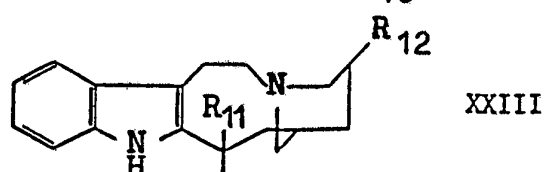
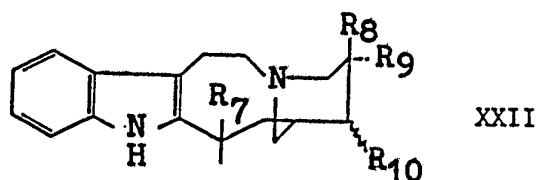
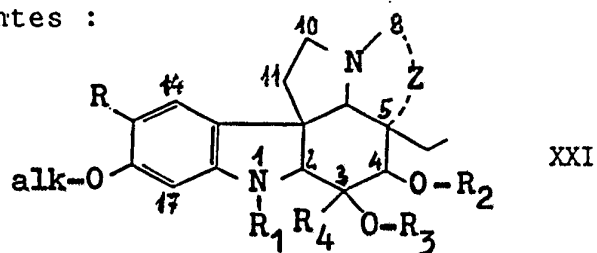
La transformation du composé intermédiaire (formule XVI) en vinblastine (formule I) peut être effectuée par réaction du composé XVI avec un borohydrure de métal alcalin (NaBH_4 , KBH_4 , LiBH_4) dans des solvants convenables (organiques ou aqueux) comme on en utilise dans le processus d'oxydation (conditions (1)-(10)).

A des fins pratiques, un isolement des composés intermédiaires (formules V, VI, VIII, XVI) n'est pas requis et le processus entier depuis le motif indole (formule II) et le motif dihydro-indole (formule III) jusqu'à la vinblastine (formule I) constituant le produit final peut être conduit de préférence dans une opération en récipient unique.





20 En résumé, le procédé de l'invention est applicable à l'obtention de produits dimères à partir de catharanthine et de dihydrocatharanthine avec la vindoline comme matière de départ et des dérivés phén-
liques, alkyls et amidiques répondant aux formules
25 suivantes :



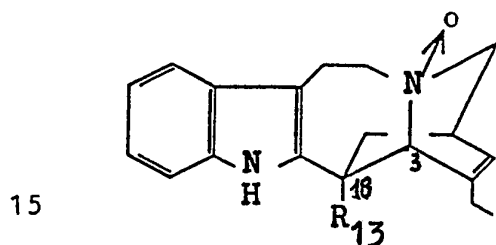
La formule XXI correspond à la représentation qui en est donnée et dans cette formule, alk représente un groupe alkyle inférieur en C_1 à C_6 et de préférence en C_1 à C_3 ; aryle est un groupe mono-aryle tel que benzyle, styryle et xylyle ; R_1 est un membre du groupe comprenant l'hydrogène, des radicaux alk, CHO et COR_5 où R_5 est un groupe alkyle ou aryle ; R_2 et R_3 sont des représentants du groupe comprenant l'hydrogène et un radical -CO-alk ; R_4 est un représentant du groupe comprenant les radicaux COO-alk, CONH-NH₂, CONH₂, CONHR₆ et CON(R₆)₂ où R_6 est un groupe alkyle ; Z est un membre du groupe comprenant les radicaux -CH₂-CH₂- et -CH=CH- et R est un membre de la famille de l'indole représenté par la formule XXII dans laquelle R_7 est choisi dans le groupe comprenant l'hydrogène ou un radical COO-alk ; R_8 est un membre du groupe comprenant l'hydrogène, un radical OH, O-alk, OCO-alk ou alkyle ; R_9 est un membre du groupe comprenant l'hydrogène, un radical OH, O-alk, OCO-alk ou alk ; R_{10} est un membre du groupe comprenant l'hydrogène, un radical OH, O-alk, OCO-alk, ou de formule XXIII dans laquelle R_{11} est un représentant du groupe comprenant l'hydrogène ou un radical COO-alk ; R_{12} est un groupe alkyle.

La présente invention diffère de l'art antérieur [brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 4 279 817] dans plusieurs opérations importantes, notamment l'isolement et la caractérisation de composés intermédiaires V, VI, VIII et XVI instables et leur transformation ultérieure en vinblastine et vincristine qui sont des médicaments à usage clinique. L'art antérieur décrit un procédé de production d'alcaloïdes dimères qui sont des analogues des médicaments à usage clinique, par exemple la 3',4'-déhydrovinblastine de formule VII.

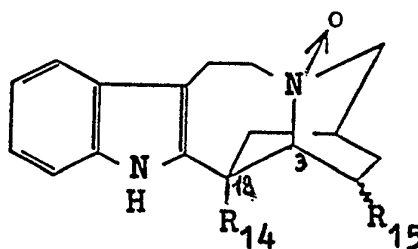
On prépare des composés intermédiaires V et VI par mise en contact de vindoline ou d'un dérivé de vindoline [formule XXI dans laquelle R représente H] avec un dérivé d'indole représenté par un composé

5 de formule XXIV dans laquelle R_{13} est un représentant du groupe comprenant l'hydrogène ou un radical COO-alk, ou par un composé de formule XXV dans laquelle R_{14} est un membre du groupe comprenant H ou un radical COO-alk et R_{15} est un membre du groupe comprenant

10 l'hydrogène ou un radical alkyle.



XXIV

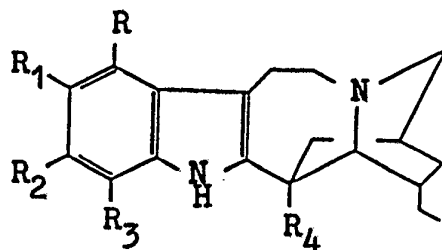


XXV

20 En plus de la catharanthine, tout motif d'indole représenté par la formule XXVI peut être utilisé. Dans la formule XXVI, R, R_1 , R_2 et R_3 sont des membres du groupe comprenant l'hydrogène, un radical OH, O-alk, OCO-alk, alkyle ou aryle. Dans la formule

25 XXVI, comme indiqué ci-dessus, alk est un groupe alkyle inférieur en C_1 à C_6 , de préférence en C_1 à C_3 , et aryle est un groupe mono-aryle tel que benzyle, xylyle, etc.

30



XXVI

Dans les formules XXI à XXVI et d'une manière générale dans la présente demande, alk et alkyle désignent un groupe alkyle inférieur tel que défini pour la formule XXI, et aryle désigne un groupe mono-aryle tel que défini de façon similaire dans la formule XXI.

Le composé intermédiaire VI ainsi obtenu est utilisé dans un procédé nouveau et très spécifique impliquant une réduction en positions 1,4 en vue de former le composé intermédiaire VIII qui est le suivant par ordre d'importance. Le composé intermédiaire VIII est en outre converti par un procédé nouveau en le composé intermédiaire XVI nouveau et ce dernier est utilisé dans un autre procédé nouveau de réduction pour former les composés de structure générale XXI lorsque R est un composé de formule XXII.

Dans une série similaire de réactions, le composé intermédiaire V conduit à des composés de structure générale XXI lorsque R est un composé de formule XXIII.

Une autre particularité nouvelle et très importante de la présente invention est que l'isolement de composés intermédiaires VI, VIII et XVI n'est pas essentiel et que le procédé en entier, soigneusement contrôlé par chromatographie en phase liquide à haute performance pour VI, VIII et XVI, peut être mis en oeuvre en vue de l'obtention de produits dimériques de formule XXI à partir des motifs indole (formules II, XXII et XXIII) et dihydro-indole (formule XXI, R = H) de départ dans une opération en réacteur unique.

PARTIE EXPERIMENTALEPréparation du sel d'iminium intermédiaire (formule VI) par la réaction de Polonovski modifiée

La réaction a été conduite dans des conditions anhydres. Toute la verrerie a été séchée à l'étuve à 120°C. Le chlorure de méthylène utilisé comme solvant et l'anhydride trifluoracétique utilisé comme réactif de couplage ont été distillés sur P_2O_5 avant leur utilisation.

De l'acide m-chloroperbenzoïque (132 mg, 0,8 mmole) a été ajouté à une solution de catharanthine (II, 200 mg, 0,6 mmole) dans du chlorure de méthylène anhydre (2 ml) à -20°C sous atmosphère positive d'argon et le mélange a été agité pendant 5 minutes. Une solution de vindoline (III, 270 mg, 0,6 mmole) dans du chlorure de méthylène (1 ml) a été ajoutée au N-oxyde de catharanthine (IIa) ainsi formé et le mélange a été refroidi à -60°C. De l'anhydride trifluoracétique (0,2 ml, 1,5 mmole) a été ajouté au mélange réactionnel sous agitation maintenu à -60°C pendant 2 heures. Après cette période, le solvant et les réactifs en excès ont été chassés sous vide à -20°C en laissant un résidu brun rougeâtre contenant le sel d'iminium intermédiaire. Ce dernier a été caractérisé par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) à inversion de phase (cartouche Waters Radial-Pak C_{18} ou CN, système de solvants formé de méthanol- H_2O - Et_3N). Il a été montré que le rendement en VI dans cette réaction dépassait 80 % par réduction de VI ($NaBH_4$, méthanol, 0°C) en la 3',4'-déhydrovinblastine connue (formule VII).

Réduction du sel d'iminium intermédiaire (formule VI) avec le 1-benzyl-1,4-dihydronicotinamide (formule IX, $R_1 = \text{benzyle}$, $R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$; $R_3 = \text{CONH}_2$) - Synthèse de l'énamine (formule VIII) - (Mode opératoire A)

5 Du 1-benzyl-1,4-dihydronicotinamide (135 mg, 0,63 mmole, 6 équivalents) sous atmosphère positive d'argon à la température ambiante (20°C) a été ajouté en une période de 5 heures à une solution sous agitation du sel d'iminium intermédiaire (VI, 100 mg) dans de l'acétonitrile (5 ml) dégazé. Après cette période de 5 heures, le mélange réactionnel, comme contrôlé par CLHP avec l'inversion de phase (cartouche Waters Radial-Pak C_{18} ou CN, système de sol-
15 vants formé de méthanol/ $\text{H}_2\text{O}/\text{Et}_3\text{N}$) a indiqué la transformation totale de VI en un mélange d'énamine VIII et de 3',4'-déhydrovinblastine (VII) dans un rapport de 1:1 (rendement 75 %).

A titre de variante, on a ajouté goutte à goutte ou par portions une solution de 1-benzyl-1,4-dihydronicotinamide (56 mg, 0,26 mmole, 2,5 équivalents) dans du méthanol (2 ml) sous pression positive d'argon en une période de 5 heures à une solution sous agitation du sel d'iminium intermédiaire (VI, 20 100 mg) dans du méthanol (5 ml), initialement maintenue à 0°C pendant 0,5 heure. Pendant cette période de 5 heures, on a laissé la solution se réchauffer à la température ambiante. Un contrôle par CLHP effectué comme ci-dessus a indiqué la transformation totale
25 de VI en un mélange d'énamine VIII et de 3',4'-déhydrovinblastine (VII) dans un rapport de 1:1 (rendement 75 %).

Dans un essai, le mélange d'énamine (VIII) et de 3',4'-déhydrovinblastine (VII) obtenu comme
35 décrit ci-dessus a été traité avec du borohydrure

de sodium en excès (500 mg) à 0°C. Le mélange réactionnel a ensuite été rendu basique avec de l'hydroxyde d'ammonium et il a été extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 200 ml). Les phases organiques rassemblées ont
5 été déshydratées sur du sulfate de magnésium. Le produit obtenu, après élimination du solvant organique, a été soumis à une chromatographie préparative sur couche mince, sur gel de silice (élution avec un mélange méthanol/acétate d'éthyle). Il a été montré
10 que le produit consistait en un mélange de 3',4'-déhydrovinblastine (VII) n'ayant pas réagi et de composés connus, à savoir la 4'-déhydrovinblastine (X, R = COOCH₃) et la 4'-déoxo-4'-épivinblastine (XI, R = COOCH₃). La présence de ces derniers composés
15 a mis en évidence sans ambiguïté la structure de l'énamine VIII.

Réduction du sel d'iminium intermédiaire (formule VI) avec la 3,5-diéthoxycarbonyl-2,6-diméthyl-4-phényl-1,4-dihydropyridine (analogue d'ester de Hantzsch, formule IX, R₁ = H ; R₃ = R₅ = COOCH₂CH₃ ; R₂ = R₆ = CH₃ ; R₄ = phényle) - Variante de synthèse d'énamine (formule VIII) - (Mode opératoire B)

20

De la 3,5-diéthoxycarbonyl-2,6-diméthyl-4-phényl-1,4-dihydropyridine (264 mg, 8 équivalents)
25 dans de l'éthanol (12 ml) sous atmosphère positive d'argon a été ajoutée à une solution sous agitation du sel d'iminium intermédiaire (VI, 100 mg) dans de l'acétonitrile dégazé (3 ml). Le mélange réactionnel a été chauffé au reflux pendant 3 heures. Après cette
30 période, l'analyse par CLHP avec inversion de phase (comme décrit ci-dessus) a indiqué la formation, entre autres produits, d'énamine VIII et de 3',4'-déhydrovinblastine (VII) dans un rapport de 1:1 (rendement 60 %).

Synthèse de la vinblastine (formule I) par oxydation d'énamine (formule VIII) en sel d'iminium intermédiaire (formule XVI) avec le flavine-mononucléotide (FMN, formule XII, $R = PO_3^{2-}$) - Procédé 1

- 5 Du FMN (80 mg, 1 équivalent) en solution dans un tampon au chlorhydrate de tris (2 ml) sous atmosphère positive d'argon a été ajouté à un mélange réactionnel sous agitation contenant l'énamine (VIII) obtenue comme décrit ci-dessus (mode opératoire A)
- 10 à partir du sel d'iminium VI (100 mg). La solution a été maintenue à l'obscurité à la température ambiante (20°C) pendant 16 heures. Ensuite, l'atmosphère inerte d'argon a été remplacée par de l'air et le mélange réactionnel a été agité pendant encore 2,5 heures.
- 15 Des analyses par CLHP avec inversion de phase ont indiqué la transformation de l'énamine VIII en le sel d'iminium intermédiaire XVI ainsi qu'en d'autres produits (voir plus loin). Du borohydrure de sodium (500 mg) a été ajouté à 0°C et le mélange réactionnel
- 20 a été rendu basique avec de l'hydroxyde d'ammonium et extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 200 ml). Les extraits organiques rassemblés ont été déshydratés sur du sulfate de magnésium et le solvant a été chassé sous vide en donnant un produit brut (85 mg). La purification de ce dernier produit par chromatographie
- 25 sur couche épaisse (gel de silice, méthanol:acétate d'éthyle 1:5) a permis la séparation des produits dimériques suivants : vinblastine (formule I, 22 mg, 23 %) : 3',4'-déhydrovinblastine (formule VII, 16 mg, 17 %);
- 30 leurosine (formule XVII, 8 mg, 9 %), catharine (formule XVIII, 7 mg, 7,5 %) ; vinamidine (formule XIX, 5 mg, 5,6 %) et le produit de réduction de la vinamidine (formule XX, 19 mg, 20 %).

Synthèse de la vinblastine (formule I) par oxydation de l'énamine (formule VIII) au peroxyde d'hydrogène en le sel d'iminium intermédiaire (formule XVI) - Procédé 2

5 Du peroxyde d'hydrogène (30 %, 1,2 ml, 95 équivalents) sous atmosphère inerte d'argon a été ajouté à une solution contenant l'énamine (VIII) obtenue à partir du sel d'iminium intermédiaire VI (100 mg, mode opératoire A). Le mélange réactionnel a été agité
10 à la température ambiante pendant 5,5 heures aux termes desquels des analyses par CLHP avec inversion de phase ont indiqué la transformation complète de l'énamine VIII. Du borohydrure de sodium (500 mg) a été ajouté à 0°C et extrait à l'acétate d'éthyle
15 (3 x 200 ml). Les extraits organiques rassemblés ont été déshydratés sur du sulfate de magnésium et le solvant a été chassé sous vide. Le produit mixte résultant a été séparé par chromatographie sur couche épaisse (gel de silice, méthanol/acétate d'éthyle) en donnant
20 les alcaloïdes dimériques suivants : vinblastine (I, 4 mg, 4 %), 3',4'-déhydrovinblastine (VII, 5 mg, 4,8 %), leurosine (XVII, 13 mg, 12,5 %), catharine (XVIII, 5 mg, 4,8 %), forme réduite de la vinamidine (XX, 30 mg, 27,6 %).

25 Synthèse de la vinblastine (I) par oxydation de l'énamine (VIII) en présence d'air en le sel d'iminium intermédiaire (formule XVI) - Procédé 3

Une solution contenant l'énamine (VIII) obtenue à partir du sel d'iminium intermédiaire (VI, 100 mg) par le mode opératoire A a été agitée à l'air
30 libre à la température ambiante pendant 3 heures. Après cette période, du borohydrure de sodium (500 mg) a été ajouté à 0°C et le mélange réactionnel a été rendu basique avec de l'hydroxyde d'ammonium et extrait
35 à l'acétate d'éthyle (3 x 200 ml). Les extraits organi-

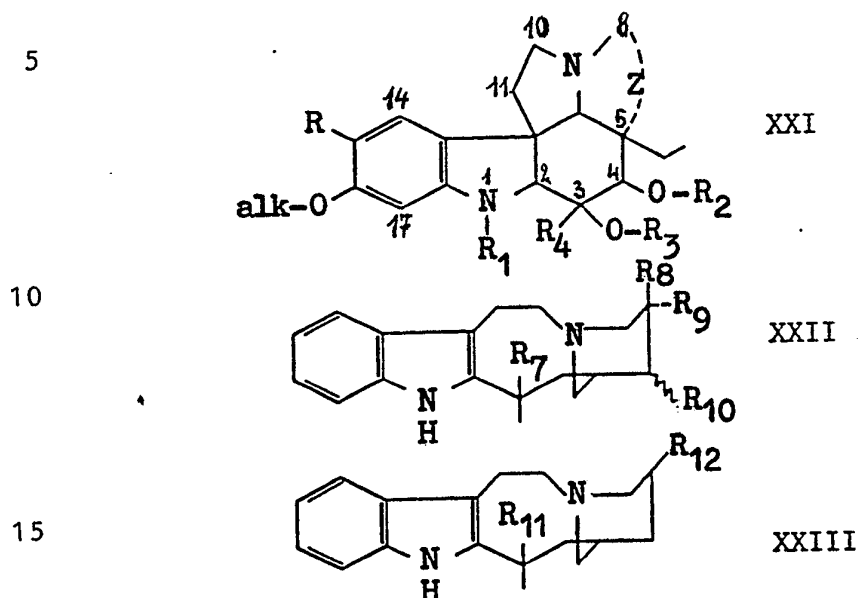
ques rassemblés ont été déshydratés sur du MgSO_4 et chassés sous vide. Le produit brut résultant a été séparé par chromatographie préparative sur couche épaisse (gel de silice, méthanol/acétate d'éthyle) en donnant la vinblastine (I, 4 mg, 4 %).

Synthèse de la vinblastine (I) par oxydation de l'énamine (formule VIII) à l'air en présence de chlorure ferrique en le sel d'iminium intermédiaire (XVI) -
Procédé 4

10 Du chlorure ferrique (1 équivalent) a été ajouté à une solution sous agitation contenant l'énamine (VIII) obtenue à partir du sel d'iminium intermédiaire (VI, 100 mg, mode opératoire A) et on fait barboter de l'air dans la solution à 0°C pendant
15 une période de 0,5 heure. On a ajouté du borohydrure de sodium (500 mg) à 0°C et on a rendu le mélange réactionnel basique avec de l'hydroxyde d'ammonium avant l'extraction à l'acétate d'éthyle (3 x 100 ml). Les extraits organiques rassemblés ont été déshydratés
20 sur du Na_2SO_4 et le solvant a été chassé sous vide. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur couche épaisse (gel de silice, méthanol/acétate d'éthyle) en donnant la vinblastine (I, 37 mg). Sur la base de l'énamine (50 mg) présente dans le mélange,
25 le rendement dans cette étape est de 70 %.

REVENDICATIONS

1. Procédé de production de composés représentés par les formules suivantes :



où, dans la formule XXI

- alkyle est un groupe CH_3 ou un groupe $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ dans lequel n a une valeur de 1 à 5
- R_1 représente CH_3 ou CHO
- R_2 représente H ou un groupe CO-alk
- R_3 représente H
- R_4 représente un groupe $-\text{COO-alk}$ ou $\text{CONR}_{13}\text{R}_{14}$
- où R_{13} et R_{14} peuvent être un membre quelconque du groupe comprenant l'hydrogène, une fonction alkyle, alkyle substitué, aryle ou aryle substitué
- Z représente un groupe $-\text{CH=CH}-$ ou $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
- R représente la formule XXII ou XXIII
- R_7 représente H ou un groupe COO-alk
- R_8 représente H, un groupe OH, O-alk, OCO-alk ou alkyle
- R_9 représente H, un groupe OH, O-alk, OCO-alk ou alkyle

R_{10} représente H, un groupe OH, O-alk, OCO-alk

R_{11} représente H ou un groupe COO-alk

R_{12} représente H ou un groupe alkyle

5 procédé destiné à la synthèse d'un dimère dérivé d'un motif indole de la famille naturelle des alcaloïdes de l'Iboga contenant une portion aza-bicyclo-octane et un motif dihydro-indole de la famille naturelle des alcaloïdes d'Aspidosperma et de Vinca, la stéréo-
10 chimie de la liaison carbone-à-carbone entre ces deux motifs étant identique à celle de la vinblastine, caractérisé en ce qu'il consiste :

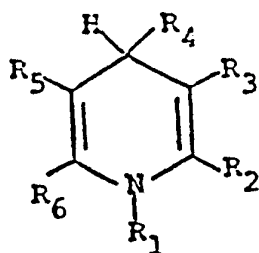
(a) à former un N-oxyde intermédiaire à froid à une température de -70°C à $+40^{\circ}\text{C}$ à partir
15 dudit motif indole par oxydation de l'azote de pontage et sans isolement dudit composé intermédiaire ;

(b) à traiter le N-oxyde intermédiaire dérivé d'indole en présence d'un membre du groupe comprenant l'anhydride acétique, un anhydride acétique
20 halogéné et le chlorure d'acétyl pour effectuer une réaction de fragmentation du type de Polonovski ;

(c) sans isolement du produit de l'étape (b), à coupler ledit produit de réaction avec un motif dihydro-indole en présence d'anhydride acétique, d'anhy-
25 dride acétique halogéné et de chlorure d'acétyl à une basse température d'environ -70°C à $+40^{\circ}\text{C}$ dans des conditions inertes ;

(d) le produit de l'étape (c) est isolé par évaporation du solvant de préférence à basse tempé-
30 rature dans l'intervalle de -20 à 0°C ;

(e) le produit de l'étape (d) est réduit par des composés de 1,4-dihydropyridine représentés par la formule IX



IX

5

dans laquelle R_3 et R_5 sont des esters carboxyliques
 (COO-alk) et R_1 , R_2 , R_4 et R_6 sont des membres du groupe
 10 comprenant H, des radicaux alkyle, aryle (de la série
 des esters de Hantzsch) ou des 1,4-dihydronicotinamides
 substitués sur l'atome d'azote, R_1 est une fonction
 alkyle substitué ou aryle substitué, par exemple
 benzyle, et R_3 est un groupe CONR_7R_8 dans lequel R_7 et
 15 R_8 peuvent être tous membres du groupe comprenant
 l'hydrogène et des fonctions alkyle ou aryle ;

ladite réduction est conduite dans une
 atmosphère inerte entre -60 et $+60^\circ\text{C}$ et de préférence
 dans l'intervalle de température de 4 à 20°C et en
 20 utilisant des solvants choisis dans le groupe compre-
 nant des alcanols à groupe alkyle inférieur, l'acéto-
 nitrile, le diméthylsulfoxyde, le diméthylformamide,
 le dioxanne, le tétrahydrofuranne et des hydrocarbures
 inférieurs chlorés ;

25 (f) le produit de l'étape (e), qui est
 une énamine de formule VIII, est isolé par évaporation
 du solvant, de préférence à basse température dans
 l'intervalle de -20°C à 0°C ;

(g) l'énamine obtenue dans l'étape (f)
 30 est utilisée pour préparer un sel d'iminium intermé-
 diaire de formule XVI par un processus d'oxydation
 comprenant :

(1) une opération d'aération/oxygénation
 réglée à l'air libre ;

(2) une opération d'aération/oxygénation réglée plus un ion métallique ;

(3) une opération d'aération/oxygénation réglée plus un coenzyme de flavine ;

5 (4) une opération d'aération/oxygénation réglée plus un agent traitant choisi entre le peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes ;

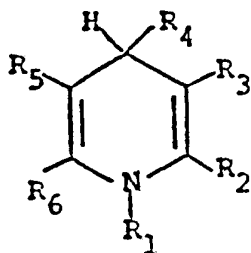
10 en utilisant une large gamme de solvants organiques à pH 5-9 et une température de réaction de -60°C à +60°C ;

(h) le produit, qui est un sel d'iminium intermédiaire, obtenu dans l'étape (g) est isolé par évaporation du solvant, de préférence à basse température dans l'intervalle de -20 à 0°C ;

15 (i) le produit obtenu dans l'étape (h) est converti en le composé désiré de formule XXI, dont la vinblastine et la vincristine constituent des exemples, par réduction avec un borohydrure de métal alcalin.

20 2. Procédé suivant la revendication 1, dans lequel le processus comportant le produit final de formule XXI est conduit dans une opération en réacteur unique.

25 3. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'un N-oxyde intermédiaire dérivé d'indole est couplé avec un motif dihydro-indole et est réduit par des composés de 1,4-dihydropyridine représentés par la formule IX :



IX

dans laquelle R_3 et R_5 sont des esters carboxyliques (COO-alk) et R_1 , R_2 , R_4 et R_6 sont des membres du groupe comprenant H, un radical alkyle, aryle (série des esters de Hantzsch) ou des 1,4-dihydronicotinamides substitués sur l'atome d'azote, R_1 est une fonction alkyle substitué ou aryle substitué, par exemple benzyle, et R_3 est un groupe CONR_7R_8 dans la formule duquel R_7 et R_8 peuvent être l'un quelconque des représentants du groupe comprenant l'hydrogène, des fonctions alkyle ou des fonctions aryle ;

dont ladite réduction est conduite en atmosphère inerte entre -60 et $+60^\circ\text{C}$ et de préférence dans la plage de températures de 4 à 20°C et en utilisant des solvants choisis dans le groupe comprenant des alcanols à radical alkyle inférieur, l'acétonitrile, le diméthylsulfoxyde, le diméthylformamide, le dioxane, le tétrahydrofur et des hydrocarbures inférieurs chlorés ; et

le produit de l'étape (e), qui est une énamine de formule VIII, est isolé par évaporation du solvant, de préférence à basse température dans l'intervalle de -20 à 0°C .

4. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte une étape qui consiste à isoler une énamine et à oxyder ladite énamine en un sel d'iminium intermédiaire de formule XVI par un processus d'oxydation comprenant :

(1) une opération d'aération/oxygénation réglée à l'air libre ;

(2) une opération d'aération/oxygénation réglée plus un ion métallique ;

(3) une opération d'aération/oxygénation réglée plus un coenzyme de flavine.

5. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé en ce que, dans l'étape (1) du processus

d'oxydation, un agent traitant choisi entre le peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes est ajouté.

- 5 6. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le sel d'iminium intermédiaire produit isolé par évaporation du solvant à basse température dans l'intervalle de -20 à 0°C est réduit en un alcaloïde de Vinca choisi entre la vinblastine et la vincristine par réduction avec un borohydrure de métal alcalin.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BE 8800080
BO 1046

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
D,X	US-A-4 279 817 (J.P. KUTNEY) * Document complet * ---	1	C 07 D 519/00
X	GB-A-1 536 407 (ANVAR) * Document complet * ---	1	
Y	ANGEWANDTE CHEMIE, vol. 94, no. 6, 1982, pages 465-466; N. BABA et al.: "Abhängigkeit der Enantioselektivität von der relativen Konzentration des Substrats bei einer NADH-Modellreaktion" * Document complet * ---	1,3	
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 100, 1984, page 650, abrégé no. 103314t, Columbus, Ohio, US; N. BABA et al.: "Addition effect of some macrocyclic polyethers on the asymmetric reduction with chiral NADH model compounds", & BULL. INST. CHEM. RES., KYOTO UNIV. 1983, 61(2), 113-16 * Abrégé * ---	1,3	
X	GB-A-1 551 054 (ATTA UR RAHMAN) * Document complet * ---	1	
D,Y	CHEMICAL REVIEWS, vol. 82, 1982, pages 223-243, Columbus, Ohio, US; D.M. STOUT et al.: "Recent advances in the chemistry of dihydropyridines" * Pages 239-241 * --- -/-	1,3	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
20-03-1991		VAN BIJLEN H.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

ABSENCE D'UNITE D'INVENTION

La présente demande ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir

1. Revendications :

2. Revendications :

3. Revendications :

4. Revendications :

Le présent rapport de recherche a été établi de façon complète pour les parties de la demande qui se rapportent à l'invention ou pluralité d'inventions mentionnée dans les revendications:

ETENDUE DE LA RECHERCHE

Compte tenu des documents considérés comme pertinents, le présent rapport de recherche a été établi de façon complète pour les parties de la demande qui se rapportent à l'invention ou pluralité d'inventions mentionnée en premier lieu dans les revendications, à savoir les revendications :

Les éléments figurant dans les

1. Revendications :

2. Revendications :

3. Revendications :

4. Revendications :

n'ont pas été pris en considération que dans le cadre de la recherche relative aux caractéristiques de l'invention ou de la pluralité d'inventions mentionnée en premier lieu dans les revendications



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale
Page 2

BE 8800080
BO 1046

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
Y	JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY. CHEMICAL COMMUNICATIONS, 1979, pages 582-584, Cambridge, GB; N. LANGLOIS et al.: "Antitumour alkaloids of the vinblastine-type: Air oxidation of anhydrovinblastine" * Document complet * ---	4-6	
Y	FR-A-2 358 412 (PARCOR) * Document complet * -----	4-6	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Date d'achèvement de la recherche 20-03-1991		Examineur VAN BIJLEN H.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BE 8800080
BO 1046

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 08/04/91

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US-A- 4279817	21-07-81	BE-A- 842200	16-09-76
		CA-A- 1140545	01-02-83
		DE-A- 2622894	16-12-76
		FR-A, B 2312501	24-12-76
		GB-A- 1552610	19-09-79
		JP-A- 52031099	09-03-77
		NL-A- 7605663	02-12-76
		US-A- 4144237	13-03-79
GB-A- 1536407	20-12-78	FR-A- 2296418	30-07-76
		BE-A- 837073	24-06-76
		CA-A- 1132544	28-09-82
		CH-A- 606023	13-10-78
		DE-A- 2558124	01-07-76
		JP-C- 1332607	28-08-86
		JP-A- 51088999	04-08-76
		JP-B- 60056719	11-12-85
		NL-A- 7515193	02-07-76
		US-A- 4769453	06-09-88
		US-A- 4737586	12-04-88
GB-A- 1551054	22-08-79	Aucun	
FR-A- 2358412	10-02-78	AT-B- 358190	25-08-80
		AU-B- 512158	25-09-80
		AU-A- 2685577	11-01-79
		BE-A- 856723	12-01-78
		CA-A- 1084931	02-09-80
		CH-A- 628345	26-02-82
		DE-A- 2731480	19-01-78
		GB-A- 1547039	06-06-79
		JP-A- 53009799	28-01-78
		LU-A- 77728	10-10-77
		NL-A- 7707257	17-01-78
		US-A- 4145552	20-03-79