

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 22034

(54) Bléomycines substituées sur l'azote du groupe amido, leurs sels, leur procédé de préparation et leurs applications thérapeutiques.

(51) Classification internationale (Int. Cl. ³). C 07 H 15/26; A 61 K 31/73.

(22) Date de dépôt..... 29 décembre 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : JP, 29 décembre 1981, n° 210447/81.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 28 du 18-7-1983.

(71) Déposant : Société dite : NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA. — JP.

(72) Invention de : Hamao Umezawa, Akio Fujii, Yasuhiko Muraoka, Tokuji Nakatani, Takeyo Fu-
kuoka et Katsutoshi Takahashi.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

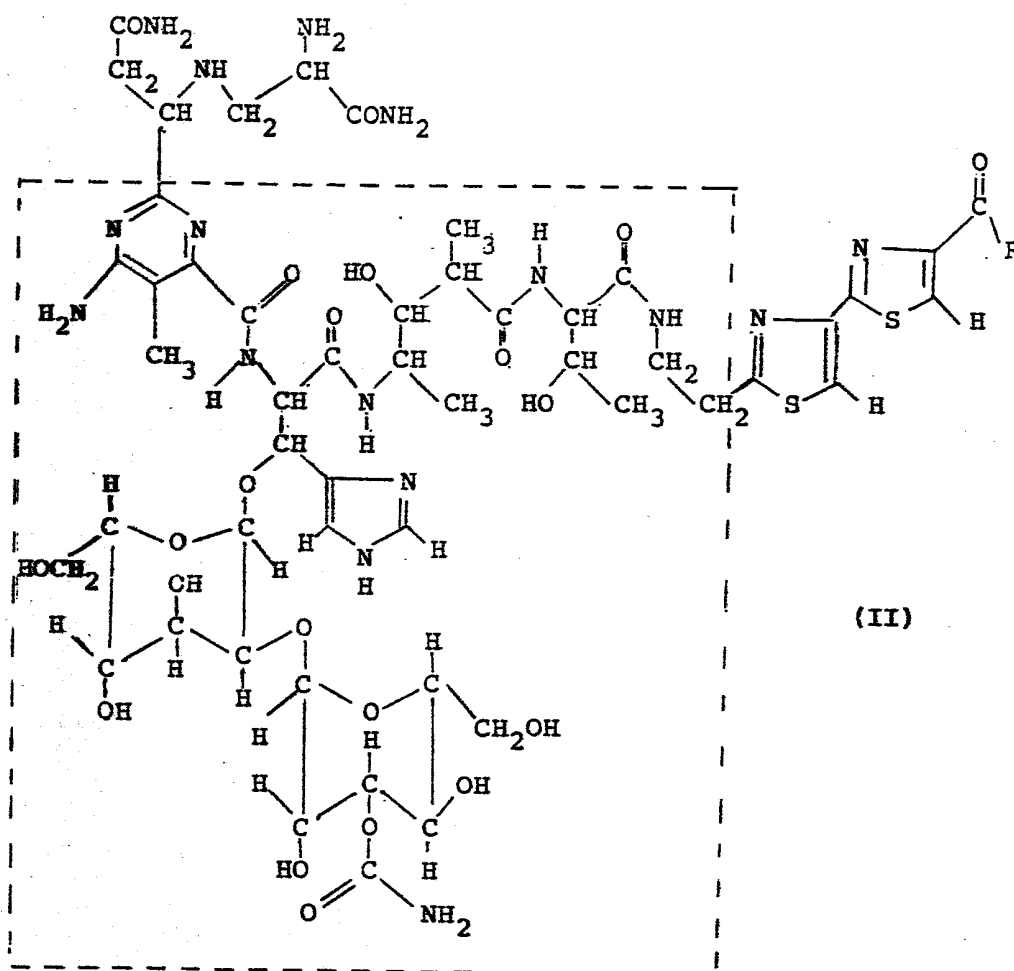
(74) Mandataire : Cabinet Lavoix,
2, place d'Estienne-d'Orves, 75441 Paris Cedex 09.

La présente invention concerne de nouvelles bléomycines substituées sur l'azote du groupe amido, leurs sels et un procédé permettant de les préparer.

Les bléomycines sont une famille de substances
5 antibiotiques carcinostatiques découverte en 1966 par Umezawa, l'un des inventeurs de la présente invention, et ses collaborateurs [Journal of Antibiotics, 19A, page 200 (1966)]. Elle est produite par Streptomyces verticillus, un Actinomycète, et c'est un glycopeptide hydrosoluble basique capable
10 de chélater facilement un atome de cuivre divalent. Dans une culture ordinaire, 16 éléments de la famille des bléomycines sont produits et sont chacun isolés [par exemple, Umezawa et coll., Journal of Antibiotics, 19A, page 210 (1966)]. Parmi ces bléomycines, A₁, A₂, A₅, B₂ et déméthyl-
15 A₂ sont actuellement largement utilisées sous la forme de mélanges exempts de cuivre (qu'on appellera ci-après complexes de bléomycine) dans les domaines cliniques de la thérapie du cancer; plus particulièrement, elles sont utilisées avec succès dans le traitement du carcinome à cellules squameuses
20 comme application principale, le cancer de la peau, le cancer de la tête et du cou, le cancer du poulmon et le lymphome malin. Diverses bléomycines sont également décrites dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3 922 262 et le brevet des Etats-Unis d'Amérique Re 30 451.

25 Les bléomycines sont généralement produites sous la forme contenant du cuivre dans la fermentation ordinaire. La forme exempte de cuivre est obtenue en éliminant le cuivre de la forme contenant du cuivre. Le terme " bléomycine ", tel qu'il est utilisé dans le présent mémoire, englobe
30 à la fois la forme contenant du cuivre et la forme exempte de cuivre, sauf indication contraire.

Les bléomycines sont représentées par la formule générale (II) :



dans laquelle R est un reste amine terminal de bléomycine;
et le cuivre chélaté est omis dans le cas de la forme conte-
nant du cuivre.

Cependant, on a constaté que les bléomycines
5 étaient inactivées par l'action d'une enzyme d'inactivation
de la bléomycine [qu'on désignera ci-après plus brièvement
par enzyme d'inactivation; Umezawa et coll., Journal of
Antibiotics, volume 27, page 419 (1974)]. On a encore cons-
taté que les bléomycines étaient relativement moins inacti-
10 vées dans la peau et le poumon où elles déploient une grande
activité, tandis qu'elles sont facilement inactivées dans

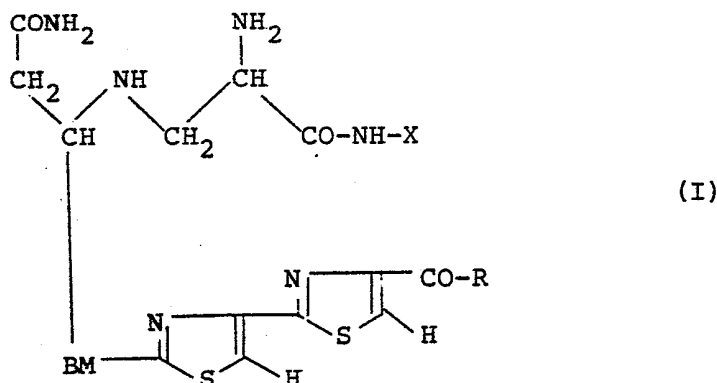
l'estomac où elles sont supposées ne pas avoir d'action et que ce phénomène d'inactivation est moins marqué dans le carcinome à cellules squameuses de la souris que dans le sarcome de la souris, tous deux étant induits par le 20-methylcholanthrène [Umezawa et coll. Journal of Antibiotics, Volume 25, page 409 (1972), Volume 27, page 419 (1974)]. En outre, on a constaté que l'action d'inactivation de bléomycine se manifestait en cas de carcinome à cellules squameuses de la tête et du cou des êtres humains, en particulier ceux du type à faible différenciation contre lesquels les bléomycines sont supposées ne pas être si efficaces [Mueller et coll., Cancer, Volume 40, page 2787 (1977)].

Comme on le comprendra d'après les documents ci-dessus, les bléomycines sont incapables d'exercer une activité suffisante contre les carcinomes contenant une enzyme d'inactivation de la bléomycine de grande activité. C'est une des raisons de la nécessité d'améliorer davantage les bléomycines. La Demanderesse envisage que s'il est possible de découvrir un dérivé de bléomycine difficilement sensible à une inactivation enzymatique, il deviendrait possible de traiter plus efficacement, par exemple, le cancer de la tête et du cou, le cancer de l'oesophage, le cancer du poumon et les carcinomes à cellules squameuses dans d'autres régions et de traiter des adénocarcinomes tels que le cancer de l'estomac qui ne sont pas sensibles au traitement par des bléomycines classiques. De ce point de vue, la Demanderesse a effectué des recherches poussées qui ont abouti à la découverte que les bléomycines étaient inactivées à un moindre degré lorsqu'un substituant (-X) est introduit sur l'atome d'azote de la liaison amide de la structure partielle, le 2,3-diaminopropanamide ($-\text{NH}-\text{CH}_2-\overset{\text{NH}_2}{\underset{|}{\text{CH}}}-\text{COHN}_2$), des bléomycines. La présente invention est basée sur cette découverte.

La présente invention se propose principalement de fournir de nouvelles bléomycines qui sont difficilement inactivées par l'enzyme d'inactivation et de fournir un procédé pour leur préparation.

D'autres buts et avantages de l'invention ressortiront de la description qui va suivre.

Selon la présente invention, on fournit des bléomycines substituées sur l'azote du groupe amido ou leurs sels, des intermédiaires pour leur préparation, et un procédé pour leur préparation, lesdites bléomycines substituées sur l'azote du groupe amido étant représentées par la formule générale:



- 10 dans laquelle BM représente un fragment de squelette de bléomycine; X représente (1) un groupe alkyle de 1 à 18 atomes de carbone, (2) un groupe aminoalkyle de 1 à 12 atomes de carbone, (3) un groupe alkyle inférieur portant comme substituant (a) de 1 à 3 atomes d'halogène, (b) 1 ou 2 groupes phényle, (c) un groupe indolye, ou (d) un groupe hétérocyclique à cinq ou six chaînons contenant un atome d'oxygène, de soufre ou d'azote (parmi les groupes substituants, le groupe phényle ou indolye peut encore être substitué par un atome d'halogène ou un groupe alcoxy inférieur), (4) un
- 15 groupe X_1 (alkyle inférieur) [où X_1 représente :
- $$\begin{array}{c}
 X_2 \\
 | \\
 -N-X_3 \quad \text{ou} \quad -N-X_3 \\
 | \\
 X_4
 \end{array}$$
- 20 kyle inférieur ou benzyle, X_3 est (a) un groupe alkyle inférieur, (b) un groupe phényl(alkyle inférieur), ou (c) un
- 25 groupe mono- ou di-(alkyle inférieur)amino (alkyle inférieur) qui peut être substitué par un groupe phényle ou halogénophényle, X_4 est (a) un groupe alkyle inférieur ou (b) un groupe phényl(alkyle inférieur), (5) un groupe naphtyle, (6) un groupe thiazolyle, ou (7) un groupe N-phényl(alkyle inférieur)-
- 30 pipérazinyle; et R représente un reste amino terminal de la

bléomycine.]

Le fragment de squelette de bléomycine représenté par BM est la portion d'une molécule de bléomycine délimitée par les pointillés dans la formule générale (II)

- 5 des bléomycines et englobe aussi bien la forme contenant du cuivre que la forme exempte de cuivre, sauf indication contraire. Les groupes alkyle inférieurs sont des groupes alkyle de 1 à 6 atomes de carbone, par exemple méthyle, éthyle, n-propyle, isopropyle, n-butyle, isobutyle, n-pentyle, 3-
10 méthylbutyle, 3-méthylpentyle et n-hexyle.

Des exemples de groupes individuels représentés par X dans la formule générale (I) sont les suivants :

- (1) Des groupes alkyle de 1 à 18 atomes de carbone: méthyle, éthyle, n-propyle, isopropyle, n-butyle, isobutyle, tertio-
15 butyle, n-pentyle, 3-méthylbutyle, néopentyle, n-heptyle, 3-méthylpentyle, n-hexyle, 1,5-diméthylhexyle, isohexyle, n-octyle, n-décyle, lauryle, myristyle, cétyle et stéaryle.
(2) Des groupes aminoalkyle de 2 à 12 atomes de carbone : 2-aminoéthyle, 3-aminopropyle, 4-aminobutyle, 6-aminohexyle,
20 12-aminododécyle, et 4-amino-4-méthyl-1-diméthylpentyle.
(3) Des groupes alkyle inférieurs ayant comme substituant (a) de 1 à 3 atomes d'halogène, (b) 1 ou 2 groupes phényle, (c) un groupe indolyle, ou (d) un groupe hétérocyclique à cinq ou six chaînons contenant un atome d'oxygène, de soufre
25 ou d'azote (parmi les groupes substituants, le groupe phényle ou indolyle peut encore être substitué par un atome d'halogène ou un groupe alkoxy inférieur) : 2,2,2-trifluoroéthyle, 2,2,2-trichloréthyle, 2,2-difluoréthyle, 2,2-dichloréthyle, benzyle, diphénylméthyle, 2-phényléthyle , 2,2-diphényléthyle,
30 le, 1-phényléthyle, 1,2-diphényléthyle, 3-phénylpropyle, 2-phénylisopropyle, 1,3-diphénylpropyle, 3,3-diphénylpropyle, 4-phénylbutyle, 4,4-diphénylbutyle, chlorobenzyle, dichlorobenzyle, bromobenzyle, méthoxybenzyle, diméthoxybenzyle, éthoxybenzyle, méthylènedioxybenzyle, propoxybenzyle, p-chlorophényléthyle, p-méthoxyphényléthyle, p-benzyloxybenzyle,
35 furylméthyle, 2-furyléthyle, 2-thiazolylméthyle, 2-pyrazolylméthyle, 2-imidazolylméthyle, 4-imidazolylméthyle, 2-thiénylméthyle, 2-pyridylméthyle, 3-pyridylméthyle, 4-pyridylméthyle, 3-indolylméthyle, 2-(3-indolyl)éthyle, 4-méthoxy-3-indolyl-

méthyle, 2-pyrimidylméthyle, 2-pyrimidyléthyle, 4-pyrimidylméthyle, 4-pyrimidyléthyle, 2-piperidylméthyle, 3-pipéridylméthyle, 4-pipéridylméthyle, 2-(2-piperidyl)-éthyle, 2-(3-pipéridyl)éthyle, 2-(4-pipéridyl)éthyle, 1-(2-pipéridyl)éthyle, 5 1-(3-pipéridyl)-éthyle, 1-(4-pipéridyl) éthyle, 2-(pipéridino)-éthyle, 2-pipérazylméthyle, 2-(2-pipérazyléthyle), 2-(pipéridino)éthyle, 3-pipéridinopropyle, 2-(morpholino)éthyle, 3-(morpholino)propyle, 2-morpholinylméthyle, 3-morpholinylméthyle, 2-(morpholinyl)-éthyle, et 3-(morpholinyl)propyle.

10 (4) X_1 -(alkyle inférieur) (où X_1 est $-N-\overset{X_3}{\underset{X_4}{\underset{|}{X_2}}}$ ou $-\overset{X_2}{\underset{X_4}{\underset{|}{N}}}-X_3$) :

diméthylaminoéthyle, diéthylaminoéthyle, dipropylaminoéthyle, propylaminoéthyle, diméthylaminopropyle, diéthylaminopropyle, dipropylaminopropyle, propylaminopropyle, dibutylaminopropyle, butylaminopropyle, benzylaminopropyle, 2-phényléthylaminopropyle, 1-phényléthylaminopropyle, 3-phénylpropylaminopropyle, 4-phénylbutylaminopropyle, méthylaminoéthylaminopropyle, éthylaminopropylaminopropyle, propylaminopropylaminopropyle, butylaminopropylaminopropyle, N-(butylaminopropyle)-N-méthylaminopropyle, dibutylaminopropylaminopropyle, pentylaminopropylaminopropyle, éthylaminobutylaminopropyle, propylaminobutylaminopropyle, éthylaminopropylaminobutyle, butylaminopropylaminobutyle, benzylaminoéthylaminoéthyle, benzylaminoéthylaminopropyle, benzylaminopropylaminopropyle, benzylaminobutylaminopropyle, phényléthylaminopropylaminopropyle, N-(phényléthylaminopropyle)-N-méthylaminopropyle, N-(chlorobenzylaminopropyle)-N-méthylpropyle, N-(bromobenzylaminopropyle)-N-méthylpropyle, N-(chlorophényléthylaminopropyle)-N-méthylpropyle, benzylaminopropyle-N,N-diméthylaminopropyle, dibenzylaminopropyle-N,N-diéthylaminopropyle, et dibenzylaminopropyle-N-méthyle-N-benzylaminopropyle.

(5) des groupes naphtyle : α -naphtyle et β -naphtyle.

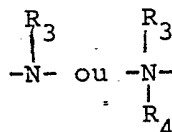
(6) des groupes thiazolyle : 2-thiazolyle, 3-thiazolyle et 36 4-thiazolyle.

(7) des groupes N-phényle(alkyle inférieur)pipéridyle : N-benzyl-4-pipéridyle, N-phényléthyl-4-pipéridyle, N-benzyl-3-pipéridyle et N-benzyl-2-pipéridyle.

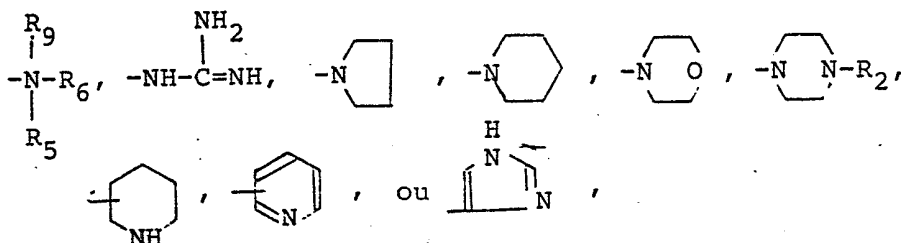
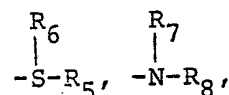
Le reste amino terminal des bléomycines représentées par R peut être l'un quelconque des groupes amino aliphatiques substitués ou non substitués, mais c'est généralement un groupe amino primaire aliphatique de nature basique représenté par la formule générale (III).



dans laquelle R_1 est (1) une chaîne de groupes alkylène qui peuvent présenter un atome d'azote intercalé entre les groupes alkylène de la chaîne / des exemples d'un tel groupe sont ceux représentés par les formules $-R_{12}-Y_1-R_{13}-$ et $-R_{12}-Y_1-R_{13}-Y_2-R_{14}-$, où R_{12} , R_{13} et R_{14} sont des groupes alkylène et Y_1 et Y_2 représentent chacun un groupe de formule :

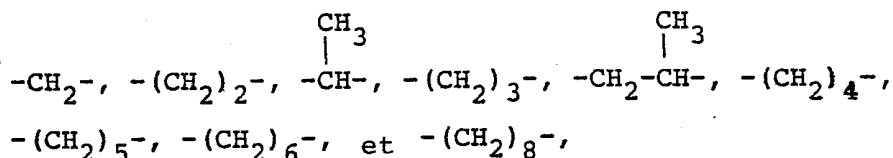


(où R_3 et R_4 sont des atomes d'hydrogène ou des groupes alkyle inférieurs qui peuvent porter des substituants) /, (2) $-N \text{ (cyclohexane) } N-$, ou (3) un groupe phénylène; et R_2 est l'un quelconque des groupes de nature basique / des exemples d'un tel groupe sont ceux représentés par la formule :



dans laquelle R_4 est comme défini ci-dessus; R_5 , R_6 et R_9 représentent chacun un groupe alkyle inférieur qui peut porter un substituant; et R_7 et R_8 représentent chacun un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle de 1 à 10 atomes de carbone

pouvant porter un substituant $\overline{7}$. Le groupe alkylène du groupe amino ci-dessus est celui ayant 1 à 8 atomes de carbone, tel que, par exemple:

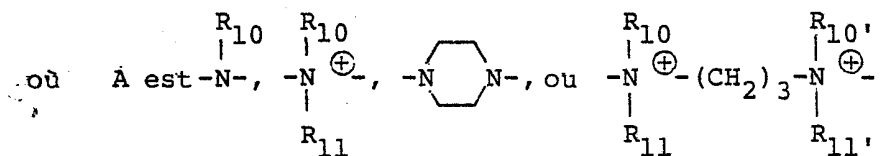
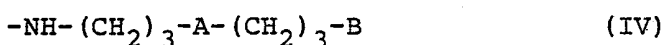


bien que les groupes alkylène ayant de 2 à 4 atomes de carbone soient le plus souvent utilisés. Les substituants des groupes alkyle ci-dessus comprennent les groupes hydroxyle, alcoxy (par exemple méthoxy, éthoxy, propoxy et butoxy), phényle $\overline{7}$ qui peut porter un ou plusieurs substituants choisis entre des halogènes, des groupes cyano, alkyle inférieurs, benzyloxy, et des groupes benzyloxy substitués (par exemple par un groupe alkoxy, phénoxy ou un halogène) $\overline{7}$, et des groupes cycloalkyle de 5 à 13 atomes de carbone.

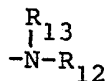
Des exemples des groupes amino ci-dessus comprennent les suivants : 2-aminoéthylamino, 3-aminopropylamino, 2-diméthylaminoéthylamino, 2-diéthylaminoéthylamino, 3-diméthylaminopropylamino, 3-diéthylaminopropylamino, 3-(3-butylaminopropylamino)-propylamino, 3-(2-oxypropylamino)propylamino, 3-pipéridinopropylamino, 3-(1-phényléthylamino)propylamino, 2-aminopropylamino, 3-méthylaminopropylamino, 3-butylaminopropylamino, 3-(6-aminohexylamino)propylamino, 3-triméthylaminopropylamino, 3-(3-diméthylaminopropylamino)propylamino, 3-(3-aminopropylamino)-propylamino, 3- $\overline{N}$ -méthyl-N-(3-aminopropyl)amino- $\overline{7}$ -propylamino, 3-pyrrolidinylpropylamino, 3-pipéridinylpropylamino, 3-morpholinopropylamino, 3-pipérazinylpropylamino, 3- $\overline{4}$ -(3-aminopropylpipérazinyl)- $\overline{7}$ -propylamino, 3-(3-pyrrolidinylpropylamino)propylamino, 3-(3-pipéridinylpropylamino)propylamino, 3-(3-morpholinylpropylamino)-propylamino, 3-(3-oxypropylamino)propylamino, 3-(3-méthoxypropylamino)propylamino, 3-benzylaminopropylamino, m-aminométhylbenzylamino, p-aminométhylbenzylamino, 2-cyclopentylaminoéthylamino, 3-cyclohexylaminopropylamino, 4-cyclohexylaminobutylamino, cycloheptylaminopropylamino, 3-cyclooctylaminopropylamino, 3- $\overline{N}$ -méthyl-N-(3-cyclooctylméthyl-

- aminopropyl) amino / propylamino, 3-cyclodécanylméthylamino-propylamino, 3- { N-méthyl -N- / 3- (2-p-chlorophényléthylamino) propyl / amino } propylamino, 3- { N-méthyl -N- / 3- (m,p-dibenzoyloxybenzyl) aminopropyl / amino } propylamino, 3- { N-méthyl -N- / 3- (p-cyanobenzylamino) propyl / amino } propylamino, 3- { N-méthyl -N- / 3- (cycloundécanylméthylamino) propyl / amino } -propylamino, 3- { N-méthyl -N- / bis(m,p-dibenzoyloxybenzyl) -aminopropyl / amino } propylamino, 3- { N,N-diméthyl -N- / 3- (dibenzylamino) propyl / amino } propylamino, 3- { N,N-diéthyl -N- / 3- (dibenzylaminopropyl) / amino } propylamino, 3- { N,N-diméthyl -N- / 3- (N,N-diméthyl -N- (3-dibenzylaminopropyl -N- (3-dibenzylaminopropyl) / amino } propylamino, 3- { N,N-diméthyl -N- / 3- (N,N-diméthyl -N- (3-dibenzylaminopropyl) -amino) propyl / amino } propylamino, 3- { N,N-diméthyl -N- / 3- (N,N-diméthyl -N- (3-cyclooctylméthylaminopropyl) amino) propyl / amino } propylamino, 3- / 4- (3-dibenzylaminopropyl) pipéridyl / -propylamino et 3- { 4- / 3- (cyclooctylméthylamino) propyl / pipéridyl } propylamino.

- Comme composés avantageux, on peut citer ceux dans lesquels R est un groupe 3- / (S) -1'-phényléthyl / amino-propylamino ou 3'-(n-butylaminopropyl) aminopropylamino et ceux présentant un reste amine représenté par la formule (IV) :



- dans laquelle R_{10} , $\text{R}_{10'}$, R_{11} et $\text{R}_{11'}$, qui peuvent être identiques ou différents, représentent chacun un groupe alkyle inférieur, benzyle ou un groupe benzyle halogéné et E représente



- où R_{12} représente (1) un groupe phényl (alkyle inférieur), (2) un groupe phényl (alkyle inférieur) portant sur le noyau phényle un ou plusieurs substituants choisis parmi (a) des halogènes, (b) des groupes alkyles inférieurs, (c) des grou-

pes alcoxy inférieurs, (d) un groupe cyano, (e) un groupe trifluorométhyle, (f) un groupe benzyloxy qui peut porter sur le noyau phényle des substituants tels que des halogènes, un groupe alcoxy et phénoxy, (g) des groupes di(alkyle

5 inférieur)amino, et (h) un groupe phényle, (3) un groupe cyclohexyle, (4) un groupe triphénylméthyle, (5) un groupe naphthylméthyle, (6) un groupe furylméthyle, (7) un groupe thiophéneméthyle, (8) un groupe alkyle inférieur substitué par un groupe cycloalkyle de 5 à 13 atomes de carbone, ou

10 (9) un groupe norbornène-2-méthyle; et R_{13} représente (1) un atome d'hydrogène, (2) un groupe benzyle, ou (3) un groupe benzyle portant sur le noyau phényle un ou plusieurs halogènes ou groupes benzyloxy comme substituant. Ces composés sont avantageux en raison de leur toxicité pulmonaire

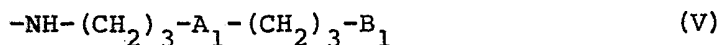
15 relativement faible. Dans les formules ci-dessus, les groupes alkyle inférieur comprennent les groupes méthyle, éthyle et butyle; les groupes phényl (alkyle inférieur) comprennent les groupes benzyle, 2-phényléthyle, 1-phényléthyle, 3-phénylpropyle, 2,2-diphényléthyle, et dibenzylméthyle;

20 les groupes phényle(alkyle inférieur) portant des substituants sur le noyau phényle comprennent les groupes 2-p-chlorophényléthyle, p-chlorobenzyle, o-chlorobenzyle, m-chlorobenzyle, 1-(p-chlorophényl)-éthyle, o,p-dichlorobenzyle, m,p-dichlorobenzyle, p-bromobenzyle, p-fluorobenzyle,

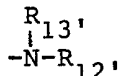
25 pentafluorobenzyle, m-trifluorométhylbenzyle, p-méthylbenzyle, p-diéthylaminobenzyle, p-méthoxybenzyle, o,p-diméthoxybenzyle, m,p-dibenzyloxybenzyle, p-cyanobenzyle et p-phénylbenzyle; et les groupes alkyle inférieurs substitués par un groupe cycloalkyle de 5 à 11 atomes de carbone comprennent les groupes cyclopentylméthyle, cyclohexylméthyle, cycloheptylméthyle, cyclooctylméthyle, cycloundécanylméthyle et 2-cyclohexyléthyle.

Des composés particulièrement avantageux sont ceux représentés par la formule générale (I) dans laquelle

35 R est un groupe 1-phényléthylaminopropylamino, butylaminopropylamino ou un groupe amino représenté par la formule générale (V) :



dans laquelle A_1 représente $\begin{array}{c} R_{10}' \\ | \\ -N- \end{array}$ ou $\begin{array}{c} R_{10}' \\ | \\ -N- \\ | \\ R_{11}' \end{array}$ (où R_{10}' et R_{11}' représentent chacun un groupe alkyle inférieur ou benzyle) et B_1 représente



- 5 où R_{12}' représente (1) un groupe phényl-(alkyle inférieur) qui peut porter sur le noyau phényle un ou deux substituants comprenant (a) des halogènes, (b) un groupe cyano, et (c) un groupe benzyloxy, ou (2) un groupe alkyle inférieur substitué par un groupe cycloalkyle de 5 à 13 atomes de carbone;
 10 et R_{13}' est l'hydrogène ou un groupe benzyle qui peut porter un ou deux groupes benzyloxy comme substituants.

Les combinaisons de X et R, qui présentent une toxicité pulmonaire particulièrement basse, sont les suivantes :

- 15 Les bléomycines substituées sur l'azote du groupe amido dans lesquelles X est le groupe isopropyle, (S)-1-phényléthyle, diéthylamino-1-méthylbutyle, dibutylaminopropyle, ou n-butylaminopropylaminopropylamino et R est un groupe 1-phényléthylamino ou N-(alkyle inférieur)-N-(halogéno-
 20 benzylaminopropyl)aminopropylamino; leurs sels; les bléomycines substituées sur l'azote du groupe amido dans lesquelles X est un groupe alkyle de 3 à 8 atomes de carbone, les groupes 1,5-diméthylhéxyle, benzyle, 1-phényléthylaminopropyle, di-n-butylaminopropyle, n-butylaminopropylaminopropyle,
 25 N-méthyl-N-benzyl-N-(dibenzylaminopropyl)aminopropyle, ou N-méthyl-N-(halogénophényléthylaminopropyl)aminopropyle et R est un groupe N-méthyl-N-(halogénophényléthylaminopropyl)aminopropylamino, N-méthyl-N-benzyl-N-(dibenzylaminopropyl)aminopropylamino, N-méthyl-N-bis(m,p-dibenzyloxybenzyl)aminopropyl/
 30 aminopropylamino, N-méthyl-N-méthyl-N-(dibenzylaminopropyl)aminopropylamino, N-éthyl-N-éthyl-N-(dibenzylaminopropyl)aminopropylamino, N-méthyl-N-(cyclooctylméthylaminopropyl)aminopropylamino, ou N-méthyl-N-(cyanobenzylaminopropyl)aminopropylamino; et leurs sels.

Comme exemples des composés de la présente invention, on peut citer ceux indiqués sur le Tableau I. Sur le Tableau I, "BLM" figurant dans le nom du composé représente "bléomycine" et le composé représenté par la formule générale (I) est désigné par "nom de R (reste amino)-(amido)-N- $\sqrt{\text{nom de X}}$ -BLM".

TABLEAU 1

Composé N°	Nom du composé	Abréviation
1	2-(4'-Imidazolyl)éthylamino-(amido)N-[méthyl]-BLM	dH-MMA
2	2-(4'-Imidazolyl)éthylamino-(amido)N-[éthyl]-BLM	dH-MEA
3	2-(4'-Imidazolyl)éthylamino-(amido)N-[isopropyl]-BLM	dH-IPA
4	2-(4'-Imidazolyl)éthylamino-(amido)N-[benzyl]-BLM	dH-BA
5	2-(4'-Imidazolyl)éthylamino-(amido)N-[3-(S)-1'-phényléthyl]-aminopropyl]-BLM	dH-PEP
6	2-(4'-Imidazolyl)éthylamino-(amido)N-[2-aminoéthyl]-BLM	dH-EDA
7	4-Guanidinobutylamino-(amido)N-[isopropyl]-BLM	dB2-IPA
8	4-Guanidinobutylamino-(amido)N-[1',6'-diméthylheptyl]-BLM	dB2-DHA
9	4-Guanidinobutylamino-(amido)N-[2',2',2'-trifluoréthyl]-BLM	dB2-TFEA
10	4-Guanidinobutylamino-(amido)N-[octyl]-BLM	dB2-OCT
11	4-Guanidinobutylamino-(amido)N-[3-(S)-1'-phényléthyl]amino-propyl]-BLM	dB2-PEP
12	4-Guanidinobutylamino-(amido)N-[3-(di-n-butylamino)propyl]-BLM	dB2-BPA
13	4-Guanidinobutylamino-(amido)N-[lauryl]-BLM	dB2-LAA
14	4-Guanidinobutylamino-(amido)N-[benzyl]-BLM	dB2-BA

TABLEAU 1 (Suite)

15	4-Guanidinobutylamino-(amido)N-[diphénylméthyl]-BLM	dB2-ADPM
16	4-Guanidinobutylamino-(amido)N-[1',2'-diphényléthyl]-BLM	dB2-DPE
17	4-Guanidinobutylamino-(amido)N-[β-naphtyl]-BLM	dB2-NA
18	4-Guanidinobutylamino-(amido)N-[2-furylméthyl]-BLM	dB2-FFA
19	4-Guanidinobutylamino-(amido)N-[3-pyridylméthyl]-BLM	dB2-AMPY
20	4-Guanidinobutylamino-(amido)N-[2-thiazolylméthyl]-BLM	dB2-ATZ
21	3-((S)-1'-phényléthyl)aminopropylamino-(amido)N-[isopropyl]-BLM	dPEP-IPA
22	3-((S)-1'-phényléthyl)aminopropylamino-(amido)N-[3-((S)-1'-phényléthyl)aminopropyl]-BLM	dPEP-PEP
23	3-((S)-1'-phényléthyl)aminopropylamino-(amido)N-[benzyl]-BLM	dPEP-BA
24	3-((S)-1'-phényléthyl)aminopropylamino-(amido)N-[p-chlorobenzyl]-BLM	dPEP-CBA
25	3-((S)-1'-phényléthylamino)propylamino-(amido)N-[stéaryl]-BLM	dPEP-STE
26	3-((S)-1'-phényléthylamino)propylamino-(amido)N-[lauryl]-BLM	dPEP-LAA
27	3-((S)-1'-phényléthylamino)propylamino-(amido)N-[octyl]-BLM	dPEP-OCT
28	3-((S)-1'-phényléthylamino)propylamino-(amido)N-[5-méthoxyindol-3-yléthyl]-BLM	dPEP-MTA
29	3-((S)-1'-phényléthylamino)propylamino-(amido)N-[12-aminodecanyl]-BLM	dPEP-DAD

TABLEAU 1 (Suite)

30	3-((S)-1'-phényléthylamino)propylamino-(amido)N-[1',2'-diphényléthyl]-BLM	dPEP-DPE
31	3-((S)-1'-phényléthylamino)propylamino-(amido)N-[diphénylméthyl]-BLM	dPEP-ADPM
32	3-((S)-1'-phényléthylamino)propylamino-(amido)N-[1,6-diméthylheptyl]-BLM	dPEP-DHA
33	3-((S)-1'-phényléthylamino)propylamino-(amido)N-[2-(1-pipérazinyl)éthyl]-BLM	dPEP-APZ
34	3-((S)-1'-phényléthylamino)propylamino-(amido)N-[3-(di-n-butylamino)propyl]-BLM	dPEP-BPA
35	3-((S)-1'-phényléthylamino)propylamino-(amido)N-[N-benzylpipérazin-4-yl]-BLM	dPEP-ABP
36	3-((S)-1'-phényléthylamino)propylamino-(amido)N-[4-diéthylamino-1-méthylbutyl]-BLM	dPEP-ADP
37	3-[N-méthyl-N-(3-n-butylaminopropyl)amino]propylamino-(amido)N-[isopropyl]-BLM	dBAPP-IPA
38	3-[N-méthyl-N-(3-n-butylaminopropyl)amino]propylamino-(amido)N-[3-[N-méthyl-N-(3-n-butylaminopropyl)amino]propyl]-BLM	dBAPP-BAPP
39	3-[N-méthyl-N-[3-(p-chlorobenzyl)aminopropyl]amino]-propylamino-(amido)N-[3-(S)-1'-phényléthyl]aminopropyl]-BLM	dMCLBZ-PEP
40	3-[N-méthyl-N-[3-(p-chlorobenzyl)aminopropyl]amino]-propylamino-(amido)N-[octyl]-BLM	dMCLBZ-OCT

TABLEAU 1 (Suite)

41	3-{N-méthyl-N-[3-(p-chlorobenzyl)aminopropyl]amino}propyl-amino-(amido)N-[1,2-diphényléthyl]-BLM	dMCLBZ-DPE
42	3-{N-méthyl-N-[3-(p-chlorobenzyl)aminopropyl]amino}propyl-amino-(amido)N-[1,5-diméthylhexyl]-BLM	dMCLBZ-DHA
43	3-{N-méthyl-N-[3-(2-(p-chlorophényl)éthyl)aminopropyl]amino}propylamino-(amido)N-[3-((S)-1'-phényléthyl)aminopropyl]-BLM	dMCLPE-PEP
44	3-{N-méthyl-N-[3-(2-(p-chlorophényl)éthyl)aminopropyl]amino}propylamino-(amido)N-[octyl]-BLM	dMCLPE-OCT
45	3-{N-méthyl-N-[3-(2-(p-chlorophényl)éthyl)aminopropyl]amino}propylamino-(amido)N-[3-{N-méthyl-N-[3-(2-(p-chlorophényl)éthyl)aminopropyl]amino}propyl]-BLM	dMCLPE-MCLPE
46	3-{N-méthyl-N-[3-(2-(p-chlorophényl)éthyl)aminopropyl]amino}propylamino-(amido)N-[3-(di-n-butylamino)propyl]-BLM	dMCLPE-BPA
47	3-{N-méthyl-N-benzyl-N-[3-(dibenzylamino)propyl]amino}propylamino-(amido)N-[3-((S)-1'-phényléthyl)aminopropyl]-BLM	dMTBZ-PEP
48	3-{N-méthyl-N-benzyl-N-[3-(dibenzylamino)propyl]amino}propylamino-(amido)N-[octyl]-BLM	dMTBZ-OCT
49	3-{N-méthyl-N-benzyl-N-[3-(dibenzylamino)propyl]amino}propylamino-(amido)N-[3-{N-méthyl-N-benzyl-N-[3-(dibenzylamino)propyl]amino}propyl]-BLM	dMTBZ-MTBZ
50	3-{N-méthyl-N-benzyl-N-[3-(dibenzylamino)propyl]amino}propylamino-(amido)N-[3-[N-méthyl-N-(3-n-butylaminopropyl)]aminopropyl]-BLM	dMTBZ-BAPP

TABLEAU 1 (Suite)

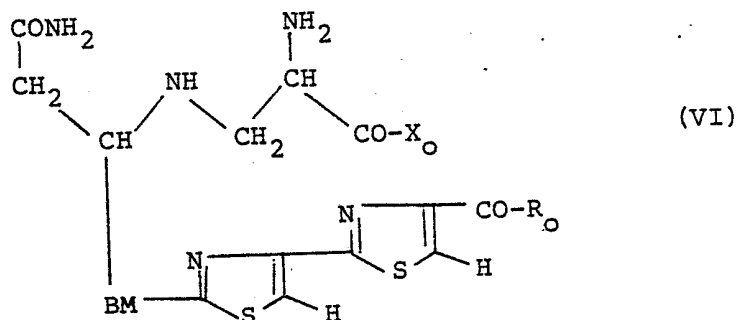
51	3-{N-méthyl-N-benzyl-N-[3-(dibenzylamino)propyl]amino}-propylamino-(amido)N-[benzyl]-BLM	dMTBZ-BA
52	3-{N,N-diméthyl-N-[3-(dibenzylamino)propyl]amino}-propylamino-(amido)N-[3-(S)-1'-phényl]aminopropyl]-BLM	dMMDBZ-PEP
53	3-{N,N-diméthyl-N-[3-(dibenzylamino)propyl]amino}-propylamino-(amido)N-[n-octyl]-BLM	dMMDBZ-OCT
54	3-{N,N-diméthyl-N-[3-(dibenzylamino)propyl]amino}-propylamino-(amido)N-[3-(di-n-butylamino)propyl]-BLM	dMMDBZ-BPA
55	3-{N,N-diéthyl-N-[3-(dibenzylamino)propyl]amino}-propylamino-(amido)N-[3-(S)-1'-phényléthyl]aminopropyl]-BLM	dEEDBZ-PEP
56	3-{N,N-diéthyl-N-[3-(dibenzylamino)propyl]amino}-propylamino-(amido)N-[octyl]-BLM	dEEDBZ-OCT
57	3-{N,N-diéthyl-N-[3-(dibenzylamino)propyl]amino}-propylamino-(amido)N-[3-(di-n-butylamino)propyl]-BLM	dEEDBZ-BPA
58	3-{N-méthyl-N-[3-(cyclooctylméthylamino)propyl]amino}-propylamino-(amido)N-[3-(di-n-butylamino)propyl]-BLM	dMCO-BPA
59	3-{N-méthyl-N-[3-(cyclooctylméthylamino)propyl]amino}-propylamino-(amido)N-[octyl]-BLM	dMCO-OCT
60	3-{N-méthyl-N-[3-(cyclooctylméthyl)aminopropyl]amino}-propylamino-(amido)N-[3-(S)-1'-phényléthylamino)propyl]-BLM	dMCO-PEP
61	3-{N-méthyl-N-[3-(p-cyanobenzylamino)propyl]amino}-propylamino-(amido)N-[3-(di-n-butylamino)propyl]-BLM	dMCNBZ-BPA

TABLEAU 1 (Suite)

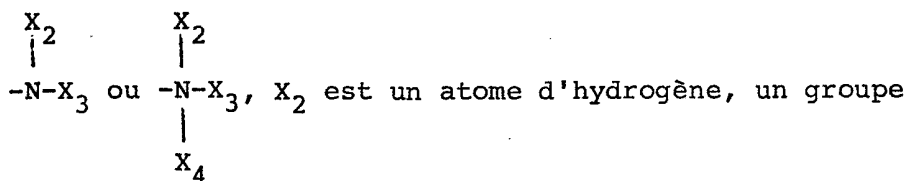
62	3-{N-méthyl-N-[3-(p-cyanobenzylamino)propyl]amino}propylamino-(amido)N-[octyl]-BLM	dMCNBZ- OCT
63	3-{N-méthyl-N-[3-(p-cyanobenzylamino)propyl]amino}propylamino-(amido)N-[3-((S)-1'-phényléthylamino)propyl]-BLM	dMCNBZ- PEP
64	3-{N-méthyl-N-[3-bis(m,p-dibenzylloxybenzyl)aminopropyl]amino}-propylamino-(amido)N-[3-((S)-1'-phényléthyl)aminopropyl]-BLM	dMDDBZOBZ- PEP
65	3-{N-méthyl-N-[3-bis(m,p-dibenzylloxybenzyl)aminopropyl]amino}-propylamino-(amido)N-[n-octyl]-BLM	dMDDBZOBZ- OCT

Les composés de l'invention représentés par la formule générale (I) sont séparés comme décrit ci-après.

Un composé représenté par la formule (VI) suivante ou un dérivé réactif de son groupe carboxyle est condensé
5 avec une amine (décrite ci-après):



- dans laquelle BM représente un fragment de squelette de bléomycine, R_O représente un groupe hydroxyle ou un reste amino terminal de bléomycine, X_O représente un groupe hydroxyle ou un groupe de formule $-NH-X$, au moins l'un des
- IO symboles R_O et X_O représentant le groupe hydroxyle, et X représente (1) un groupe alkyle de 1 à 18 atomes de carbone, (2) un groupe aminoalkyle de 1 à 12 atomes de carbone, (3) un groupe alkyle inférieur portant comme substituant (a) de 1 à 3 atomes d'halogène, (b) 1 ou 2 groupes
- I5 phényle, (c) un groupe indolye, ou (d) un groupe hétérocyclique à cinq ou six chaînons contenant un atome d'oxygène, de soufre ou d'azote (parmi les groupes substituants, le groupe phényle ou indolye peut encore être substitué par un atome d'halogène ou un groupe alcoxy inférieur),
- 20 (4) un groupe X_1 -alkyle inférieur /où X_1 représente



- alkyle inférieur ou benzyle, X_3 est (a) un groupe alkyle inférieur, (b) un groupe phényl (alkyle inférieur), ou (c) un groupe mono- ou di-(alkyle inférieur)amino(alkyle inférieur) qui peut être substitué par un groupe phényle ou
- 5 halogénophényle, X_4 est (a) un groupe alkyle inférieur ou (b) un groupe phényl(alkyle inférieur)7, (5) un groupe naphthyle, (6) un groupe thiazolyle, ou (7) un groupe N(phényl(alkyle inférieur)pipérazinyle. Lorsque X_0 de la formule (VI) est le groupe hydroxyle, une amine de formule
- 10
$$\text{H}_2\text{N-X} \quad (\text{VII})$$
 (dans laquelle X a la définition ci-dessus) est utilisée dans la condensation, tandis que lorsque R_0 de la formule (VI) est le groupe hydroxyle et X_0 est $-\text{NH-X}$ (où X est comme défini ci-dessus, on utilise une amine de formule
- 15
$$\text{H-R} \quad (\text{VIII})$$
 (dans laquelle R est comme défini ci-dessus). Si nécessaire, le produit de condensation est débarrassé du cuivre en donnant une bléomycine substituée sur l'azote du groupe amino de formule générale (I). En outre, si nécessaire, un
- 20 sel de la bléomycine substitué sur l'azote du groupe amido est préparé d'une manière usuelle.

La condensation d'un composé de formule (VI) ou d'un dérivé réactif de son groupe carboxyle avec une amine de formule (VII) ou (VIII) est réalisée selon le processus

25 connu de formation d'une liaison amide, en particulier celui utilisé dans la chimie des peptides. On fait réagir un composé de formule (VI) avec une amine de formule (VII) ou (VIII) en présence des ractifs d'activation du groupe carboxyle qui sont utilisés dans la chimie des peptides. En

30 variante, le composé de formule (I) est obtenu par réaction d'une amine de formule (VII) ou (VIII) avec un dérivé réactif pour le groupe carboxyle d'un composé de formule (VI). Les dérivés sont, par exemple, un dérivé obtenu par réaction d'un réactif d'activation du groupe carboxyle et

35 du composé de formule (VI) ou d'un ester 3-aminopropylique du groupe carboxyle du composé de formule (VI). Comme exemples des réactifs d'activation, on peut citer les suivants:

6-chloro-1-p-chlorobenzènesulfonyl-oxybenzotriazole, 3'-sulfonate de N-éthyl-5-phénylisooxazolium, perchlorate de N-tertio-butyl-5-méthyl-isooxazolium, N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoléine (FEDQ), sulfite de di-p-nitrophényle, phosphite de tri-p-nitrophényle, trichloracétate de p-nitrophényle, dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 1-éthyl-3-(3-di-méthylaminopropyl)carbodiimide, 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyl)carbodiimide, diphénylcarbodiimine, di-p-tolylcarbodiimide, diisopropylcarbodiimide, phosphorazide de diphényle (DPPA), et phosphorocyanurate de diéthyle (DEPC).

Comme exemples des dérivés réactifs du groupe carboxyle des composés de formule (VI), on peut citer les dérivés réactifs obtenus par réaction des réactifs d'activation ci-dessus avec le groupe carboxyle; les dérivés réactifs du groupe carboxyle que l'on obtient par l'utilisation simultanée des réactifs d'activation et des additifs de condensation, comme par exemple le p-nitrophénol, le o,p-dinitrophénol, le pentachlorophénol, le 2,4,5-trichlorophénol, le pentafluorophénol, le N-hydroxysuccinimide, le 1-hydroxybenzotriazole, le N-hydroxy-5-norbornène-2,3-dicarboximide; l'ester 3-aminopropylique du groupe carboxyle de formule (IV), et les esters 3-aminopropyliques monosubstitués tels que, par exemple, l'ester 3-acétylaminopropylique, l'ester 3-succinylaminopropylique, l'ester 3-benzoylaminopropylique, l'ester 3-benzylaminopropylique, l'ester 3-p-toluènesulfonylaminopropylique, l'ester 3-(2,4-dinitrophényl)aminopropylique, l'ester 3-(3,5-diméthyl-3-oxocyclohexène-1-yl)aminopropylique, l'ester 3-(tertio-butoxycarbonyl)aminopropylique, et l'ester 3-(salicylidène)iminopropylique.

La condensation est effectuée d'une façon générale dans un solvant. Le solvant peut être n'importe lequel de ceux qui n'affectent pas la réaction, mais il est préférable d'utiliser un solvant polaire qui dissout le composé de formule (VI) utilisé comme matière de départ. Des exemples de tels solvants sont l'eau, le diméthylformamide, le

diméthylacétamide, l'acétonitrile, et leurs mélanges. Le rapport molaire de l'amine de formule (VII) ou (VIII) au composé de formule (VI) est généralement d'environ 0,5 à 20, de préférence d'environ 1 à 10. Bien que la température de réaction dépende du type de solvant et d'autres conditions, elle est cependant en général de -15° à 45°C, de préférence de -10° à 30°C. La durée de réaction est de 1 à 70 heures. Le procédé selon la présente invention est décrit en détail ci-après.

- 10 La forme contenant du cuivre du composé de formule (VI) et, si nécessaire, l'additif susmentionné sont dissous dans l'eau, le diméthylformamide, l'acétonitrile, ou un mélange de ceux-ci. On ajoute à la solution le réactif d'activation susmentionné tout en agitant entre -5° et 15°C.
- 15 Si nécessaire, on ajuste le pH du mélange à une valeur convenant pour l'activation avec un acide ou une base inorganique comme l'acide chlorhydrique ou l'hydroxyde de sodium ou avec une base organique telle que la triéthylamine ou la N-méthylmorpholine. On ajoute ensuite au mélange le
- 20 composant amine tel quel ou en solution à pH ajusté. Le mélange résultant est agité et, si nécessaire, son pH est ajusté d'une manière analogue à celle décrite ci-dessus. L'agitation est poursuivie pendant 1 à 70 heures pour obtenir le composé recherché selon la présente invention.
- 25 L'isolement du dérivé ainsi formé est réalisé de la manière suivante. Un solvant organique tel que l'acétone ou l'éther est ajouté au mélange réactionnel pour précipiter le produit désiré. Le précipité est dissous dans l'eau distillée, puis ajusté à pH 6 et, à des fins d'éli-
- 30 mination de sels, on le fait passer à travers une colonne garnie d'une résine d'adsorption telle que, par exemple, Amberlite ^(R)XAD-2 (Rohm and Haas Co.) dans l'eau distillée pour effectuer l'adsorption du produit désiré sur la résine. La colonne est lavée à l'eau distillée pour éliminer le
- 35 sel, et éluée avec du méthanol aqueux acidifié tel qu'un mélange d'acide chlorhydrique 1/50N et de méthanol (1:4 volume/volume) pour recueillir les fractions ayant un

maximum d'adsorption aux environs d'une longueur d'onde de 290 m μ . La fraction combinée est neutralisée avec Dowex ^(R)44 (une résine échangeuse d'anions du type OH de Dow Chemical Co), puis concentrée sous pression réduite et lyophilisée en donnant une poudre brute du dérivé. Dans certains cas, le stade d'élimination des sels peut être omis et la solution du précipité dans l'eau distillée peut être directement soumise au second stade du traitement.

Dans le second stade, la solution de poudre brute dan l'eau distillée passe à travers une colonne garnie de CM- ^(R)C-25 (type Na⁺; Pharmacia Fine Chemicals Co.), qui a été équilibrée avec une solution tampon 1/20 M d'acide acétique-acétate de sodium (pH 4,5), pour effectuer l'adsorption du produit désiré. La phase adsorbée est ensuite éluee par la technique du gradient linéaire de concentration qui est appliquée en ajoutant en continu du chlorure de sodium à la solution tampon ci-dessus pour augmenter la concentration de chlorure de sodium graduellement jusqu'à 1,0 M. Dans ce stade, les réactifs n'ayant pas réagi et les sous-produits tendent à être élués à un stade prématuré et peuvent être séparés au moyen d'un sélecteur à adsorption d'ultraviolets. Si l'on constate que la fraction du produit désiré est contaminée par des impuretés, la chromatographie est répétée pour éliminer la totalité de ces impuretés.

En variante, à la place de la chromatographie ci-dessus, un autre procédé de purification chromatographique peut être mis en oeuvre en utilisant une résine adsorbante Amberlite ^(R)XAD-2, par exemple. La solution aqueuse du produit brut est amenée à traverser la colonne garnie de la résine dans une solution tampon, telle que par exemple une solution aqueuse à 1% d'acétate d'ammonium pour effectuer l'adsorption du produit désiré. La phase adsorbée est éluee par la technique du gradient linéaire de concentration dans laquelle du méthanol est ajouté en continu à la solution tampon pour augmenter graduellement la concentration de méthanol. Etant donné que les réactifs n'ayant pas réagi

ont tendance à être élués à un stade prématuré et les sous-produits principaux à un stade avancé, ils peuvent être séparés par utilisation d'un sélecteur à ultraviolets. Si l'on constate que les fractions désirées sont contaminées par des impuretés, elles peuvent en être complètement débarrassées en répétant la chromatographie.

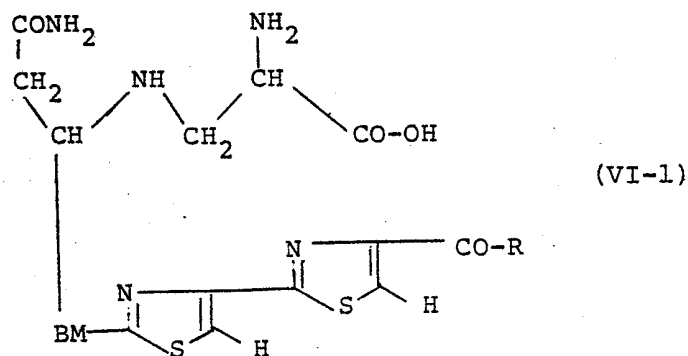
Les deux types ci-dessus de chromatographie sont réalisés seuls ou en combinaison. La fraction purifiée contenant le produit désiré est dessalée en utilisant une résine adsorbante telle que par exemple Amberlite [®]XAD-2, et lyophilisée en donnant une poudre amorphe bleue d'une bléomycine substituée sur l'azote du groupe amido contenant du cuivre. La forme exempte de cuivre est obtenue en éliminant le cuivre de la forme contenant du cuivre par un procédé connu tel que celui utilisant EDTA comme décrit dans le brevet japonais n° 31 875/77. Un exemple du processus d'élimination du cuivre est décrit ci-après.

Le produit contenant du cuivre est dissous dans l'eau distillée et la solution résultante est amenée à traverser une colonne garnie de Amberlite [®]XAD-2 dans l'eau distillée pour effectuer l'adsorption du produit contenant du cuivre. La résine est ensuite lavée avec une solution aqueuse contenant du chlorure de sodium et 5% de sel disodique de l'acide éthylènediaminetétraacétique (abrégé par EDTA.2Na) pour faire transporter l'ion cuivre par EDTA.2Na, en laissant la bléomycine substituée à l'azote du groupe amino exempte de cuivre, adsorbée sur la résine. La résine est ensuite lavée avec une solution de chlorure de sodium pour éliminer EDTA.2Na, puis avec de l'eau distillée, et enfin élue avec du méthanol aqueux acidifié, tel que par exemple un mélange acide chlorhydrique aqueux 1/50 N-méthanol (1:4 volume/volume) pour recueillir les fractions qui présentent un maximum d'adsorption aux environs de 290 mμ. La fraction combinée est ajustée à pH 6,0 avec Dowex ^R 44 (type OH; Dow Chemical Co.), concentrée sous pression réduite, et lyophilisée en donnant une poudre amorphe blanche de chlorhydrate de bléomycine

substituée sur l'azote du groupe amido exempté de cuivre. Si l'on utilise du sulfate de sodium et une solution aqueuse d'acide sulfurique à la place du chlorure de sodium et de la solution aqueuse d'acide chlorhydrique, on obtient un sulfate. Ainsi, on peut obtenir tout sel désiré par un choix de sel et de l'acide utilisés au stade d'élu-
 5 tion. Comme exemples de sels obtenus de cette manière, on peut citer l'acétate, la tartrate, le citrate, le maléate et le lactate en plus du chlorhydrate et du sulfate.

10 Lorsque la bléomycine substituée sur l'azote du groupe amido préparée comme décrit ci-dessus est soumise à une hydrolyse avec de l'acide chlorhydrique aqueux 6 N à 105°C pendant 20 heures, on décèle, hormis l'amine R-H et X-NH₂ ou un produit de décomposition de ladite amine dans
 15 certains cas, des produits de décomposition qui sont communs aux bléomycines, comprenant la L-thréonine, l'acide β -amino- β -(4-amino-6-carboxy-5-méthyl-pyrimidin-2-yl) propionique, l'acide 4-amino-3-hydroxy-2-méthyl-n-pentanoïque, la β -hydroxy-L-histidine, la β -amino-L-alanine
 20 et l'acide 2'-(2-aminoéthyl)-2,4'-bithiazole-4-carboxylique. Ce fait confirme que la bléomycine substituée sur l'azote du groupe amido a la structure chimique représentée par la formule (I) mentionnée ci-dessus.

Dans la formule générale (VI) des composés utilisés
 25 comme matière de départ, lorsque X_O est un groupe hydroxyle et R_O est un reste amino terminal des bléomycines, on obtient une déamidobléomycine (forme contenant du cuivre) de formule



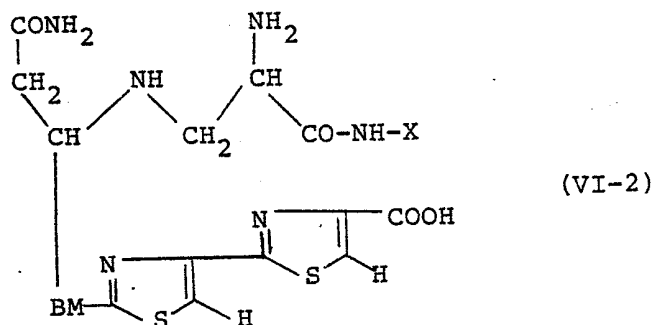
dans laquelle BM et R ont la définition donnée précédemment. On la prépare en hydrolysant des bléomycines exemptes de cuivre de formule générale (II) avec une enzyme d'inactivation de rat ou celle extraite de façon similaire de foie de bovin ou de porc.

- Par exemple, un foie de bovin est homogénéisé dans une solution tampon au phosphate et centrifugé à 8000 tr/min. La liqueur surnageante est dialysée contre un tampon au phosphate en donnant une solution d'enzyme brute. On
- 10 ajoute à cette solution d'enzyme une solution de bléomycines dans un tampon au phosphate. On laisse le mélange réagir à 37°C pendant 5 à 48 heures et on débarrasse le mélange réactionnel des protéines par un moyen approprié. La
- 15 protéine peut être éliminée par exemple en ajoutant de l'acide trichloracétique (abrégé en TCA) à une concentration de 5% pour précipiter la protéine, en séparant le précipité par centrifugation, et en lavant le précipité trois fois avec une solution à 5% de TCA pour recueillir
- 20 les liqueurs de lavage⁷. Le mélange exempt de protéine est neutralisé, mélangé avec de l'acétate de cuivre en excès pour transformer le produit désiré en un chélate de cuivre. A des fins d'élimination de sels, on fait passer le chélate de cuivre à travers une colonne garnie d'une résine adsorbante, Dowex[®] HO 40, dans de l'eau distillée pour effectuer
- 25 l'adsorption du produit désiré. Les sels sont éliminés par lavage avec de l'eau distillée et la phase adsorbée est éluée avec un mélange acide chlorhydrique 1/50 N-méthanol (1:4 volume/volume) pour recueillir les fractions qui présentent un maximum d'absorption aux environs de 290 mμ.
- 30 La fraction recueillie est neutralisée avec une résine d'échange d'anions, Dowex[®] 44 (type OH, Dow Chemical Co.), concentrée sous pression réduite, et lyophilisée. La poudre résultante est dissoute dans l'eau distillée, et amenée à traverser une colonne garnie de CM-Sephadex[®] C-25 (type
- 35 Na⁺; Pharmacia Fine Chemicals Co.) qui a été équilibrée avec une solution tampon 1/20M d'acide acétique et d'acétate de sodium de pH 4,5 pour effectuer l'adsorption. La

phase adsorbée est éluée par la méthode du gradient linéaire de concentration dans lequel du chlorure de sodium est ajouté en continu à la solution tampon ci-dessus pour augmenter graduellement la concentration en sodium jusqu'à

5 1,0 M. Les fractions d'éluat, de couleur bleue, contenant le produit désiré sont recueillies, dessalées par le procédé d'élimination de sels utilisant Diaion ^(R) HP 40 comme décrit ci-dessus, et lyophilisées en donnant une poudre amorphe bleue de déamidobléomycines contenant du cuivre.

10 Lorsque X_O est $-NH-X$ (X a la définition donnée ci-dessus) et R_O est OH dans la formule générale (VI) des composés utilisés comme matières de départ, la formule devient celle d'un acide bléomycinique à substitution sur l'azote du groupe amido;

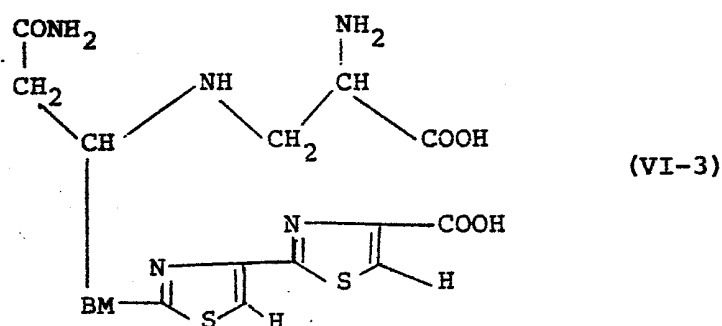


15 dans laquelle BM est comme défini plus haut. Un exemple de son procédé de synthèse est donné ci-après.

En utilisant l'enzyme d'inactivation susmentionnée, la bléomycine B_2 , qui est un composé connu, est transformée en déamidobléomycine B_2 , une déamidobléomycine de formule
 20 (VI) dans laquelle R_O est l'agmantine. Cette déamidobléomycine est amenée à réagir avec une amine de formule (VII) comme décrit ci-dessus pour former une bléomycine B_2

substituée sur l'azote du groupe amido dans laquelle R_0 est l'agmantine, et en hydrolysant le composé résultant en utilisant un mycélium de champignon connu [par exemple IFO 8502 déposé à l' "Institute for Fermentation", Osaka] pour
 5 obtenir le produit désiré.

L'acide déamidobléomycinique représenté par la formule



est une matière de départ de formule générale (VI) dans laquelle X_0 et R_0 sont des groupes hydroxyle. On l'obtient
 10 en hydrolysant un acide bléomycinique connu (voir brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3 886 133) avec l'enzyme d'inactivation susmentionnée. On l'obtient également par hydrolyse de déamidobléomycine B_2 de formule générale (VI-1) dans laquelle R est l'agmantine, en utilisant la
 15 cellule de champignon susmentionnée.

Comme exemples des amines de formule générale (VII), on peut citer les suivantes: méthylamine, éthylamine, n-propylamine, isopropylamine, n-butylamine, isobutylamine, tertio-butylamine, n-pentylamine, 3-méthylbutylamine,
 20 néopentylamine, n-heptylamine, 3-méthylpentylamine, n-hexylamine, 1,5-diméthylhexylamine, isohexylamine, n-octylamine, n-décylamine, laurylamine, myristylamine, cétylamine,

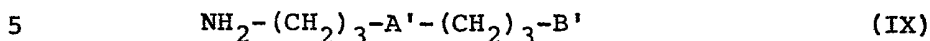
- stéarylamine, 2-aminoéthylamine, 3-aminopropylamine, 4-aminobutylamine, 6-aminohexylamine, 12-aminododécylamine, 4-amino-4-méthyl-1-diméthylpentylamine, 2,2,2-trifluoréthylamine, 2,2,2-trichloroéthylamine, 2,2-difluoréthylamine,
- 5 2,2-dichloroéthylamine, benzylamine, diphénylméthylamine, 2-phényléthylamine, 2,2-diphényléthylamine, 1-phényléthylamine, 1,2-diphényléthylamine, 3-phénylpropylamine, 2-phénylisopropylamine, 1,3-diphénylpropylamine, 3,3-diphénylpropylamine, 4-phénylbutylamine, 4,4-diphénylbutylamine,
- 10 chlorobenzylamine, dichlorobenzylamine, bromobenzylamine, méthoxybenzylamine, diméthoxybenzylamine, éthoxybenzylamine, méthylènedioxybenzylamine, propoxybenzylamine, p-chlorophényléthylamine, p-méthoxyphényléthylamine, p-benzyloxybenzylamine, furylméthylamine, 2-furyléthylamine, 2-thiazolylméthylamine, 2-pyrazolylméthylamine, 2-imidazolylméthylamine,
- 15 4-imidazolylméthylamine, 2-thiénylméthylamine, 2-pyridylméthylamine, 3-pyridylméthylamine, 4-pyridylméthylamine, indolylméthylamine, indolyléthylamine, 4-méthoxyindolylméthylamine, 2-pyrimidylméthylamine, 2-pyrimidyléthylamine,
- 20 4-pyrimidylméthylamine, 4-pyrimidyléthylamine, 2-pipéridylméthylamine, 3-pipéridylméthylamine, 4-pipéridylméthylamine, 2-(2-pipéridyl)éthylamine, 2-(3-pipéridyl)éthylamine, 2-(4-pipéridyl)éthylamine, 1-(2-pipéridyl)éthylamine, 1-(3-pipéridyl)éthylamine, 1-(4-pipéridyl)éthylamine, 2-(pipéridino)éthylamine, 2-pipérazylméthylamine, 2-(2-pipérazyléthyl)amine, 2-(pipéridino)éthylamine, 3-pipéridinopropylamine, 2-(morpholino)éthylamine, 3-(morpholino)propylamine, 2-morpholinylméthylamine, 3-morpholinylméthylamine, 2-(morpholinyl)éthylamine, 3-(morpholinyl)propylamine, diméthylaminoéthylamine, diéthylaminoéthylamine, dipropylaminoéthylamine, propylaminoéthylamine, diméthylaminopropylamine, diéthylaminopropylamine, dipropylaminopropylamine, propylaminopropylamine, dibutylaminopropylamine, butylaminopropylamine, benzylaminopropylamine, 2-phényléthylaminopropylamine, 1-phényléthylaminopropylamine, 3-phénylpropylaminopropylamine, 4-phénylbutylaminopropylamine, méthylaminoéthylaminopropylamine, éthylaminopropylaminopropylamine,
- 35

propylaminopropylaminopropylamine, butylaminopropylamino-
 propylamine, N-(butylaminopropyl)-N-méthylaminopropylamine,
 dibutylaminopropylaminopropylamine, pentylaminopropylamino-
 propylamine, éthylaminobutylaminopropylamine, propylamino-
 5 butylaminopropylamine, éthylaminopropylaminobutylamine,
 butylaminopropylaminobutylamine, benzylaminoéthylaminoéthyl-
 amine, benzylaminoéthylaminopropylamine, benzylaminopropyl-
 aminopropylamine, benzylaminobutylaminopropylamine, phényl-
 éthylaminopropylamino-propylamine, N-(phényléthylamino-
 10 propyl)-N-méthylaminopropylamine, N-(chlorobenzylaminopro-
 pyl)-N-méthylaminopropylamine, N-(bromobenzylaminopropyl)-
 N-méthylaminopropylamine, N-(chlorophényléthylaminopropyl)-
 N-méthylaminopropylamine, dibenzylaminopropyl-N,N-diméthyl-
 aminopropylamine, dibenzylaminopropyl-N,N-diéthylaminopropyl-
 15 amine, dibenzylaminopropyl-N-méthyl-N-benzylaminopropyla-
 mine, α -naphtylamine, β -naphtylamine, 2-thiazolylamine,
 3-thiazolylamine, 4-thiazolylamine, N-benzyl-4-pipéridyl-
 amine, N-phényléthyl-4-pipéridylamine, N-benzyl-3-pipéri-
 dylamine et N-benzyl-2-pipéridylamine.

20 Des amines avantageuses de formule (VIII) sont les
 amines aliphatiques primaires qui ont un groupe basique en
 plus du groupe amino participant à la réaction. Comme exem-
 ples de telles amines, on peut citer les suivantes: 2-amino-
 éthylamine, 3-aminopropylamine, 2-diméthylaminoéthylamine,
 25 2-diéthylaminoéthylamine, 3-diméthylaminopropylamine, 3-dié-
 thylaminopropylamine, 3-(3-butylaminopropylamino)-propyla-
 mine, 3-(2-hydroxypropylamino)propylamine, 3-pipéridinopro-
 pylamine, 3-(1-phényléthylamino)propylamine, 2-aminopropyl-
 amine, 3-méthylaminopropylamine, 3-butylaminopropylamine,
 30 3-(6-aminohexylamino)propylamine, 3-triméthylaminopropyl-
 amine, 3-(3-diméthylaminopropylamino)propylamine, 3-(3-ami-
 nopropylamino)propylamine, 3-N-méthyl-N-(3-aminopropyl)
 amino-7-propylamine, 3-pyrrolidinylpropylamine, 3-pipéridi-
 nylpropylamine, 3-morpholinopropylamine, 3-pipérazinylpro-
 35 pylamine, 3-4-(3-aminopropyl)pipérazinyl-7-propylamine, 3-
 (3-pyrrolidinylpropylamino)propylamine, 3-(3-pipéridinyl-
 propylamino)-propylamine, 3-(3-morpholinylpropylamino)pro-

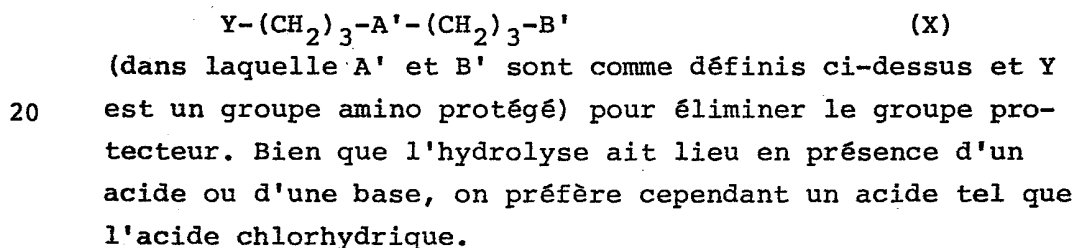
- pylamine, 3-(3-hydroxypropylamino)propylamine, 3-(3-méthoxypropylamino)-propylamine, 3-benzylaminopropylamine, m-aminométhylbenzylamine, p-aminométhylbenzylamine, 2-cyclopentylaminoéthylamine, 3-cyclohexylaminopropylamine, 4-
- 5 cyclohexylaminobutylamine, cycloheptylaminopropylamine, 3-cyclooctylaminopropylamine, 3- $\overline{N}$ -méthyl-3-N(cyclooctylméthylaminopropyl)amino $\overline{7}$ propylamine, 3-cyclodécanylméthylaminopropylamine, 3- $\overline{N}$ -méthyl-N- $\overline{3}$ -(2-p-chlorophényléthylamino)-propyl $\overline{7}$ amino $\overline{7}$ propylamine, 3- $\overline{N}$ méthyl-N- $\overline{3}$ -(m,p-
- 10 dibenzyloxybenzyl)aminopropyl $\overline{7}$ amino $\overline{7}$ propylamine, 3- $\overline{N}$ -méthyl-N- $\overline{3}$ -(p-cyanobenzylamino)propyl $\overline{7}$ amino $\overline{7}$ propylamine, 3- $\overline{N}$ -méthyl-N- $\overline{3}$ -(cycloundécanylméthylamino)propyl $\overline{7}$ amino $\overline{7}$ propylamine, 3- $\overline{N}$ -méthyl-N- $\overline{3}$ -bis(m,p-dibenzyloxybenzyl)-aminopropyl $\overline{7}$ amino $\overline{7}$ propylamine, 3- $\overline{N}$,N-diméthyl-N- $\overline{3}$ -(dibenzylamino)propyl $\overline{7}$ amino $\overline{7}$ propylamine, 3- $\overline{N}$,N-diéthyl-N- $\overline{3}$ -(dibenzylamino) $\overline{7}$ amino $\overline{7}$ propylamine, 3- $\overline{N}$,N-diméthyl-N- $\overline{3}$ -(N,N-
- 15 diméthyl-N-(3-dibenzylaminopropyl)amino)propyl $\overline{7}$ amino $\overline{7}$ propylamine, 3- $\overline{N}$,N-diméthyl-N- $\overline{3}$ -(N,N-diméthyl-N-(3-cyclooctylméthylaminopropyl)amino)-propyl $\overline{7}$ amino $\overline{7}$ propylamine, 3- $\overline{4}$ -(3-
- 20 dibenzylaminopropylamino)pipéridyl $\overline{7}$ propylamine, et 3- $\overline{4}$ -(3-cyclooctylméthylaminopropyl)pipéridyl $\overline{7}$ propylamine.

Parmi les amines de formule générale (VIII), celles qui sont représentées par la formule générale suivante sont des composés nouveaux dont la synthèse a été déjà réalisée pour la première fois par la Demanderesse :

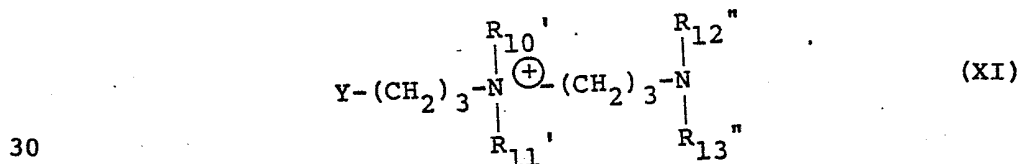


dans laquelle A' représente $\begin{array}{c} \text{R}_{10}' \\ | \\ -\text{N}- \end{array}$ ou $\begin{array}{c} \text{R}_{10}' \\ | \\ -\text{N}^+- \\ | \\ \text{R}_{11}' \end{array}$ (dans laquelle

10 R_{10}' et R_{11}' représentent chacun un groupe alkyle inférieur ou benzyle et B' représente un groupe di[phényl(alkyle inférieur)]-amino, cyanophényl(alkyle inférieur)amino, cycloalkyl(C_5-C_{13})- (alkyle inférieur)amino, ou bis[dibenzyl-
15 xyphényl(alkyle inférieur)]amino. La synthèse de ces composés est effectuée par l'hydrolyse du composé représenté par la formule générale

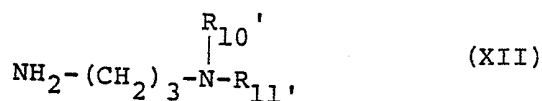


25 Parmi les matières de départ de formule générale (X), celles qui sont représentées par la formule



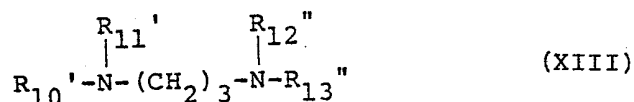
35 [dans laquelle R_{10}' , R_{11}' et Y sont comme défini ci-dessus et R_{12}'' et R_{13}'' représentent chacun un groupe phényl(alkyle inférieur)] sont préparées de la façon suivante.

Une 3-aminopropyl-N,N-dialkylamine de formule générale



5

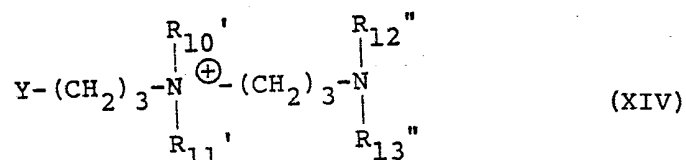
dans laquelle R_{10}' et R_{11}' sont comme défini ci-dessus) est soumise à une condensation réductrice avec le benzaldéhyde ou un phényl(aldéhyde inférieur). Le mélange réactionnel est rendu alcalin et extrait avec un solvant organique en donnant une N',N'-dibenzylaminopropyl-N,N-dialkylamine de formule générale



15

(dans laquelle R_{10}' , R_{11}' , R_{12}'' et R_{13}'' sont comme défini ci-dessus). L'amine résultante est amenée à réagir avec une 3-halogéno-propyl-amine protégée à l'azote pour former un sel quaternaire de formule

20



25

dans laquelle Y, R_{10}' , R_{11}' , R_{12}'' et R_{13}'' sont comme défini ci-dessus. Le sel quaternaire est hydrolysé en présence d'un acide, par exemple l'acide chlorhydrique 6N à une température comprise entre la température ambiante et 200° C, par exemple à 110° C, pendant 8 heures. Après élimination des sous-produits tels qu'un acide, le mélange réactionnel est concentré en donnant un chlorhydrate d'un composé de formule (XI).

30

Une amine de formule générale
alkyle inférieur

35



dans laquelle Y est comme défini ci-dessus et B'' est un groupe di[phényl(alkyle inférieur)]amino, p-cyanophényl(alkyle inférieur)amino, cycloalkyl(C_5-C_{11})-(alkyle in-

férieur) amino, ou bis-/dibenzoyloxyphényl(alkyle inférieur)/ amino, est préparée par acylation d'une bis(3-aminopropyl) (alkyle inférieur) amine avec un équivalent ou moins d'un agent acylant tel que, par exemple, le chlorure de ben-
5 zoyle, le chlorure d'acétyle, l'anhydride acétique, le carb-
benzoxy-chlorure, la S-tertio-butoxycarbonyl-4,6-diméthyl-
2-mercaptopyrimidine, ou le N-carbéthoxyphtalimide pour
former un dérivé monoacylé, en soumettant le dérivé résul-
tant à une condensation réductrice avec un équivalent d'un
10 aldéhyde lorsque B" est un groupe amino monosubstitué ou
avec 2 ou plus, de préférence 3 à 6, équivalents d'un aldé-
hyde lorsque B" est un groupe amino disubstitué, et en hy-
drolysant le groupe acyle avec l'acide chorhydrique.

Les propriétés physicochimiques des dérivés de
15 bléomycines substituées sur l'azote du groupe amido, typiques
de la présente invention sont indiquées sur le Tableau 2.

Tableau 2

Composé N°	Abréviation	Maximum d'absorption UV de la forme exempte de Cu, mp (E l %/l cm)	CCM ^{#1} de la forme contenant du cuivre Rf	Electrophorèse ^{#2} de la forme contenant Cu, Rm (Rm d'alanine=1,0)
1	dH-MMA	291 (111)	0,62*	0,92
2	dH-MEA	291 (107)	0,75	0,83
3	dH-IPA	291 (105)	0,56*	0,85
4	dH-BA	291 (98)	0,70	0,75
5	dH-PEP	291 (102)	0,68	0,96
6	dH-EDA	291 (100)	0,45	1,04
7	dB2-IPA	291 (89)	0,53*	0,93
8	dB2-DHA	291 (94)	0,76	0,87
9	dB2-TFEA	291 (93)	0,50*	0,85
10	dB2-OCT	291 (85)	0,72	0,77
11	dB2-PEP	291 (79)	0,87	1,03
12	dB2-BPA	292 (79)	0,87	1,02
13	dB2-LAA	291 (82)	0,43	0,70
14	dB2-BA	291 (78)	0,39*	0,78
15	dB2-ADPM	291 (89)	0,82	0,76
16	dB2-DPE	291 (81)	0,77	0,76
17	dB2-NA	291 (85)	0,84	0,83
18	dB2-FFA	292 (115)	0,48*	0,82

TABLEAU 2 (Suite)

19	dB2-AMPY	292 (84)	0,47*	1,02
20	dB2-ATZ	292 (137)	0,86	0,78
21	dPEP-IPA	291 (94)	0,84	0,87
22	dPEP-PEP	291 (89)	0,77	0,98
23	dPEP-BA	291 (91)	0,78	0,87
24	dPEP-CBA	291 (81)	0,74	0,79
25	dPEP-STE	291 (68)	0,06	0,18
26	dPEP-LAA	291 (83)	0,33	0,75
27	dPEP-OCT	291 (83)	0,61	0,84
28	dPEP-MTA	285 (100)	0,75	0,81
29	dPEP-DAD	291 (94)	0,78	1,02
30	dPEP-DPE	291 (88)	0,65	0,87
31	dPEP-ADPM	291 (85)	0,69	0,87
32	dPEP-DHA	291 (91)	0,63	0,84
33	dPEP-APZ	291 (85)	0,78	1,26
34	dPEP-BPA	291 (82)	0,73	1,00
35	dPEP-ABP	291 (78)	0,72	1,10
36	dPEP-ADP	291 (75)	0,80	1,06
37	dBAPP-IPA	291 (91)	0,85	1,14
38	dBAPP-BAPP	291 (83)	0,26	1,44
39	dMCLBZ-PEP	289 (90)	0,53	1,16
40	dMCLBZ-OCT	290 (88)	0,50	1,08

TABLEAU 2 (Suite)

41	dMCLBZ-DPE	290 (78)	0,55	1,01
42	dMCLBZ-DHA	290 (80)	0,53	0,90
43	dMCLPE-PEP	290 (79)	0,53	1,04
44	dMCLPE-OCT	290 (85)	0,52	0,96
45	dMCLPE-MCLPE	290 (79)	0,25	1,20
46	dMCLPE-BPA	290 (83)	0,60	1,11
47	dMTBZ-PEP	290 (81)	0,38	1,06
48	dMTBZ-OCT	290 (73)	0,24	0,92
49	dMTBZ-MTBA	290 (69)	0,15	1,07
50	dMTBZ-BAPP	290 (71)	0,47	0,79
51	dMTBZ-BA	290 (81)	0,48	0,79
52	dMMDRZ-PEP	291 (75)	0,50	1,15
53	dMMDRZ-OCT	291 (76)	0,35	1,01
54	dMMDRZ-BPA	291 (79)	0,49	1,13
55	dEEDBZ-PEP	291 (76)	0,48	1,12
56	dEEDBZ-OCT	291 (78)	0,33	1,00
57	dEEDBZ-BPA	291 (73)	0,48	1,14
58	dMCO-BPA	291 (87)	0,54	1,08
59	dMCO-OCT	291 (83)	0,42	0,96
60	dMCO-PEP	291 (89)	0,53	1,06
61	dMCNBZ-BPA	290 (81)	0,70	1,10
62	dMCNBZ-OCT	292 (94)	0,59	0,95

TABLEAU 2 (Suite)

63	DMCNEZ-PEP	291 (93)	0,69	1,10
64	DMDDBZOBZ-PEP	285 (74)	0,09	0,93
65	DMDDBZOBZ-OCT	285 (76)	0,04	0,64

Remarques : *1 = "Silica Gel 60F 254 Silanised ^(R)" (Merck Co.) ; méthanol-acétate d'ammonium à 6 % (50:40 volume/volume), excepté pour les valeurs Rf marquées d'un astérisque qui sont mesurées dans un autre mélange (65:34 volume/volume).

*2 Avicel SF ^(R) (FMC Co.) ; acide formique-acide acétique-eau (27:75:900 volume/volume), 800 V, 15 minutes.

Les propriétés biologiques, comme déterminé sur les composés typiques de la présente invention, sont décrites ci-après.

1. Essai de résistance contre l'enzyme d'inactivation.

(1) Extraction de l'enzyme d'inactivation.

Le foie de rats mâles de souche Donryu est mélangé avec deux fois son poids d'une solution tampon au phosphate 1/15 M de pH 7 et broyé pour préparer une émulsion de tissu. L'émulsion résultante est centrifugée à 105 000 g (constante de gravité) pendant 60 minutes. La liqueur surnageante est dialysée et la fraction à grosses molécules résultante est utilisée comme extrait d'enzyme à effet d'inactivation.

(2) Détermination de la réaction d'inactivation.

On ajoute à 1 ml de l'extrait ci-dessus, 1 ml d'une solution de substrat contenant 800 µg d'un dérivé de bléomycine. On laisse le mélange réagir à 37° C pendant 40 minutes. Une portion (0,3 ml) du mélange réactionnel est séparée de la protéine et testée pour déterminer son activité résiduelle contre Mycobacterium smegmatis ATCC 607.

Dans les mêmes conditions, la bléomycine B₂, utilisée comme témoin, présente une diminution de 50 % d'activité. Les résultats des essais sont indiqués sur le Tableau III. Comme il ressort des résultats d'essai, comparativement aux bléomycines, les dérivés de bléomycine substitués sur l'azote du groupe amido de la présente invention sont généralement moins affectés par l'enzyme d'inactivation des bléomycines.

2. Activités antimicrobiennes contre Mycobacterium smegmatis ATCC 607 et Bacillus subtilis.

L'activité antimicrobienne est testée contre les microorganismes d'essai en cause par le procédé du cylindre à plaque de gélose. L'activité est enregistrée en supposant que l'activité d'un échantillon normalisé de bléomycine A₂ (forme exempte de cuivre) a un pouvoir de 1000 µm/mg/ Les résultats d'essai sont indiqués sur le Tableau 3.

3. Activité inhibitrice de croissance contre des cellules cultivées de HeLaS₃

Des cellules de HeLa S₃ sont inoculées dans un milieu (MEM avec 10 % de sérum de bovin) placé dans une boîte de Pétri en matière plastique. Deux jours plus tard, on ajoute une bléomycine à la boîte. Au bout de 3 jours de culture, on dénombre les cellules. Le pourcentage d'inhibition de croissance est calculé en utilisant l'équation suivante :

- 10 Pourcentage d'inhibition (%) = $100 \times (B-A)/(B-C)$
où A est le nombre final de cellules 3 jours après l'addition de l'échantillon d'essai, B est le nombre final de cellules du témoin sans addition de l'échantillon d'essai et C est le nombre de cellules au moment de l'addition de l'échantillon d'essai. La valeur DI 50 (concentration donnant 50 % d'inhibition) est estimée d'après le graphique obtenu en traçant la concentration de l'échantillon d'essai en fonction du pourcentage d'inhibition. Les résultats obtenus sont indiqués sur le Tableau 3.

Tableau 3

Composé N°	Abréviation	Pouvoir antimicrobien du composé exempt de Cu (pouvoir en µg/mg)		Concentration donnant 50 % d'inhibition de croissance du composé exempt de Cu contre des cellules cultivées de HeLa S ₃ (DI ₅₀) µg/ml	Résistance du composé exempt de Cu à l'enzyme d'inactiva- tion *1
		Contre <i>Mycobacterium</i> <i>smegmatis</i> ATCC 607	Contre <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i>		
1	dH-MMA	1447	654	1,2	++++
2	dH-MEA	1895	767	0,98	+++
3	dH-IPA	2778	593	0,95	+++++
4	dH-BA	6595	579	1,10	+
5	dH-PEP	9846	3772	1,0	++++
6	dH-EDA	2396	4453	1,0	++++
7	dB2-IPA	6425	1950	0,56	++++
8	dB2-DHA	24880	950	0,62	+++
9	dB2-TFEA	3990	730	1,03	++
10	dB2-OCT	33700	1500	0,34	+
11	dB2-PEP	15729	7036	0,71	+++++
12	dB2-BPA	16438	4384	0,98	+++++
13	dB2-LAA	7650	660	0,39	++++
14	dB2-BA	28140	1650	0,73	+
15	dB2-ADPM	42320	980	0,39	+++++

TABLEAU 3 (Suite)

16	dB2-DPE	24480	520	0,67	++++
17	dB2-NA	33650	1295	1,1	±
18	dB2-FFA	19150	1285	0,58	±
19	dB2-AMPY	5160	1010	0,83	++
20	dB2-ATZ	4870	900	0,73	++
21	dPEP-IPA	11998	962	0,17	++++
22	dPEP-PEP	28030	2800	0,80	+++++
23	dPEP-BA	38348	1380	0,26	+
24	dPEP-CBA	56328	1184	0,28	+
25	dPEP-STE	210	0	4	*
26	dPEP-LAA	3920	384	0,40	++++
27	dPEP-OCT	45100	886	0,36	++
28	dPEP-MTA	18650	586	0,60	++++
29	dPEP-DAD	14200	5400	0,43	++++
30	dPEP-DPE	33802	190	1,02	++++
31	dPEP-ADPM	54645	430	0,56	+++++
32	dPEP-DHA	39956	298	0,83	++
33	dPEP-APZ	6359	5009	1,50	++++
34	dPEP-BPA	26023	2843	0,95	++++
35	dPEP-ABP	18537	2159	0,90	++++
36	dPEP-ADP	6061	3694	2,70	++++
37	dBAPP-IPA	13210	20048	0,90	++++

TABLEAU 3 (Suite)

38	dBAPP-BAPP	5100	6600	0,79	+++
39	dMCLBZ-PEP	14880	2590	0,53	+++++
40	dMCLBZ-OCT	38200	1808	0,43	+++
41	dMCLBZ-DPE	23342	521	0,86	+++++
42	dMCLBZ-DHA	31834	933	0,49	++++
43	dMCLPE-PEP	15593	4267	0,37	+++++
44	dMCLPE-OCT	38750	1898	0,23	++
45	dMCLPE-MCLPE	650	270	0,30	+++++
46	dMCLPE-BPA	31690	3690	0,40	+++++
47	dMTBZ-PEP	5900	180	2,15	+++++
48	dMTBZ-OCT	2580	130	1,75	*
49	dMTBZ-MTBZ	230	1	11,0	*
50	dMTBZ-BAPP	1417	376	2,2	++++
51	dMTBZ-BA	24461	410	0,77	+++
52	dMMDBZ-PEP	21371	2372	0,55	+++++
53	dMMDBZ-OCT	40703	595	0,23	*
54	dMMDBZ-BPA	32633	2663	0,80	++++
55	dEEDBZ-PEP	20840	2150	1,00	+++++
56	dEEDBZ-OCT	41380	520	0,60	*
57	dEEDBZ-BPA	25924	1831	1,5	++++
58	dMCO-BPA	62418	5518	0,40	++++

TABLEAU 3 (Suite)

59	dMCO-OCT	65733	5473	0,23	+++
60	dMCO-PEP	54345	7273	0,33	+++++
61	dMCNBZ-BPA	14730	4755	1,10	+++
62	dMCNBZ-OCT	49270	381	0,28	+++
63	dMCNBZ-PEP	21877	11056	0,60	++++
64	dMDDDBZOBZ-PEP	115	23	0,058	*
65	dMDDDBZOBZ-OCT	153	13	0,30	*

Remarques : *1 La résistance est évaluée d'après le degré d'inactivation dans les conditions dans lesquelles le degré d'inactivation de la bléomycine B₂ est de 50 %.

Estimation	Degré d'inactivation 45 % ou plus
+	35 à 44 %
++	25 à 34 %
+++	15 à 24 %
++++	5 à 14 %
+++++	moins de 5 %
*	Indéterminable en raison de l'adsorption sur la protéine enzymatique

4. Toxicité pulmonaire (fibrose pulmonaire) chez la souris.

Des souris de souche ICR (mâles, âgées de 15 semaines) en groupes de 9 membres sont utilisées. Chaque préparation d'essai est administrée par injection intrapéritonéale une fois par jour pendant 10 jours consécutifs à une dose de 5 mg/kg. A la fin de l'administration, les souris sont maintenues pendant 5 semaines sous observation, puis sacrifiées et autopsiées pour examiner l'apparition et le degré de la fibrose pulmonaire. L'évaluation est réalisée en comparant le nombre de souris ayant reçu l'administration et souffrant de fibrose pulmonaire et le degré de la maladie. Les résultats sont indiqués sur le Tableau 4. Le degré est donné par l'échelle de cotation suivante :

Nombre de points :

- | | |
|----|---|
| 15 | 0 : pas de fibrose |
| | 1 : accumulation d'exsudat dans l'alvéole et modification analogue à la fibrose dans la paroi alvéolaire. |
| | 2 : fibrose dans plusieurs régions. |
| 20 | 4 : fibrose diffuse. |
| | 6 : fibrose dans plus des deux tiers de la zone totale. |

Le "rapport" du Tableau 4 est calculé par comparaison avec le "Complexe de bléomycine".

incidence

Composé N°	Abréviation	Incidence		Degré		Rapport
		Nombre de souris atteintes de fibrose pulmonaire (%)		Cotation totale de fibrose pulmonaire/nombre total d'échantillons (%)		
21	dPEP-IPA	3/8	(38)	5/24	(21)	0,27
22	dPEP-PEP	1/8	(13)	1/21	(4)	0,05
33	dPEP-APZ	5/9	(56)	11/27	(41)	0,44
34	dPEP-BPA	0/8	(0)	0/24	(0)	0
37	dBAPP-IPA	3/9	(33)	13/27	(48)	0,46
38	dBAPP-BAPP	5/7	(71)	7/21	(33)	0,32
39	dMCLBZ-PEP	2/9	(20)	2/27	(7)	0,07
43	dMCLPE-PEP	0/1	(0)	0/3	(0)	0
45	dMCLPE-MCLPE	0/9	(0)	0/27	(0)	0
47	dMTBZ-PEP	0/8	(0)	0/24	(0)	0
48	dMTBZ-OCT	0/8	(0)	0/24	(0)	0
49	dMTBZ-MTBZ	0/3	(0)	0/9	(0)	0
51	dMTBZ-BA	0/8	(0)	0/24	(0)	0
52	dMMDBZ-PEP	0/9	(0)	0/27	(0)	0
53	dMMDBZ-OCT	0/9	(10)	0/27	(0)	0

TABLEAU 4 (Suite)

54	dMMDBZ-BPA	0/9	(0)	0/27	(0)	0
55	dEEDBZ-PEP	0/9	(0)	0/27	(0)	0
56	dEEDBZ-OCT	0/9	(0)	0/27	(0)	0
57	dEEDBZ-BPA	0/9	(0)	0/27	(0)	0
58	dMCO-BPA	0/9	(0)	0/27	(0)	0
59	dMCO-OCT	0/9	(0)	0/27	(0)	0
60	dMCO-PEP	0/9	(0)	0/27	(0)	0
62	dMCNBZ-OCT	0/9	(0)	0/27	(0)	0
64	dMDDDBZOBZ-PEP	0/9	(0)	0/27	(0)	0
65	dMDDDBZOBZ-OCT	0/9	(0)	0/27	(0)	0

5. DL₅₀ chez la souris, comme déterminée par administration pendant 10 jours consécutifs.

Des souris mâles de souche CDF₁/SLC (âgées de 6 semaines, 7 membres par groupe) reçoivent une injection sous-cutanée de doses variables de dérivés de bléomycine une fois par jour pendant 10 jours consécutifs. A partir de la mortalité pendant la période d'administration, on détermine la DL₅₀ (dose journalière) par le procédé Behrens-Kärber. Les résultats sont indiqués sur le Tableau 5.

TABLEAU 5

Composé n°	Abréviation	DL ₅₀ pendant la période d'administration de 10 jours consécutifs (mg/kg/jour)
52	dMMDBZ-PEP	13,9
53	dMMDBZ-OCT	15,0
64	dMDDDBZOBZ-PEP	> 81,4
65	dMDDDBZOBZ-OCT	> 75,7

Comme il ressort de la description ci-dessus, les composés de la présente invention résistent à une enzyme d'inactivation de la bléomycine, ont une grande activité d'inhibition de croissance contre des cellules cultivées de HeLa S₃ ainsi qu'une nette activité antimicrobienne, et ils ont une très faible toxicité pulmonaire, ce qui suggère clairement leur utilité en clinique.

Lorsqu'on les utilise comme médicament, les composés de la présente invention sont mélangés avec un excipient de la manière habituelle et préparés sous la forme d'injections, comprimés, onguents, suppositoires, etc... Des excipients appropriés comprennent l'eau, des sucres tels que le mannitol, et d'autres matières généralement utilisées dans les préparations pharmaceutiques.

Bien que la dose varie selon la forme d'administration, une dose unique de 2 à 10 mg par personne est administrée une à quatre fois par semaine, la dose cumulative étant de 2 à 200 mg/personne/semaine.

L'invention est illustrée en détail en se référant aux exemples non limitatifs suivants.

Exemple 1

Stade A

5 On homogénéise du foie de bovin frais, pesant 200 g, dans 400 ml d'une solution tampon au phosphate 0,05 M de pH 7,2 et on le centrifuge à 8000 tr/min pendant 30 minutes. La liqueur surnageante est dialysée contre un tampon au phosphate 0,05 M pour préparer une solution d'enzyme brute. On ajoute à 10 g de bléomycine B₂ 400 ml de la solution d'enzyme brute. On laisse le mélange réagir à 37° C pendant 24 heures. On ajoute au mélange réactionnel 40 ml d'une solution à 55 % d'acide trichloroacétique (abrégé par TCA) pour précipiter la protéine. On sépare le précipité par centrifugation et on le lave trois fois avec une solution à 5 % de TCA. La liqueur surnageante et les li-
10 queurs de lavage sont réunies, neutralisées avec une solution d'hydroxyde de sodium 4M, et mélangées avec 3,2 g (2,4 équivalents de bléomycine) d'acétate de cuivre pour former un chélate de cuivre du produit désiré. A des fins d'élimination de sels, on fait passer la solution de chélate de cuivre à travers une colonne, d'un volume de 1 litre, garnie d'une résine adsorbante Diaion[®] HP 40 (Mitsubishi Chemical Co.) dans l'eau distillée, pour effec-
15 tuer l'adsorption du produit désiré. Après avoir séparé les sels par lavage avec 1,5 litre d'eau distillée, la phase adsorbée est éluée avec un mélange d'acide chlorhydrique aqueux 1/50 N et de méthanol (1:4 volume/volume) pour recueillir les fractions qui présentent un maximum d'absorption à une longueur d'onde d'environ 290 µm. La fraction combinée est neutralisée avec Dowex[®] 44 (type OH, Dow Chemical Co.) et concentrée sous pression réduite. On fait passer le concentré à travers une colonne de 1 litre de volume, garnie de CM-Sephadex[®] C-25 (type Na⁺, Pharmacia Fine Chemicals Co.) qui a été équilibrée avec
20 une solution tampon 1/20 M d'acide acétique et d'acétate de sodium de pH 4,5 pour effectuer l'adsorption. La
25
30
35

phase adsorbée est éluée par la méthode du gradient linéaire de concentration dans laquelle du chlorure de sodium est ajouté en continu à la solution tampon ci-dessus pour augmenter graduellement la concentration de sodium jusqu'à 1,0 M. Les fractions bleues éluées à une concentration de sodium d'environ 0,3 M sont recueillies, puis dessalées en utilisant Diaion^R HP 40 comme décrit ci-dessus, et lyophilisées en donnant 8,5 g (rendement 83 %) d'une poudre amorphe bleue de déamido-bléomycine B₂ contenant du cuivre.

La poudre bleue présente des maxima d'absorption (E 1%/1 cm) à 242 mμ (138) et 291 mμ (115), comme déterminé dans l'eau distillée. Les maxima d'absorption dans l'infrarouge (en nombre d'onde, cm⁻¹), comme déterminé dans une pastille de KBr, sont de 3425, 2975, 2940, 1720, 1640, 1575, 1460, 1420, 1400, 1375, 1280, 1260, 1240, 1190, 1140, 1100, 1060, 1020, 760. D'autres propriétés physicochimiques sont indiquées sur le Tableau 6.

D'une manière analogue à celle décrite ci-dessus, en utilisant la bléomycine A₂, -C, la 3-((S)-1'-phényléthyl) aminopropylaminobléomycine, et la 3-(3-n-butylaminopropylamino)-propylaminobléomycine, on obtient respectivement la déamidobléomycine A₂, -C, la 3-((S)-1'-phényléthylamino) propylamino-déamidobléomycine et la 3-(3-n-butylaminopropylamino) propylaminodéamidobléomycine. Les propriétés physicochimiques de ces composés sont celles indiquées sur le Tableau 6.

Tableau 6

Déamidobléomycine synthétisée	Maximum d'absorption UV de la forme contenant du cuivre mp (E 1 %/1 cm)	CCM #1 de la forme contenant du cuivre Rf	Electrophorèse de la forme contenant du cuivre, Rm (Rm d'alanine=1,0)
Déamidobléomycine B ₂	242 (138) 292 (115)	0,95 0,64*	0,72
Déamidobléomycine A ₂ '-C	242 (132) 292 (110)	0,75 0,46*	0,62
3-((S)-1'-phényléthylamino)propyl-déamidobléomycine	242 (147) 292 (124)	0,87 0,40*	0,67
3-(3-n-butylaminopropylamino)propylamino-déamidobléomycine	242 (142) 292 (118)	0,83 0,55*	1,01

Remarques : +1 "Silica Gel 60F 254 Silanised (R) (Merck Co.) ; mesuré dans un mélange de solution de méthanol-acétate d'ammonium à 6 % (60:40 volume/volume) excepté pour les valeurs de Rf munies d'un astérisque qui sont mesurées dans un autre mélange (65:34 volume/volume)

+2 Avicel SF (R) (FMC Co.) ; acide formique-acide acétique-eau (27:75:900 volume/volume) ; 800 V, 15 minutes.

Stade B

A une solution de 1 g de déamidobléomycine B₂ contenant du cuivre obtenue au stade A et de 1,77 g de 1-hydroxybenzotriazole (abrégé par HOBT) dans 10 ml de diméthylformamide, maintenue à 0°C et sous agitation on ajoute 1,35 g (10 équivalents de bléomycine) de dicyclohexylcarbodiimide (abrégé par DCC). Cinq minutes plus tard, on ajoute au mélange 840 mg (5 équivalents de bléomycine) de chlorhydrate de 3-(S)-1-phényléthylamino) propylamine et 0,72 ml de N-méthylmorpholine. On laisse le mélange résultant réagir sous agitation à la température ambiante pendant 16 heures. On ajoute au mélange réactionnel 10 fois son volume d'acétone pour précipiter le produit désiré. Après lavage minutieux à l'acétone le précipité est dissous dans l'eau distillée et on lui fait traverser une

15 colonne de 100 ml de volume, garnie de CM-Sephadex[®] C-25 (type Na⁺, Pharmacia Fine Chemicals C°), qui a été équilibrée avec une solution tampon 1/20M d'acide acétique et d'acétate de sodium de pH 4,5 pour effectuer l'adsorption. La phase adsorbée est éluée par la méthode du gradient linéaire de concentration dans laquelle du chlorure de sodium est ajouté en continu

20 à la solution tampon ci-dessus pour augmenter graduellement la concentration en sodium jusqu'à 1,0 M. Les fractions bleues éluées à une concentration de sodium d'environ 0,6 M sont recueillies. La fraction combinée est dessalée en utilisant 100 ml

25 de Diaion[®] HP-40 comme décrit ci-dessus, et lyophilisée en donnant 880 mg (rendement de 76%) d'une poudre amorphe bleue d'amido (N- 3-((S)-1-phényléthylamino)-propyl -bléomycine B₂ contenant du cuivre. Elle présente des maxima d'absorption (E 1% 1 cm) à 243 mμ (125) et 292 mμ (96), tels que mesurés

30 dans l'eau distillée. L'absorption des rayons infrarouges (en nombre d'onde, cm⁻¹) mesurée dans une pastille de KBr, sont de 3425, 2975, 2930, 1720, 1640, 1580, 1575, 1550, 1455, 1430, 1400, 1370, 1290, 1240, 1190, 1130, 1095, 1060, 1005, 980, 875, 760. D'autres propriétés physicochimiques sont indiquées sur le Tableau 2.

35 D'une manière analogue à celle décrite ci-dessus, on effectue la synthèse de formes contenant du cuivre des

bléomycines B₂ substituées sur l'azote du groupe amido n° 7 à 20 indiquées sur le Tableau 2 par réaction de déamidobléomycines B₂ contenant du cuivre avec des amines correspondant aux produits désirés.

- 5 De même, on effectue la synthèse des composés n° 1, 6, 21-38 et 65 indiqués sur le Tableau 2 par réaction de déamidobléomycine A₂'-C, de 3-((S)-1-phényléthyl) aminopropylamino-déamidobléomycine et de 3-(4-n-butylaminopropylamino) propylamino-déamidobléomycine (chaque déamidobléomycine sous
10 la forme contenant du cuivre) avec les amines correspondant aux produits désirés.

Stade C-

- Dans 20 ml d'eau distillée, on dissout 380 mg du composé contenant du cuivre obtenu au stade B.A des fins
15 d'élimination de sels on fait passer la solution à travers une colonne, de 100 ml de volume, garnie de Amberlite^R XAD-2 dans l'eau distillée, pour effectuer l'adsorption du composé contenant du cuivre. La résine est lavée successivement avec 300 ml d'une solution aqueuse contenant du chlorure de sodium
20 et 5% de EDTA.2Na, 100 ml de solution aqueuse à 2% de chlorure de sodium, et 250 ml d'eau distillée. La résine est ensuite éluée avec un mélange acide chlorhydrique 1/50 N-méthanol (1:4 volume/volume) pour recueillir les fractions qui présentent un maximum d'absorption à une longueur d'onde d'environ 290 mμ. La frac-
25 tion combinée est ajustée à pH 6,0 avec Dowex 44 (type OH, Dow Chemical C°), puis concentrée sous pression réduite et lyophilisée en donnant 790 mg (rendement de 93%) d'une poudre amorphe blanche de chlorhydrate de (amido)N- 3-((S)-1'-phényl-éthylamino)propyl -bléomycine B₂ exempte de cuivre. Le maxi-
30 mum d'absorption des ultraviolets (E 1% 1 cm) sont de 291 mμ et (79) respectivement. Les maxima d'absorption des infrarouges (en nombre d'onde cm⁻¹), mesurés dans une pastille de KBr, sont de 3425, 2950, 1720, 1640, 1555, 1450, 1400, 1360, 1320, 1260, 1190, 1060, 880, 910, 805, 770 et 700. D'autres propriétés physicochimiques
35 sont indiquées sur le Tableau 2.

Exemple 2 -Etape A -

Un mycélium de champignon, pesant 400 g, obtenu par culture de Fusarium roseum IFO 7189 déposé à " Institute for Fermentation " , Osaka, est homogénéisé dans 4 litres d'eau d'une solution 1/20 M de phosphate de pH 7,5. On ajoute au mélange homogénéisé une solution de 10 g de (amido)N-3-((S)-1'-phényléthylamino)propyl -bléomycine B₂ contenant du cuivre dans 1 litre de la même solution de tampon au phosphate que celle utilisée ci-dessus. On laisse réagir le mélange à 37°C pendant 20 heures. On le mélange avec un adjuvant de filtration et on le filtre avec aspiration. On lave le résidu avec la même solution tampon que ci-dessus. On combine le filtrat et les liqueurs de lavage et on les fait traverser une colonne garnie de 1 litre d'une résine adsorbante Amberlite[®] XAD-2 dans l'eau distillée, pour effectuer l'adsorption du produit désiré. Après avoir éliminé par lavage les sels avec 2 litres d'eau distillée, la phase adsorbée est éluée avec du méthanol en solution aqueuse à 50% pour recueillir 5 litres de fractions vert bleuâtre ou bleues. La fraction combinée est concentrée sous pression réduite, puis dissoute dans 350 ml de méthanol à 80%, et amenée à traverser une colonne garnie de 70 ml d'alumine dans du méthanol à 80%. On lave la colonne avec 100 ml de méthanol à 80% et on la développe avec du méthanol à 40% pour recueillir 350 ml de fractions d'éluat bleues. La fraction combinée est concentrée sous pression réduite, puis dissoute dans l'eau distillée, et on lui fait traverser une colonne, de 600 ml de volume, garnie de CM-Sephadex[®] C-25 (type Na⁺, Pharmacia Fine Chemicals C°) qui a été équilibrée avec une solution tampon 1/20 % d'acide acétique et d'acétate de sodium de pH 4,5 pour effectuer l'adsorption du produit désiré. La phase adsorbée est éluée, par la méthode du gradient linéaire de concentration dans laquelle du chlorure de sodium est ajouté en continu à la solution tampon ci-dessus pour augmenter graduellement la concentration de sodium jusqu'à 1,0 M. Les fractions bleues éluées à une concentration de

sodium d'environ 0,2 M sont recueillies, puis dessalées en utilisant Diaion^R HP 40, et lyophilisées en donnant 7,1 g (rendement de 79%) d'une poudre amorphe bleue d'acide (amido)N- 3-((S)-1'-phényléthylamino)propyl -bléomycinique contenant du cuivre. Les maxima d'absorption des ultraviolets et (E 1% 1 cm) mesurés dans l'eau distillée sont de 245 mμ (121) et 293 mμ (119), respectivement. Les maxima d'absorption des infrarouges (en nombre d'onde cm⁻¹) mesurés dans une pastille de KBr sont de 3450, 2975, 2940, 1720, 1645, 1580, 1555, 1460, 1370, 1300, 1190, 1140, 1095, 1060, 1005, 980, 880, 765 et 700. D'autres propriétés physicochimiques sont indiquées sur le Tableau 7.

D'une manière analogue à celle décrite ci-dessus, on obtient l'acide (amido)N-octyl-bléomycinique et l'acide (amido)N-3-dibutylaminopropyl-bléomycinique à partir de (amido)N-n-octylbléomycine B₂ et de (amido)N-(3-dibutylaminopropyl)bléomycine B₂ respectivement. Les propriétés physicochimiques de ces acides sont comme indiqué sur le Tableau 7.

TABLEAU 7

Acide bléomycinique synthétisée substituée sur l'azote du groupe amido	Maximum d'absorption des UV de la forme contenant Cu μ (E 1%/1 cm)	CCM ^{*1} de la forme conte- nant Cu, Rf	Electrophorèse de la forme conte- nant Cu, Rm (Rm d'alanine=1,0)
Acide (Amido)N-[3-(S)-1'-phényl- éthylamino)-propyl]bléomycinique	245 (121) 293 (119)	0,93 0,62*	0,84
Acide (Amido)N-3-dibutylamino- propyl)bléomycinique	247 (123) 294 (123)	0,93 0,62*	0,88
Acide (Amido)N-(octyl)bléomycinique	245 (130) 293 (128)	0,79 0,20*	0,59

Remarques : ^{*1} "Silica Gel 60F 254 Silanised ^R (Merck Co.) ; mesuré dans un mélange de solution de méthanol-acétate d'ammonium à 6 % (60:40 volume/volume) excepté pour les valeurs de Rf munies d'un astérisque qui sont mesurées dans un autre mélange (65:34 volume/volume)

^{*2} Avicel SF ^R (FMC Co.) ; acide formique-acide acétique-eau (27:75:900 volume /volume) ; 800 V, 15 minutes.

Stade B -

- Dans 10 ml de DMF, on dissout 1,0 g d'acide (amido)N- 3-((S)-1'-phényléthylamino)propyl -bléomycinique contenant Cu préparé au stade A et 1,71 g de HOBT. D'une manière analogue à celle du stade de l'Exemple 1, en utilisant 1,31 g de DCC, on laisse la solution ci-dessus réagir avec 340 ml de 3- N-(3'-cyclooctylméthylamino)propyl-N-méthylamino propylamine pendant 3 heures pour former un produit de condensation. Comme dans l'Exemple 1, on traite le mélange réactionnel avec de l'acétone, puis on le purifie par chromatographie sur CM-Sephadex[®], et on lui fait traverser une colonne de 100 ml de Amberlite^RXAD-2 pour effectuer l'adsorption. La phase adsorbée est éluée par la méthode du gradient linéaire de concentration dans laquelle 500 ml de méthanol sont ajoutés en continu à 500 ml d'une solution d'acétate tampon de pH 4,5 pour augmenter linéairement la concentration en méthanol. Le produit désiré est élué à une concentration en méthanol de 40 à 50%. L'éluat est dessalé en utilisant une colonne (100ml) de Diaion[®] HP 40, comme décrit ci-dessus, et lyophilisé en donnant 980 mg (rendement de 83%) d'une poudre amorphe bleue de 3- N-3'-(cyclooctylamino)propyl-N-méthylamino propylamino-(amido)-N- 3-((S)-1'-phényléthylamino)propyl -bléomycine (forme contenant du cuivre).

Dans 22 ml d'eau distillée, on dissout 980 mg de 3- N-(3'-cyclooctylméthylamino)propyl-N-méthylamino propyl-amino (amido)N- 3-((S)-1'-phényléthyl)aminopropyl -bléomycine contenant du cuivre préparée au stade B. La solution est soumise au traitement d'élimination du cuivre, comme dans l'Exemple 1, en utilisant Amberlite[®] XAD-2 et une solution aqueuse à 5% de EDTA.2Na. L'effluent de la colonne est lyophilisé en donnant 870 mg (rendement de 92%) d'une poudre amorphe incolore de chlorhydrate de 3- N-(3'-cyclooctylméthylamino)propyl-N-méthylamino propylamino (amido)N- 3-(S)-1'-phényl-amino)propyl -bléomycine exempte de cuivre. Le maximum d'absorption des ultraviolets et la valeur (E 1% 1 cm) comme mesuré dans l'eau distillée sont de 291 mμ et (89), respectivement. Les maxima d'absorption des infrarouges (en nombre d'onde, cm⁻¹ mesurés dans une pastille de KBr, sont de 3400, 2925, 1720, 1650, 1550, 1520, 1480, 1460, 1450, 1405, 1385, 1360, 1320, 1255, 1190, 1130, 1100, 1055, 1020, 980, 960, 880, 805, 760, 725 et 695. D'autres propriétés physicochimiques sont comme indiquées sur le Tableau 2.

D'une manière analogue à celle décrite ci-dessus, on obtient les formes exemptes de cuivre des composés n°20 à n° 63 indiqués sur le Tableau 2 à partir des matières de départ correspondantes.

Exemple 3 -

Stade A -

D'une manière analogue à celle décrite dans l'exemple 2, on mélange 1,5 g de la déamidobléomycine B₂ contenant du cuivre préparée dans l'exemple 1 avec un mélange homogénéisé de 60 g de culture de mycélium de Fusarium roseum et de 750 ml d'une solution tampon de 1/20 M de

phosphate de pH 7,5. On laisse le mélange réagir à 37°C pendant 21 heures. On traite le mélange réactionnel comme dans l'exemple 2 et on lui fait traverser une colonne (500 ml de volume) de Amberlite XAD[®]-2 pour effectuer l'adsorption de la substance désirée. On lave la colonne avec 750 ml d'eau distillée, et on l'élue avec un mélange d'eau et de méthanol (4:1) pour recueillir des fractions vertes (750 ml au total) qui sont concentrées sous pression réduite. On fait passer le concentré à travers une colonne, de 60 ml de volume, garnie de CM-Sephadex[®] C-25 (type Na⁺, Pharmacia Fine Chemicals Co.) qui a été équilibrée avec une solution tampon 1/20 M d'acide acétique et d'acétate de sodium de pH 4,5. On lave la colonne à l'eau distillée et on recueille les fractions bleues d'effluent (80 ml au total). Après avoir répété la chromatographie sur CM-Sephadex[®], on concentre la fraction bleue purifiée, et on lui fait traverser une colonne, de 1 litre de volume, garnie de Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals Co.) dans un mélange eau-méthanol (1:4). La colonne est développée avec un mélange eau-méthanol (1:4) pour recueillir des fractions bleues. La fraction bleue combinée est concentrée sous pression réduite et lyophilisée en donnant 890 mg (rendement 87 %) d'une poudre amorphe bleue d'acide déamidobléomycinique contenant du cuivre. Le maximum d'absorption des ultraviolets et la valeur (E 1%/1 cm), comme mesuré dans l'eau distillée, sont de 254 mμ (143) et 292 mμ (144) respectivement. Les maxima d'absorption des infrarouges (nombre d'onde, cm⁻¹) mesurés dans une pastille de KBr sont de 3450, 2975, 2940, 1720, 1640, 1560, 1465, 1420, 1380, 1280, 1190, 1140, 1100, 1060, 1020, 990, 880, 810 et 775. Dans les conditions indiquées sur le Tableau 7, la valeur R_f dans la chromatographie en couche mince est de 0,91 et la valeur R_m dans l'électrophorèse est de 0,49.

Stade B.

Dans 5 ml de diméthylformamide, on dissout

500 mg du composé contenant du cuivre obtenu au stade A et 2010 mg de HOBT. La solution résultante et de la 3-((S)-1'-phényléthylamino)-propylamine sont soumises à une condensation pendant 21 heures, comme dans l'exemple 1, en utilisant 770 mg de DCC. Comme dans l'exemple 2, le mélange réactionnel est traité à l'acétone, purifié par chromatographie sur CM-Sephadex[®] et chromatographie sur Amberlite[®] XAD-2, dessalé en utilisant Diaion[®] HP-40 et lyophilisé en donnant 280 mg (rendement 42%) d'une poudre amorphe bleue de 3-((S)-1'-phényléthylamino)propylamino-(amido)N- $\sqrt[3]{3}$ -((S)-1'-phényléthylamino)propyl-bléomycine contenant du cuivre.

D'une manière analogue à celle décrite ci-dessus, on obtient la 3-(3-n-butylaminopropylamino)propylamino-(amido)N- $\sqrt[3]{3}$ -(3-n-butylaminopropylamino)propyl-bléomycine et la 3-N-3- $\sqrt[2]{2}$ -(p-chlorophényl)éthylamino/propyl-N-méthylamino-propylamino-(amido)N- $\sqrt[3]{3}$ -(2-(p-chlorophényl)éthylamino)-propyl-N-méthylaminopropyl-bléomycine en utilisant respectivement la 3-(3-n-butylaminopropylamino)propylamine et le N- $\sqrt{N}$ -(3-aminopropyl)-N-méthylaminopropyl-N- $\sqrt[2]{2}$ -(p-chlorophényl)éthylamine.

Dans 8 ml d'eau distillée, on dissout 280 mg de la 3-((S)-1'-phényléthylamino)-propylamino-(amido)N- $\sqrt[3]{3}$ -((S)-1'-phényléthyl)aminopropyl-bléomycine contenant du cuivre obtenue au stade B. La solution est soumise au traitement d'élimination du cuivre comme dans l'exemple 1 en utilisant Amberlite[®] XAD-2 et une solution aqueuse à 5 % de EDTA.2Na. L'effluent de la colonne est lyophilisé en donnant 250 mg (rendement de 92 %) d'une poudre amorphe blanche de 3-((S)-1'-phényléthylamino)phénylamino-(amido)N- $\sqrt[3]{3}$ -((S)-1'-phényléthylamino)propyl-bléomycine exempte de cuivre. Les maxima d'absorption des infrarouges (en nombre d'onde, cm⁻¹), mesurés dans un comprimé de KBr, sont de 3370, 2975, 2940, 1715, 1660, 1565, 1500, 1455, 1385, 1320, 1255, 1190, 1140, 1100, 1060, 1020, 970, 920,

880, 805, 760, 730 et 695. D'autres propriétés physicochimiques sont comme indiqué sur le Tableau 2.

D'une manière analogue à celle décrite ci-dessus, d'autres composés énumérés au stade B sont
5 chacun transformés en la forme exempte de cuivre. Les propriétés physicochimiques de ces composés sont comme indiqué sur le Tableau 2.

Exemple 4.

Une solution de 10,22 g de 3-aminopropyl-
10 diméthylamine dans 100 ml de méthanol est neutralisée avec 12 ml d'acide acétique cristallisable et mélangée avec 100 g de benzaldéhyde. On ajoute au mélange sous agitation, par portions, 8,38 g de cyanoborohydrure de sodium. On laisse le mélange réagir à la température am-
15 biente pendant 16 heures. On ajuste le pH du mélange réactionnel à 1 avec de l'acide chlorhydrique concentré, et on le débarrasse du méthanol par distillation sous pression réduite. Le résidu est traité avec 200 ml d'eau et 200 ml de chloroforme. La phase aqueuse est séparée
20 et extraite avec 200 ml de chloroforme pour éliminer le benzaldéhyde. La phase aqueuse est ajustée à pH 12 avec de l'hydroxyde de sodium et extraite deux fois avec 200 ml de chloroforme. L'extrait chloroformique est séché sur sulfate de sodium et débarrassé du solvant par dis-
25 tillation sous pression réduite en donnant 26 g (rendement 92 %) de [3-(N,N-diméthylamino)propyl]-dibenzylamine.

L'amine obtenue ci-dessus est dissoute dans 100 ml d'acétonitrile. On ajoute goutte à goutte à la solution sous agitation une solution de 22,25 g de N-
30 (3-bromopropyl) phtalimide dans 100 ml d'acétonitrile. On agite le mélange à la température ambiante pendant 18 heures jusqu'à ce que l'halogénure ait disparu, comme mis en évidence par chromatographie sur couche mince. Le mélange réactionnel est débarrassé de l'acétonitrile
35 par distillation sous pression réduite. Le résidu est dissous dans 200 ml d'acide chlorhydrique 6 N et hydrolysé

par chauffage à 110°C pendant 8 heures. La solution d'hydrolysate est refroidie, débarrassée de l'acide phtalique précipité par filtration, évaporée à sec, dissoute dans l'eau distillée, et amenée à traverser une colonne de résine échangeuse d'ions Dowex[®]-1 (type Cl, 279 ml de volume). L'effluent est évaporé à sec sous pression réduite en donnant 43,7 g de trichlorhydrate de N-{3- $\overline{N}$ -(3-aminopropyl)-N,N-diméthylamino}propyl}dibenzylamine. Le spectre de résonance magnétique des protons de ce composé, comme déterminé dans l'eau lourde, présente les signaux suivants : (ppm) = 2,0 - 2,7, 4H (m) ; 2,9 - 3,8, 8H (m) ; 3,3, 6H (s) ; 4,6, 4H (m) ; 7,7, 10 H (s) (où m et s indiqués entre parenthèses représentent respectivement "multiplet" et "singulet"). Ces signaux indiquent la structure chimique telle que donnée ci-dessus. D'autres propriétés physicochimiques sont indiquées sur le Tableau 8.

D'une manière analogue à celle décrite ci-dessus, on obtient le trichlorhydrate de N-{3- $\overline{N}$ -(3-aminopropyl)-N, N-diéthylamino}propyl}dibenzylamine à partir de la 3-aminopropyldiéthylamine utilisée comme matière de départ. Les propriétés physicochimiques sont comme indiquées sur le tableau 8.

Exemple 5.

Dans 180 ml d'eau, on dissout 150 g de bis (3-aminopropyl)-méthylamine, puis 53 g de triéthylamine. On ajoute par portions à la solution, tout en la refroidissant à la glace et en l'agitant, une solution de 83 g (1/3 équivalent) de 4,6-diméthyl-2-tertiobutoxycarbonylthiopyrimidine dans 200 ml de dioxanne. On laisse le mélange réagir à la température ambiante pendant 5 heures. On débarrasse le mélange réactionnel du dioxanne et de la triéthylamine par distillation sous pression réduite. On ajuste le pH du résidu à 2 avec de l'acide chlorhydrique 6 N et on le lave au chloroforme. On ajuste le pH de la phase aqueuse à 13,5 avec de l'hydroxyde de sodium et on l'extrait au chloroforme. On sèche la phase chloroformi-

que sur du sulfate de sodium et on la débarrasse du solvant par distillation sous pression réduite pour obtenir 60 g (rendement 24%) de (3-tertio-butoxy-carbonylaminopropyl)-(3-aminopropyl)méthylamine (BOC-APMP).

5 Dans 130 ml de méthanol, on dissout le BOC-APMP obtenu ci-dessus. On ajoute à la solution, tout en la refroidissant à la glace et en l'agitant, 69 g (2 équivalents) de cyclooctanecarboxyaldéhyde et
10 une solution de 10 g de cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) dans 20 ml de méthanol. On agite le mélange à la température ambiante pendant 24 heures. A la fin de la réaction, on ajoute au mélange réactionnel 30 ml d'acide chlorhydrique 6 N pour décomposer l'agent
15 réducteur en excès ainsi que pour éliminer le groupe tertio-butoxy. Le mélange est débarrassé du méthanol par distillation sous pression réduite, mélangé avec 400 ml d'eau distillée, et extrait avec 300 ml de chloroforme pour éliminer l'aldéhyde résiduel. La phase
20 aqueuse est ajustée à pH 13,5 avec de l'hydroxyde de sodium et extraite deux fois avec 200 ml de chloroforme. La phase chloroformique contenant le produit désiré est séchée sur du sulfate de sodium et débarrassée du chloroforme par distillation sous pression réduite.
25 Le résidu est mélangé avec 100 ml d'eau distillée et 50 ml d'acide chlorhydrique concentré et évaporée à sec en donnant 66 g (rendement 71%) de trichlorhydrate de $\text{N-}\{3\text{-}\overline{\text{N}}\text{-(3-aminopropyl)-N-méthylamino}\overline{\text{}}\text{propyl}\}$ cyclo-octylamine.

30 Le spectre de résonance magnétique des protons du produit ci-dessus, comme déterminé dans l'eau lourde, présente les signaux suivants : δ (ppm) = 1,2 - 2,3, 15H (m); 2,0 - 2,8, 4H (m); 3,0 - 3,9, 10H (m); 3,25, 3H (s) (où m et s ont la signification donnée
35 plus haut). Ces signaux indiquent que la structure

chimique du composé est comme indiqué ci-dessus. D'autres propriétés physicochimiques sont indiquées sur le Tableau 8.

D'une manière analogue à celle décrite ci-dessus, on obtient le trichlorhydrate de N- $\{3-\bar{N}-(3\text{-aminopropyl})\text{-N-méthylamino}\overline{7}\text{propyl}\}$ -p-cyanobenzylamine (rendement 81%) et le trichlorhydrate de N- $\{3-\bar{N}-(3\text{-aminopropyl})\text{-N-méthylamino}\overline{7}\text{propyl}\}$ -2-(p-chlorophényl)-éthylamine (rendement 51%) à partir du p-cyanobenzaldéhyde et du p-chlorophénylacétaldéhyde, respectivement. Les propriétés physicochimiques de ces composés sont comme indiqué sur le Tableau 8.

Exemple 6

Le pH d'une solution de 14,90 g de BOC-APMP obtenu dans le premier stade de l'Exemple 5 dans 300 ml de méthanol est ajusté à 6,4 avec de l'acide acétique cristallisable. On ajoute à la solution refroidie à la glace 77,30 g (4 équivalents) de 3,4-dibenzyloxybenzaldéhyde puis 5,0 g de NaBH_3CN . On porte le mélange à la température ambiante, puis on l'agite pendant 96 heures, et on le débarrasse du méthanol par distillation sous pression réduite. Le résidu est dilué avec 200 ml d'eau distillée et extrait deux fois avec chaque fois 200 ml de chloroforme. Les phases chloroformiques sont réunies, séchées sur du sulfate de sodium, concentrées à 100 ml, et amenées à traverser une colonne de gel de silice de 1200 ml de volume, qui a été lavée avec du chloroforme au préalable, pour effectuer l'adsorption du composé désiré sur la colonne. La phase adsorbée est éluée avec un mélange de chloroforme et de méthanol tout en augmentant par paliers la concentration en méthanol. Le produit désiré est élué au moment où le rapport chloroforme/méthanol atteint 97:3. Les fractions d'éluat contenant le produit désiré sont réunies et concentrées sous pression réduite en donnant 31,43 g de

1- $\overline{N}$ -(3-tertio-butoxycarbonylaminopropyl)-N-méthylamino- $\overline{7}$ -
3- $\overline{Bis}$ (3,4-dibenzyloxybenzylamino) $\overline{7}$ propane sous forme
huileuse. A une solution de l'huile dans 78,6 ml de
dichlorométhane, tout en refroidissant à la glace et
5 en agitant, on ajoute 78,6 ml d'acide trifluoracétique
(TFA) goutte à goutte en une période de 30 minutes. On
laisse le mélange réactionnel réagir pendant 1,5 heure
à 0°C. On élève ensuite la température du bain à 25°C et
on chasse le solvant par distillation sous pression
10 réduite. On mélange le résidu avec 200 ml d'eau distillée
et 50 ml de solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 5 N,
et on l'extrait avec 500 ml de chloroforme pour recueillir
la 3- $\{N-\{N\text{-méthyl-}N\text{-}\overline{3}'\text{-bis(m,p-dibenzyloxybenzyl)-}$
aminopropyl $\overline{7}$ amino $\overline{3}\}$ propylamine (abrégée par MDD-amine).
15 La phase aqueuse est de nouveau extraite avec 100 ml de
chloroforme. Les phases chloroformiques sont réunies,
séchées sur du sulfate de sodium et débarrassées du
chloroforme sous pression réduite pour obtenir 26,30 g
d'une huile brute de MDD-amine. A des fins de purifi-
cation, l'huile brute est soumise à une chromatographie
20 sur colonne de Amberlite $\textcircled{R}$ XAD-2 (2000 ml de volume)
qui a été conduite de la façon suivante. L'huile brute
est dissoute dans 75 ml de méthanol et la solution est
mélangée avec 750 ml de solution tampon formée d'une
25 solution aqueuse à 4% d'acétate de potassium et de
solution aqueuse à 2% d'acide acétique (1:1). La
suspension résultante est amenée à traverser la colonne
pour adsorber le produit désiré sur la colonne. On
laisse la solution tampon circuler à travers la colonne
30 et on ajoute du méthanol au tampon de manière à augmenter
par paliers la concentration de méthanol. On constate
que le produit désiré (MDD-amine) est élué lorsque le
rapport tampon-méthanol devient 15:85. La fraction
contenant le produit désiré est débarrassée du méthanol

par distillation sous pression réduite, puis ajustée à pH 13 avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 5 N, et extraite trois fois avec chaque fois 300 ml de chloroforme. Les phases chloroformiques
5 sont réunies, séchées sur du sulfate de sodium, débar-
rassées du chloroforme par distillation sous pression réduite, et séchées sur du pentoxyde de phosphore en
donnant 21,08 g (rendement 46,2%) de MDD-amine (base libre) sous la forme d'une huile. Les propriétés
10 physicochimiques sont indiquées sur le Tableau 8.

TABLEAU 8

Amine synthétisée	Infrarouge (cm ⁻¹) (pastille de KBr)	Résonance magnétique des protons δ (ppm) (60 MHz, D ₂ O)	R _m δ	R _f δ
Trichlorhydrate de N-{3-[N-aminopropyl]- -N,N-diméthylamino]- propyl}-dibenzylamine	3425, 2975, 2750, 2600, 2000, 1640, 1600, 1480, 1460, 1420, 1350, 1300, 1220, 1190, 1160, 1120, 1060, 1030, 960, 920, 850, 700	2,0 - 2,7 4H (m) 2,9 - 3,8 8H (m) 3,3 6H (s) 4,6 4H (m) 7,7 10H (s)	1,32	0,72
Trichlorhydrate de N-{3-[N-(3-amino- propyl)-N,N-diéthyl- amino]propyl}- dibenzylamine	3425, 2975, 2750, 2600, 2000, 1600, 1480, 1450, 1400, 1200, 1180, 1160, 1120, 1080, 1050, 1020, 990, 960, 900, 800, 740, 680	1,4 6H (t) 1,9 - 2,6 4H (m) 4,7 4H (s) 7,7 10H (s)	1,64	0,81
Trichlorhydrate de N-{3-[N-(3-amino- propyl)-N-méthyl- amino]propyl}-cyclo- octylméthylamine	3425, 2950, 2875, 2775, 2700, 2050, 1600, 1480, 1300, 1200, 1170, 1140, 1070, 990, 970, 950, 850, 770	1,2 - 2,3 15H (m) 2,0 - 2,8 4H (m) 3,0 - 3,9 10H (m) 3,25 3H (m)	1,77	0,30

TABLEAU 8 (Suite)

Trichlorhydrate de N-{3-[N-(3-aminopropyl)-N- méthylamino]propyl}-(p- cyanobenzyl)amine	3425, 2975, 2800, 2750, 2675, 2250, 2000, 1960, 1840, 1700, 1600, 1520, 1300, 1220, 1170, 1120, 1060, 1030, 990, 970, 900, 860, 830, 760	2,0 - 2,7 4H (m) 3,0 - 3,8 8H (m) 3,1 3H (s) 4,5 2H (s) 7,7 - 8,1 4H (m)	1,86 0,38
Trichlorhydrate de N-{3-[N-(3-aminopropyl)-N- méthylamino]propyl}-2- (p-chlorophényl)éthylamine	3425, 2975, 2800, 2650, 2500, 2000, 1600, 1500, 1460, 1410, 1310, 1200, 1160, 1100, 1070, 1027, 960, 860, 810, 760, 720, 650	2,1 - 2,8 4H (m) 2,9 - 3,9 12H(m) 3,2 3H (s) 7,4 - 7,8 4H (m)	1,78 0,27
3-{N-[N-méthyl-N-[3-bis(m,p- dibenzylloxybenzyl)amino- propyl]amino}}propylamine	690, 730, 790, 805, 850, 905, 1020, 1085, 1130, 1160, 1195, 1220, 1265, 1380, 1425, 1455, 1510, 1590, 1610, 1650, 1760, 1815, 1880, 1960, 2800, 2870, 2940, 3040, 3075, 3375, 3660	1,2 - 1,9 6H (m) 2,0 - 2,9 11H(m) 3,43 4H (s) 5,16 8H (s) 6,6 - 7,7 26H(m)	0,78 0,24*4

Remarques : *1 m, t et m entre parenthèses représentent singulet, triplet et multiplet, respectivement

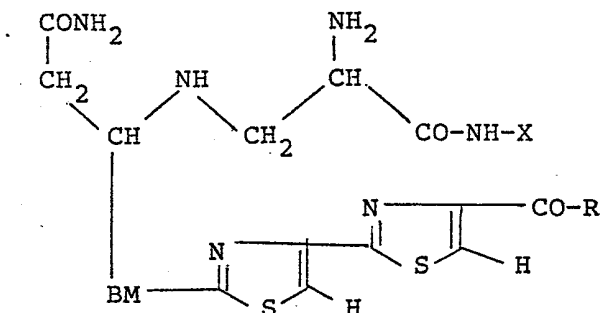
*2 Mobilité relative lorsque celle de l'alanine est de 1,0 dans l'électrophorèse en couche mince /Avicel SF R (FMP Co.), acide formique-acide acétique-eau (27:75:900 volume/volume), 800 V, 6 minutes/.

*3 Chromatographie en couche mince : Silica Gel 60F 254 (Merck Co.), méthanol(solution aqueuse à 10 % d'acétate d'ammonium - ammoniacque aqueux à 10 % (1:1:1 volume/volume), réaction colorée à la ninhydrine

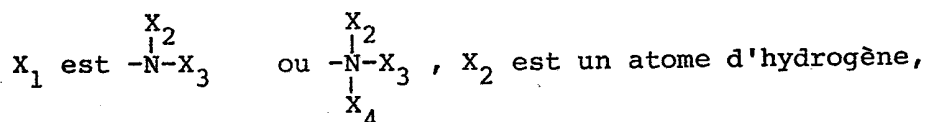
*4 Méthanol-solution aqueuse à 10 % d'acétate d'ammonium-ammoniacque aqueux à 10 % (10:1:1 volume/volume).

REVENDICATIONS

1 - Bléomycine substituée sur l'azote du groupe amido, caractérisée en ce qu'elle est représentée par la formule générale suivante



- 5 dans laquelle BM représente un fragment de squelette de bléomycine; X représente (1) un groupe alkyle de 1 à 18 atomes de carbone, (2) un groupe aminoalkyle de 1 à 12 atomes de carbone, (3) un groupe alkyle inférieur ayant comme substituant (a) de 1 à 3 atomes d'halogène, (b) 1
10 ou 2 groupes phényle, (c) un groupe indolyle, ou (d) un groupe hétérocyclique à cinq ou six chaînons contenant un atome d'oxygène, de soufre ou d'azote (parmi les groupes substituants, le groupe phényle ou indolyle peut encore être substitué par un atome d'halogène ou un groupe
15 alcoxy inférieur), (4) un groupe X_1 -(alkyle inférieur) [où

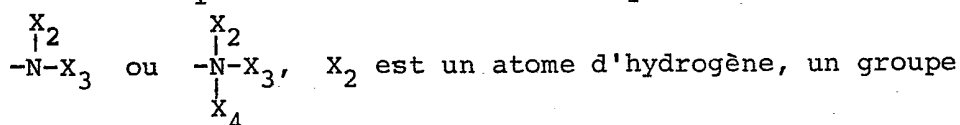


- un groupe alkyle inférieur ou benzyle, X_3 est (a) un groupe alkyle inférieur, (b) un groupe phényl(alkyle inférieur), ou (c) un groupe mono- ou di-(alkyle inférieur)
20 amino(alkyle inférieur) qui peut être substitué par un groupe phényle ou halogénophényle, X_4 est (a) un groupe

alkyle inférieur ou (b) un groupe phényl(alkyle inférieur)]⁷,
 (5) un groupe naphthyle, (6) un groupe thiazolyle, ou (7)
 un groupe N-phényl(alkyle inférieur)pipérazinyle; et R
 représente un reste amino terminal de la bléomycine; ou
 5 un de ses sels.

2 - Bléomycine ou un de ses sels selon la revendication
 1, caractérisé en ce que X est un groupe alkyle de 1 à
 12 atomes de carbone ou un groupe alkyle inférieur ayant
 comme substituant (a) de 1 à 3 atomes d'halogène, (b) de
 10 1 ou 2 groupes phényle, (c) un groupe indolyle, ou (d) un
 groupe hétérocyclique à cinq ou six chaînons contenant un
 atome de soufre, ou d'azote (parmi les groupes substituants,
 le groupe phényle ou indolyle peut être encore substitué
 par un atome d'halogène ou un groupe alcoxy inférieur).

15 3 - Bléomycine ou un de ses sels, selon la revendica-
 tion 1, caractérisée en ce que X est un groupe alkyle
 de 1 à 12 atomes de carbone, un groupe trihalogéno(alkyle
 inférieur), un groupe aminoalkyle de 2 à 12 atomes de
 carbone, un groupe phényl(alkyle inférieur), un groupe
 20 halogénophényl(alkyle inférieur), un groupe diphényl(alkyle
 inférieur), un groupe méthoxyindolyle, un groupe pyridyl
 (alkyle inférieur), un groupe pipérazinyl(alkyle inférieur),
 un groupe X₁-(alkyle inférieur) / où X₁ est



25 alkyle inférieur ou benzyle, X₃ est (a) un groupe alkyle
 inférieur, (b) un groupe phényl(alkyle inférieur), ou
 (c) un groupe mono- ou di-(alkyle inférieur)amino(alkyle
 inférieur) qui peut être substitué par un groupe phényle
 ou halogénophényle, et X₄ est (a) un groupe alkyle
 30 inférieur ou (b) un groupe phényl(alkyle inférieur)]⁷,
 un groupe thiazolyle, ou un groupe N-phényl(alkyle
 inférieur)pipérazinyle.

4 - Bléomycine ou un de ses sels selon la revendica-
 tion 1, caractérisée en ce que le groupe X -(alkyle

inférieur) est un groupe mono- ou di-(alkyle inférieur)-amino(alkyle inférieur)amino(alkyle inférieur), un groupe phényl(alkyle inférieur)amino(alkyle inférieur), un groupe di(alkyle inférieur)-amino(alkyle inférieur), un groupe
 5 N-[halogénophényl(alkyle inférieur)amino(alkyle inférieur)]-N-(alkyle inférieur)amino(alkyle inférieur), ou un groupe N-(alkyle inférieur)-N-phényl(alkyle inférieur)-N-[di-phényl(alkyle inférieur)amino(alkyle inférieur)]amino(alkyle inférieur).

10 5 - Bléomycine ou un de ses sels selon la revendication 1, caractérisée en ce que R est un groupe amino primaire aliphatique ayant un groupe basique.

6 - Bléomycine ou un de ses sels selon la revendication 5, caractérisée en ce que le groupe amino aliphatique
 15 primaire est le groupe 1-phényléthylaminopropylamino, le groupe butylaminopropylamino ou un groupe de formule -NH(CH₂)₃-A'-(CH₂)₃-B' dans lequel A' est

20
$$\begin{array}{c} R_{10'} \\ | \\ -N- \end{array} \quad \text{ou} \quad \begin{array}{c} R_{10'} \\ | \\ -N^{\oplus}- \\ | \\ R_{11'} \end{array} \quad (\text{où } R_{10'} \text{ est un groupe alkyle inférieur}$$

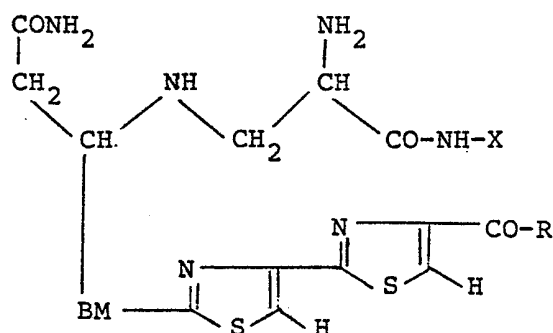
et R_{11'} est un groupe alkyle inférieur ou benzyle) et B' est

$$\begin{array}{c} R_{13'} \\ | \\ -N-R_{12'} \end{array} \quad (\text{où } R_{12'} \text{ est un groupe phényl(alkyle inférieur)} \\$$

 25 qui peut porter sur son groupe phényle un ou plusieurs (a) atomes d'halogène, (b) groupes cyano ou (c) groupes benzyloxy, ou un groupe alkyle inférieur substitué par un groupe cycloalkyle de 5 à 13 atomes de carbone; et R_{13'} est un atome d'hydrogène ou un groupe benzyle qui peut
 30 être substitué par 1 ou 2 groupes benzyloxy).

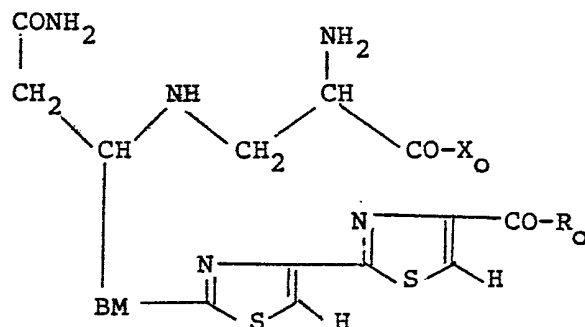
7 - Bléomycine ou un de ses sels selon la revendication 1, caractérisée en ce que X est un groupe isopropyle, 1-phényléthylaminopropyle, diéthylamino-1-méthyl-butyle ou dibutylaminopropyle et R est un groupe 1-phényléthylaminopropylamino, un groupe N-(alkyle inférieur)-N-
 35 (halogénobenzyl-aminopropyl)aminopropylamino ou un groupe n-butylaminopropylamino-propylamino.

- 8 - Bléomycine ou un de ses sels, selon la revendication 1, caractérisée en ce que X est un groupe alkyle de 3 à 10 atomes de carbone, benzyle, 1-phényléthylaminopropyle, di-n-butylaminopropyle, n-butylaminopropylaminopropyle, N-méthyl N-benzyl-N-(dibenzylaminopropyl)aminopropyle, ou N-méthyl-N-(halogénophényléthylaminopropyl)aminopropyle et R est un groupe N-méthyl-N-(halogénophényléthylaminopropyl)aminopropylamino, N-méthyl-N-benzyl-N-(dibenzylaminopropyl)-aminopropylamino, N-méthyl-N- $\overline{\text{Bis}}(\text{m,p-dibenzyl oxybenzyl})$ -aminopropyl $\overline{\text{aminopropylamino}}$, N,N-diméthyl-N-(dibenzylaminopropyl)aminopropylamino, N,N-diéthyl-N-(dibenzylaminopropyl)aminopropylamino, N-méthyl-N-(cyclooctylméthylaminopropyl)aminopropylamino, ou N-méthyl-N-(cyanobenzylaminopropyl)aminopropylamino.
- 9 - 3- { N,N-diméthyl-N- $\overline{\text{3}}$ -(dibenzylamino)propyl $\overline{\text{7}}$ -amino } propylamino-(amido)N- $\overline{\text{3}}$ -((S)-1'-phényléthyl)aminopropyl $\overline{\text{7}}$ -bléomycine ou un de ses sels.
- 10 - 3- { N-méthyl-N- $\overline{\text{3}}$ '-bis(m,p-dibenzyl oxybenzyl)-aminopropyl $\overline{\text{7}}$ amino } propylamino-(amido)-N- $\overline{\text{3}}$ -((S)-1'-phényléthyl)-aminopropyl $\overline{\text{7}}$ bléomycine ou un de ses sels.
- 11 - 3- { N,N-diméthyl-N- $\overline{\text{3}}$ -(dibenzylamino)propyl $\overline{\text{7}}$ -amino } propylamino-(amido)N-octylbléomycine.
- 12 - 3- { N-méthyl-N- $\overline{\text{3}}$ '-bis(m,p-dibenzyl oxybenzyl)aminopropyl $\overline{\text{7}}$ amino } propylamino-(amido)N-octyl-bléomycine.
- 13 - Procédé de préparation d'une bléomycine substituée sur l'azote du groupe amido représentée par la formule générale :



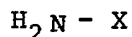
dans laquelle BM et X sont tels que définis à la revendication 1, et R représente un groupe amino correspondant au reste amino terminal de la bléomycine, caractérisé en ce qu'on condense un composé représenté par la

5 formule générale :



(dans laquelle BM est comme défini ci-dessus, R_O représente un groupe hydroxyle ou un reste amino terminal de bléomycine, et X_O représente un groupe hydroxyle ou un

10 groupe de formule $-NH-X$, où X est comme défini ci-dessus, pourvu qu'au moins l'un de R_O et X_O soit un groupe hydroxyle) ou un dérivé réactif de son groupe carboxyle avec (a) une amine de formule



15 (où X est comme défini ci-dessus) lorsque R_O de la formule ci-dessus est un groupe hydroxyle, ou avec (b) une amine de formule

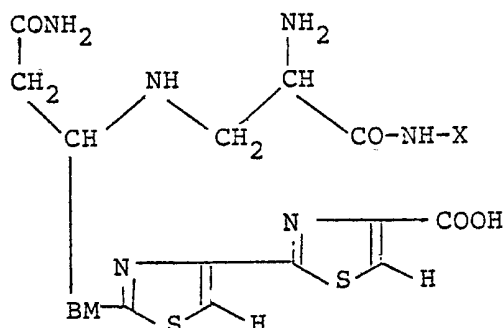


(où R est comme défini ci-dessus) lorsque R_O de la

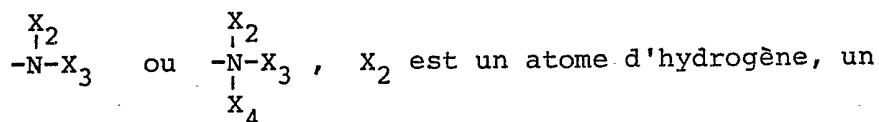
20 formule ci-dessus est un groupe hydroxyle et X_O est un groupe $-NH-X$ (où X a la définition ci-dessus), et, si nécessaire, on élimine le cuivre du produit de condensation résultant.

14 - Acide bléomycinique substitué sur l'azote du

25 groupe amido représenté par la formule suivante :

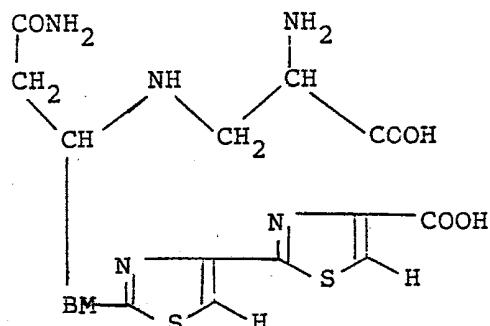


dans laquelle BM représente un fragment de squelette de bléomycine; X représente (1) un groupe alkyle de 1 à 18 atomes de carbone, (2) un groupe aminoalkyle de 1 à 12 atomes de carbone, (3) un groupe alkyle inférieur portant comme substituant (a) de 1 à 3 atomes d'halogène, (b) de 1 ou 2 groupes phényle, (c) un groupe indolye ou (d) un groupe hétérocyclique à cinq ou six chaînons contenant un atome d'oxygène, de soufre ou d'azote (parmi les groupes substituants, le groupe phényle ou indolye peut encore être substitué par un atome d'halogène ou un groupe alcoxy inférieur), (4) un groupe X_1 -(alkyle inférieur) [où X_1 est



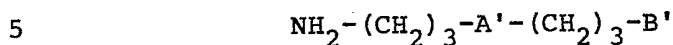
groupe alkyle inférieur ou benzyle, X_3 est (a) un groupe alkyle inférieur, (b) un groupe phényl(alkyle inférieur), ou (c) un groupe mono- ou di-(alkyle inférieur)amino(alkyle inférieur) qui peut être substitué par un groupe phényle ou halogénophényle, X_4 est (a) un groupe alkyle inférieur ou (b) un groupe phényl(alkyle inférieur)]7, (5) un groupe naphthyle, (6) un groupe thiazolyle ou (7) un groupe N-phényl(alkyle inférieur)pipérazinyle; ou un de ses sels.

15 - Acide déamidobléomycinique représenté par la formule :

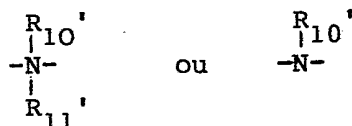


(dans laquelle BM représente un fragment de squelette de bléomycine) ou un de ses sels.

16 - Amine représentée par la formule générale :



dans laquelle A' représente :



(où R_{10}' et R_{11}' représentent chacun un groupe alkyle inférieur ou benzyle) et B' représente un groupe di-

- 10 [phényl(alkyle inférieur)]-amino, un groupe cyanophényl (alkyle inférieur)amino, un groupe cycloalkyle (en C_{5-13}) (alkyle inférieur)amino, ou un groupe dibenzyloxyphényl (alkyle inférieur)amino.

- 15 17 - Médicament à activité anti-cancéreuse, caractérisé en ce qu'il contient, à titre de principe actif, une bléomycine substituée sur l'azote du groupe amido suivant l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou non, et thérapeutiquement acceptable de celle-ci.