

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 13172

(54) Composés organiques azotés extraits de plantes et leurs dérivés, leur préparation et leurs utilisations thérapeutiques, notamment en tant qu'agents antinéoplastiques.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 07 D 498/08; A 61 K 31/395; C 07 H 17/00.

(22) Date de dépôt..... 28 juillet 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : JP, 28 juillet 1981, n° 117968/1981.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 5 du 4-2-1983.

(71) Déposant : Société dite : TOBISHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. — JP.

(72) Invention de : Hideji Itakawa.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

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

La présente invention se rapporte à de nouveaux composés extraits de plantes, à des dérivés de ces composés, à leur préparation et à leurs utilisations thérapeutiques, notamment en tant qu'agents antinéoplastiques.

5 Les composés selon l'invention ont des effets thérapeutiques extrêmement intéressants. Certains des nouveaux composés sont des constituants de végétaux appartenant au genre *Rubia* et les autres sont des dérivés de ces composants.

On a déjà tenté à de nombreuses reprises d'obtenir
10 des extraits antinéoplastiques à partir de végétaux. Parmi ces extraits, on citera une matière contenant des alcaloïdes extraite de la plante *Colchicum autumnal* (J. Chem. Soc. 1940, 194) ou *Vinca rosea* (J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 1440); un type de lignane extrait de *Podophyllum peltatum* (J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 235);
15 et une substance anthamacirolidique dont la structure moléculaire est semblable à celle de la rifamycine, qu'on extrait d'une plante de la famille des celastracées. On citera encore, parmi les substances extraites d'un végétal inférieur, un champignon, un corps de protéine-polysaccharide extrait de *Coriolus versicolor*, qui se
20 trouve déjà sur le marché (GAN TO KAGAKURYOHO, 1974, 1, 251). Néanmoins, un petit nombre seulement de ces extraits ont trouvé une utilisation pratique en médecine.

En outre, un certain nombre de chercheurs ont tenté d'obtenir un produit défini possédant une excellente action
25 pharmacologique à partir de végétaux; un petit nombre de chercheurs sont parvenus à des résultats.

Naturellement, on a aussi effectué des études approfondies visant à obtenir de tels médicaments par la synthèse chimique; presque toutes ces études ont été interrompues, sans connaître
30 de succès notable. La raison en est que de tels médicaments de synthèse ont des effets secondaires sérieux.

La demanderesse a alors porté son intérêt vers les plantes médicinales et a procédé à des études approfondies visant à obtenir des composants utiles à partir de plantes médicinales.
35 Celles-ci ont été utilisées depuis longtemps dans la médecine populaire, et même encore à présent en raison de leur faible toxicité et d'une action pharmacologique modérée; de sorte que, même dans

le domaine médical moderne, on a été amené à reconsidérer les effets auxquels on peut parvenir au moyen de plantes médicinales.

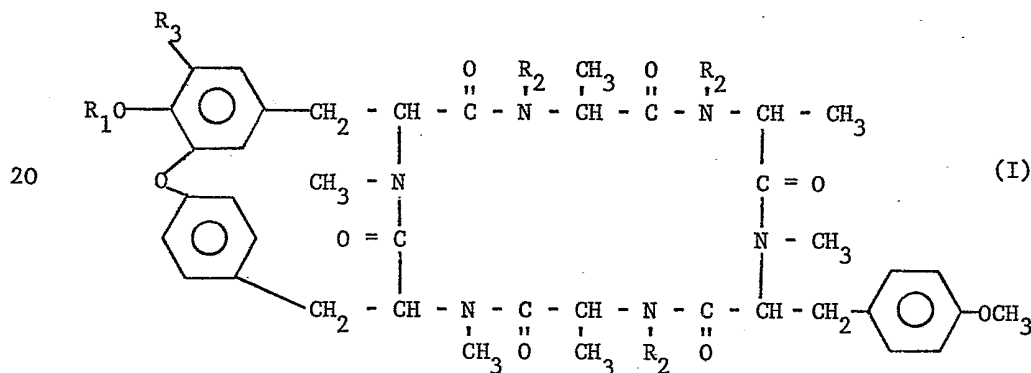
Ainsi, la demanderesse a trouvé que l'extrait brut de garance (*Rubia spp*) avait d'excellents effets thérapeutiques et qu'on pouvait obtenir un produit défini possédant une forte action antinéoplastique en purifiant cet extrait brut. Ces découvertes sont à la base de l'invention.

L'invention concerne donc en premier lieu de nouveaux composés dont les effets thérapeutiques sont précieux.

L'invention comprend également des procédés de préparation de ces composés, et les utilisations thérapeutiques de ces composés, notamment en tant qu'agents antinéoplastiques.

D'autres buts et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description ci-après.

Les composés selon l'invention répondent à la formule générale (I) :



25 dans laquelle R_1 représente un groupe acyle -COA (A représentant un groupe alkyle en C_1-C_{20} substitué ou linéaire, saturé ou insaturé; un groupe phényle éventuellement substitué par un atome d'halogène, un groupe alkyle inférieur, nitro ou amino; un groupe benzyle ou styryle éventuellement substitué par un atome d'halogène, un groupe alkyle inférieur, nitro ou amino); un groupe alkyle linéaire ou ramifié en C_1-C_{20} ; un groupe cycloalkyle en C_3-C_6 éventuellement substitué par un groupe alkyle inférieur, amino, nitro ou un atome d'halogène; un groupe carboxyalkyle en C_1-C_5 ou un ester d'un tel groupe et d'un alcool en C_1-C_5 ; un groupe hétérocyclique; un reste

30

de saccharide; un groupe $-SO_2CH_3$ ou un atome d'hydrogène, R_2 représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle inférieur et R_3 représente un atome d'hydrogène ou un groupe azoté tel qu'un groupe amino ou nitro.

5 On a trouvé que les composés selon l'invention avaient une activité antinéoplastique et des effets thérapeutiques, en particulier des effets émétiques, anorexigènes, psychotropes, vasoconstricteurs, papavériniques, antiparkinsoniens et/ou anti-diurétiques.

10 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront plus clairement de la description détaillée donnée ci-après en référence aux figures des dessins annexés, sur lesquels :

- les figures 1 à 3 représentent les spectres infrarouges des composés de l'exemple 1, à savoir le composé TPC-A et son ester méthylique, et le composé obtenu dans l'exemple 22, le dérivé acétylé du TPC-A.

La plante *Rubia akane* utilisée comme matière première à partir de laquelle on a isolé les composés TPC-A et son ester méthylique est une plante vivace poussant spontanément dans les champs et les montagnes du monde entier. Sa racine de couleur rouge orangé a été utilisée en tant que dépuratif du sang, emménagogue et hémostatique dans la Médecine Orthodoxe Chinoise et en médecine populaire dans le traitement des refroidissements, de la cardiopathie et des contusions, sous la forme de décoction.

On sait que les *Rubia* spp contiennent des anthraquinones, des népétalactones, des triterpénoïdes, des saponines, des alcaloïdes, mais, jusqu'à maintenant, on n'avait jamais extrait ou isolé de composants actifs individuels à partir de ces plantes.

30 Le composé TPC-A qui porte un groupe hydroxyle et qui peut être extrait et isolé de *Rubia akane* et *R. cordifolia* a lui-même un effet antinéoplastique et on pense qu'il a d'autres utilisations en tant que composant actif pharmacologique. En outre, il est utile en tant que produit intermédiaire de la préparation de dérivés qu'on peut obtenir par modification chimique de son groupe hydroxy libre et/ou de son groupe imino.

Le composé TPC-A peut être extrait de la racine de *Rubia akane* et *R. cordifolia* en soumettant la racine sèche de ces végétaux à extraction par un solvant tel que le méthanol, l'éthanol, le chloroforme ou l'acétate d'éthyle, en concentrant l'extrait et en soumettant l'extrait concentré brut à des opérations chromatographiques d'isolement et de purification.

L'éther méthylique du composé TPC-A peut également être extrait de la racine de *Rubia akane* et *R. cordifolia* dans une fraction différente de celle contenant le TPC-A, par les mêmes modes opératoires. En outre, ce composé peut également être préparé par méthylation du composé TPC-A sur le groupe hydroxy libre de ce dernier, dans un solvant approprié. Ce composé peut également être utilisé en tant que produit de départ de la préparation d'autres dérivés.

Pour la réaction de méthylation, on peut utiliser comme solvant, selon l'agent méthylant mis en oeuvre, un alcool, un éther ou un solvant aqueux. On peut également utiliser un agent méthylant connu, tel qu'un halogénure de méthyle, le diazométhane ou du sulfate de diméthyle et la méthylation du composé TPC-A peut être réalisée comme une réaction classique de méthylation.

Au cours de l'opération d'extraction, si celle-ci est effectuée par chromatographie sur une colonne de charbon actif, il peut être avantageux d'utiliser comme éluant un solvant moins polaire que l'extrait, et par exemple le benzène, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le méthanol, ou un mélange de ces solvants. Bien que la séparation soit effectuée par chromatographie de liquide, on préfère les colonnes chromatographiques en phase inversée comme les colonnes C-18 (de la firme Waters Associates Inc.), RP-8 ou RP-18 (de la firme Merck & Co., Inc.), ou encore une colonne de gel de silice traitée par l'octadécylsilane (ODS).

On peut préparer d'autres dérivés du TPC-A ou de son ester méthylique par les modes opératoires suivants :

Parmi les nouveaux composés de l'invention, les composés dans lesquels R_1 représente un groupe alkyle, cycloalkyle, carboxyalkyle éventuellement estérifié peuvent être préparés facilement en faisant réagir le composé TPC-A isolé de la
5 garantie avec un agent alkylant, tel qu'un halogénure d'alkyle, un agent méthylant, un halogénure de cycloalkyle ou un halogénure ou ester de carboxyalkyle. Parmi les agents alkylants, on mentionnera les halogénures d'alkyle en C_1-C_{20} , par exemple les bromures, les halogénures de cycloalkyle en C_3-C_6 , par exemple
10 les bromures, les halogénures de carboxyalkyle en C_1-C_5 , par exemple les bromures, et leurs esters alkylés inférieurs.

L'alkylation d'un groupe OH fixé sur un noyau phényle est une opération bien connue et, dans l'invention, l'alkylation du composé TPC-A est effectuée selon un mode opératoire classique.
15

Les composés dans lesquels R_1 représente un groupe acyle peuvent être préparés en faisant réagir le composé TPC-A avec un agent acylant selon une technique d'acylation classique. Parmi les agents acylant, on citera les halogénures
20 ou anhydrides d'acides comme l'anhydride acétique, l'anhydride propionique, l'anhydride butyrique ou isobutyrique, l'anhydride crotonique, l'anhydride valérique, l'anhydride caproïque, l'anhydride oenanthique, l'anhydride caprylique, l'anhydride caprique, l'anhydride stéarique, l'anhydride benzoïque, l'anhydride
25 o-, m- ou p-chlorobenzoïque, l'anhydride m- ou p-nitrobenzoïque, l'anhydride cinnamique, l'anhydride phénylacétique, et les chlorures ou bromures des acides correspondants.

Lorsqu'on utilise à la place de l'agent acylant un halogénure de l'acide méthanesulfonique, on peut préparer de la même manière l'ester méthanesulfonique du composé
30 TPC-A.

Les composés dans lesquels R_3 représente un groupe azoté peuvent être préparés par exemple par nitration du composé TPC-A et, lorsque c'est nécessaire, réduction du groupe
35 nitro selon des techniques classiques de nitration et de réduction.

Les composés dans lesquels un au moins des symboles R_2 représente un groupe méthyle peuvent être préparés par méthylation de l'éther méthylique du TPC-A à l'aide d'un agent méthylant connu, comme le diazométhane, un halogénure de méthyle, en particulier l'iodure, le sulfate de diméthyle, en présence d'un hydroxyde alcalin, d'un carbonate alcalin ou de fluorure de potassium.

Les composés dans lesquels R_1 représente un reste de sucre peuvent être préparés par réaction entre le composé TPC-A et un saccharide activé et protégé en présence d'un catalyseur tel que l'hydrure de sodium, l'oxyde d'argent, le perchlorure d'argent, un sel d'argent. L'activation du saccharide peut être réalisée selon les techniques connues et le groupe protecteur peut consister par exemple en un groupe acétyle, benzoyle, benzyle ou en un autre groupe acyle qui peut être éliminé dans des conditions ménagées.

Les restes de sucre qu'on utilise dans l'invention peuvent consister en restes de glucose, de galactose, de rhamnose, de fructose ou de xylose.

Les exemples qui suivent illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée; dans ces exemples, les indications de parties et de pourcentages s'entendent en poids sauf mention contraire.

EXEMPLE 1

(i) Extraction.

A 500 g de la matière première sèche (racine de *Rubia cordifolia*), on ajoute 1 litre de méthanol et on extrait au bain d'eau chaude pendant 3 h en poursuivant le chauffage; on sépare ensuite l'extrait du résidu par filtration. On répète l'extraction du résidu à l'aide de 1 litre de méthanol frais. Après avoir répété cette opération d'extraction, on combine les extraits entre eux et on concentre sous vide; on obtient 27 g d'extrait brut. On en dissout 25 g dans 200 ml de méthanol et on jette la solution sur une colonne garnie de 250 g de charbon actif pour chromatographie (de la firme Wako Inc.). Après lavage de la colonne par le méthanol, on élue par le mélange chloroforme-

méthanol et par le chloroforme, on combine les fractions éluées et on concentre sous vide; on obtient 10 g d'une matière huileuse de couleur brun rougeâtre.

On dissout 9 g de cette substance huileuse dans une petite quantité de chloroforme et on adsorbe sur une colonne garnie de 400 g de gel de silice. On lave ensuite la colonne par le chloroforme, un mélange chloroforme/acétate d'éthyle et l'acétate d'éthyle dans cet ordre avant d'éluer par un mélange chloroforme/méthanol. On recueille l'éluat et on concentre sous vide; on obtient 1,4 g d'une substance huileuse.

On en dissout 1,3 g dans une petite quantité de chloroforme, on adsorbe la solution sur une colonne garnie de 150 g de gel de silice, on lave la colonne par le chloroforme, puis un mélange chloroforme/méthanol, 100:1, et on élue par le mélange chloroforme/méthanol, 100:3. On recueille les éluats et on les combine, on concentre sous vide; on obtient 250 mg d'une substance solide.

On redissout cette substance dans une petite quantité de mélange chloroforme/méthanol et on développe la solution sur une plaque de chromatographie sur couche mince, (type 7544 de la firme Merck & Co., Inc.), à l'aide d'un mélange chloroforme/méthanol, 100:15; on jette les bandes qui présentent une coloration bleu sombre sous irradiation par la lumière ultraviolette (à 254 nm), correspondant à des valeurs de R_f de 0,60 à 0,71 et 0,50 à 0,59 respectivement dans des colonnes séparées; on élue chaque colonne par un mélange chloroforme/méthanol et, après évaporation à sec sous vide, on obtient respectivement 56 mg et 24 mg de substance solide couleur brun clair à partir des fractions présentant respectivement la basse valeur de R_f et la forte valeur de R_f .

On soumet une solution de 40 mg de la substance solide à basse valeur de R_f dans l'acétonitrile aqueux à 24% à chromatographie de liquide sous haute pression sur une colonne de Micro Bondapak C-18 de la firme Waters Associates Inc., avec, comme solvant de développement, une solution aqueuse

d'acétonitrile à 45% en utilisant comme indication l'absorbance à 254 nm; on évapore l'éluat à sec sous vide; on obtient 24 mg d'une poudre blanche (TPC-A). Si on le désire, on peut répéter l'opération de chromatographie de liquide sous haute
5 pression pour purifier plus complètement le produit.

On répète la même opération sur la solution de 20 mg de l'autre substance solide (à forte valeur de R_F) dans l'acétonitrile aqueux à 45%; on obtient 12 mg d'une poudre blanche (éther méthylique du TPC-A). On recristallise cette poudre dans
10 le méthanol; on obtient 10 mg d'aiguilles cristallines incolores.

(ii) On répète les opérations décrites ci-dessus sous (i) en utilisant comme matière première 100 g de Rubia akane sec; on obtient 7,3 mg de TPC-A et de son éther méthylique.

(iii) Préparation de l'éther méthylique du composé TPC-A.

15 On dissout 10 mg du composé TPC-A dans une petite quantité de méthanol et on ajoute 5 ml d'une solution de diazométhane dans l'éther. Après avoir abandonné au repos dans l'eau glacée pendant 1 h, on évapore la solution à sec sous vide; on recristallise la poudre blanche dans le méthanol; on
20 obtient 8 mg d'aiguilles cristallines incolores.

Les spectres de RMN et I.R. confirment que le produit obtenu est l'éther méthylique du TPC-A.

Les propriétés physiques et chimiques de ces composés, TPC-A et son éther méthylique, extraits de la garantie,
25 sont rapportées dans le tableau 1 ci-après. Les spectres infrarouges sont représentés dans les figures 1 et 2 des dessins annexés.

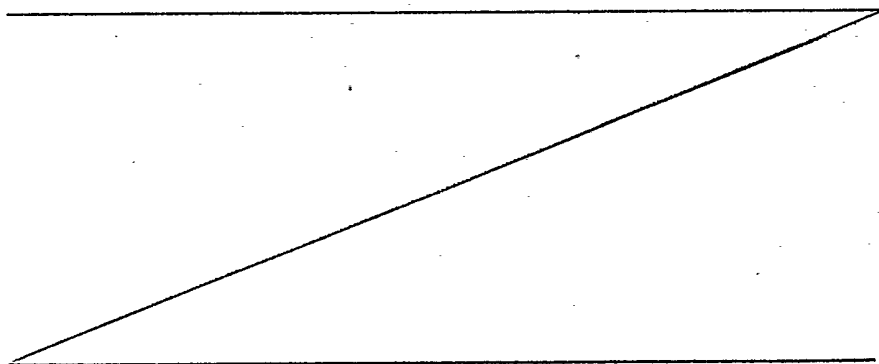


TABLEAU 1

Propriétés	TPC-A	Ether méthylique de TPC-A
Poids moléculaire *	756	770
Aspect	poudre blanche	aiguilles incolores
Point de fusion	environ 235°C, produit brunissant peu à peu (pas de point de décomposition défini)	>280°C (pas de point de décomposition défini)
Pouvoir rotatoire spécifique, $[\alpha]_D$	-220° (CHCl ₃ , C=0,1)	-224° (CHCl ₃ , C=0,25)
U.V., $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$	276 nm; $\epsilon = 3800$ 282 nm; $\epsilon = 3300$	276 nm; $\epsilon = 3800$ 282 nm; $\epsilon = 3300$
R.M.N., (δ ppm) **	2,70(3H, s), 2,86(3H, s) 3,10(3H, s), 3,77(3H, s)	2,70(3H, s), 2,86(3H, s) 3,12(3H, s), 3,78(3H, s) 3,92(3H, s)
I.R. ***	figure 1	figure 2

* Le poids moléculaire a été déterminé par spectroscopie de masse à désorption de champ (FD-MS).

** Le spectre de RMN protonique a été réalisé avec CDCl₃ comme solvant et Si(CH₃)₄ comme étalon interne, à 100 MHz.

*** Le spectre I.R. a été mesuré par la méthode à KBr.

EXEMPLES 2 à 17

A un mélange solvant de 4 ml de tétrahydrofuranne, 8 ml de méthanol et 2 ml d'eau, on ajoute 100 mg de TPC-A puis 20 mg de bromure de n-hexyle et un excès de carbonate de potassium anhydre; on fait ensuite bouillir le mélange au reflux sur bain d'huile chauffé à 100°C. Lorsque la réaction est terminée, on coupe le chauffage, on ajoute de l'eau à la solution de réaction, on extrait par l'acétate d'éthyle et on lave l'extrait par une saumure saturée. On sèche l'extrait sur sulfate de magnésium anhydre, on distille le solvant sous vide, on lave le résidu par le n-hexane et on purifie par chromatographie sur couche mince. On recristallise le produit dans le méthanol; on obtient 63 mg de l'éther n-hexylique du composé TPC-A à l'état de cristaux incolores.

Par le même mode opératoire, mais en utilisant à la place du bromure de n-hexyle, le bromure de n-alkyle indiqué dans le tableau 2 ci-après, on obtient l'éther n-alkylique correspondant.

Les propriétés physiques de ces composés sont également rapportées dans le tableau 2.

Exemple n°	R ₁	TABLEAU 2		
		F. (°C) (décomposition)	[α] _D (CHCl ₃)	T(°C)
2	(CH ₂) ₅ CH ₃	261 - 268	-178	26
3	CH ₂ CH ₃	219 - 225	-194	25
4	(CH ₂) ₂ CH ₃	212 - 217	-193	25
5	CH(CH ₃) ₂	213 - 220	-194	26
6	(CH ₂) ₃ CH ₃	210 - 216	-192	25
7	(CH ₂) ₄ CH ₃	214 - 221	-191	25
8	(CH ₂) ₆ CH ₃	245 - 250	-189	26
9	(CH ₂) ₇ CH ₃	243 - 249	-178	27
10	(CH ₂) ₈ CH ₃	245 - 248	-169	26
11	(CH ₂) ₉ CH ₃	242 - 247	-198	26

TABLEAU 2 (suite)

Exemple n°	R ₁	F. (°C) (décomposition)	[α] _D (CHCl ₃)	T(°C)
12	(CH ₂) ₁₀ CH ₃	228 - 235	-179	26
13	(CH ₂) ₁₁ CH ₃	240 - 242	-189	26
5 14	(CH ₂) ₁₂ CH ₃	238 - 242	-186	26
15	(CH ₂) ₁₇ CH ₃	228 - 235	-153	26
16		215 - 222	-171	25
17		229 - 233	-155	26

EXEMPLE 18

- 10 i) On répète les opérations de l'exemple 2, mais on remplace le bromure de n-hexyle par le bromacétate de méthyle; on obtient alors l'éther hydroxycarbonylméthylque (1) du composé TPC-A à l'état de cristaux incolores.
- ii) On traite le produit (1) obtenu en i) ci-dessus
- 15 par le diazométhane et on recristallise dans le méthanol; on obtient l'ester méthylque (2) du composé (1) à l'état de cristaux incolores. Les propriétés physiques de ce composé sont indiquées dans le tableau 3.

EXEMPLE 19

- 20 i) On répète l'opération i) de l'exemple 18 en remplaçant le bromacétate de méthyle par le bromobutyrate d'éthyle; on prépare l'éther hydroxycarbonylpropylque (1) et l'éther éthoxycarbonylpropylque (2) du composé TPC-A.
- ii) On traite le composé (1) par le diazométhane et
- 25 on recristallise dans le méthanol; on obtient l'éther méthoxycarbonylpropylque du composé TPC-A à l'état de cristaux incolores.
- Les propriétés physiques de ces composés sont rapportés dans le tableau 3 ci-après.

TABLEAU 3

Exemple n°	R ₁	F., °C (décomposition)	$[\alpha]_D^{26}(\text{CHCl}_3)$	T (°C)
18 (1)	CH ₂ COOH	211 - 215	-141	25
18 (2)	CH ₂ COOCH ₃	201 - 207	-161	24
5 19 (1)	(CH ₂) ₃ COOH	223 - 228	-140	24
19 (2)	(CH ₂) ₃ COOCH ₂ CH ₃	181 - 186	-188	24
19 (3)	(CH ₂) ₃ COOCH ₃	178 - 184	-171	25

EXEMPLE 20

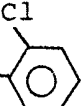
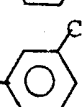
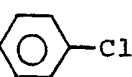
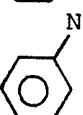
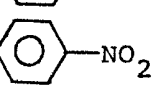
Dans 4 ml d'un mélange solvant consistant en acétate d'éthyle anhydre (19 ml) et acétate d'éthyle contenant 5% d'HCl anhydre (1 ml), on dissout 100 mg du composé TPC-A, on ajoute 0,4 ml de 2,3-dihydropyranne et, après avoir fermé hermétiquement le récipient de réaction, on abandonne le mélange pendant une nuit à 5°C. Lorsque la réaction est terminée, on ajoute de l'acétate d'éthyle, on lave la solution par une saumure saturée et on sèche sur sulfate de magnésium anhydre. On distille le solvant sous vide et on lave le résidu par le n-hexane puis on purifie par chromatographie sur couche mince. On recristallise le produit cristallisé dans le méthanol; on obtient 55 mg de l'éther tétrahydropyrannylique du TPC-A à l'état de cristaux incolores fondant à 286-289°C (décomposition), $[\alpha]_D^{26} = -157^\circ$ (CHCl₃).

EXEMPLES 21 à 39

On dissout 50 mg de TPC-A dans 5 ml de pyridine anhydre et on ajoute goutte à goutte sous agitation 15 ml d'anhydride caproïque. Après repos d'une nuit à température ambiante, on ajoute du toluène anhydre à la solution et on distille le solvant sous vide. On lave le résidu par le n-hexane et on recristallise le précipité dans le méthanol; on obtient 38 mg de caproate de TPC-A à l'état de cristaux incolores.

On a répété la même opération avec d'autres acides (y compris des anhydrides ou le chlorure de méthanesulfonyle) correspondant aux restes énumérés dans le tableau 4 ci-après, en remplacement de l'anhydride caproïque; on a obtenu les composés correspondants du tableau 4 à l'état de cristaux incolores. Les propriétés physiques de ces produits sont également rapportés dans le tableau 4.

13
TABLEAU 4

Exemple n°	R ₁	F., °C (décomposition)	[α] _D (CHCl ₃)	T(°C)
21	CO(CH ₂) ₄ CH ₃	205 - 210	-178	19
22	COCH ₃	228 - 241	-190	18
5 23	COC ₂ H ₅	222 - 228	-171	21
24	CO(CH ₂) ₂ CH ₃	196 - 201	-165	21
25	COCH(CH ₃) ₂	225 - 232	-140	22
26	COCH=CHCH ₃	215 - 223	-88	22
27	CO(CH ₂) ₃ CH ₃	203 - 208	-178	21
10 28	CO(CH ₂) ₅ CH ₃	195 - 200	-182	19
29	CO(CH ₂) ₆ CH ₃	190 - 195	-173	19
30	CO(CH ₂) ₈ CH ₃	174 - 180	-174	19
31	CO(CH ₂) ₁₆ CH ₃	105 - 110	-131	19
32	CO- 	240 - 245	-188	22
15 33	CO- 	219 - 224	-171	23
34	CO- 	221 - 226	-160	23
35	CO- 	225 - 231	-155	23
36	CO- 	224 - 230	-135	26
37	CO- 	197 - 202	-140	26
20 38	COCH=CH- 	330 - 335	-150	23
39	SO ₂ CH ₃	218 - 225	-172	26

EXEMPLES 40. à 45

Dans un ballon de forme ovoïde, on introduit 40 mg d'éthylate de thallium et on ajoute 2 mg d'éthanol anhydre, puis on agite la solution. On ajoute ensuite 110 mg de TPC-A et 1 ml de tétrahydrofurane anhydre et on agite à température ambiante pendant 3 h; on distille ensuite le solvant sous vide; on obtient le sel de thallium du TPC-A qu'on met en suspension dans 2 ml de tétrahydrofurane anhydre; on ajoute goutte à goutte sous agitation une solution de 20 mg de chlorure de 4-méthylvaléryle dans 1 ml de tétrahydrofurane anhydre. On poursuit l'agitation pendant 2 h, on filtre la substance solide, on soumet le filtrat à distillation sous vide, on lave le résidu par le n-hexane et on purifie par chromatographie sur couche mince. La recristallisation dans le méthanol donne 75 mg du 4-méthylvalérate du TPC-A à l'état de cristaux incolores.

On répète la même opération avec d'autres chlorures d'acide correspondant aux restes énumérés dans le tableau 5, à la place du chlorure de 4-méthylvaléryle; on obtient ainsi les composés correspondants portant le substituant indiqué dans le tableau 5, avec les propriétés physiques des composés.

TABLEAU 5

Exemple n°	R ₁	F., °C (décomposition)	[α] _D (CHCl ₃)	T(°C)
40	CO(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	285 - 292	-181	19
41	CO(CH ₂)— 	205 - 212	-179	19
25 42	COCH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	193 - 198	-164	19
43	COCH(CH ₃)(CH ₂) ₂ CH ₃	195 - 201	-178	19
44	COCH=CH(CH ₂) ₂ CH ₃	268 - 274	-164	20
45	COCH ₂ CH=CHC ₂ H ₅	198 - 203	-183	20

EXEMPLE 46

- i) On dissout 100 mg de TPC-A dans 3 ml d'acide acétique et on ajoute sous agitation une solution de 40 mg de nitrate de cuivre dans 3 ml d'acide acétique. On poursuit l'agitation et, lorsque la coloration de la solution de réaction
5 vire du bleu au vert, on ajoute de l'eau pour arrêter la réaction et on extrait le produit par l'acétate d'éthyle. On lave l'extrait par la saumure saturée et on le sèche sur sulfate de magnésium anhydre, puis on distille le solvant sous vide; on
10 recristallise le produit dans le méthanol; on obtient le dérivé nitré du TPC-A en position α du phénol de ce composé (108 mg) à l'état d'aiguilles cristallines jaunes fondant à 244-250°C (décomposition); $[\alpha]_D^{22} = -232^\circ$ (CHCl_3).
- ii) On traite le produit obtenu en i) ci-dessus par
15 le diazométhane et on recristallise le produit obtenu dans le méthanol; on obtient le dérivé nitré de l'éther méthylique du TPC-A à l'état de cristaux incolores fondant à 225-232°C (décomposition); $[\alpha]_D^{23} = -187^\circ$ (CHCl_3).

EXEMPLE 47

- i) On ajoute sous agitation 90 mg de borohydrure de sodium à 7,5 ml d'eau, on ajoute encore une petite quantité de palladium à 5% sur charbon, puis, goutte à goutte, 130 mg du produit de l'exemple 46(i) dans 15 ml de méthanol. Lorsque la réaction est terminée, on ajoute de l'eau et on extrait le
25 produit par l'acétate d'éthyle. On lave l'extrait à la saumure saturée, on sèche sur sulfate de magnésium anhydre, puis on distille le solvant sous vide; on purifie par chromatographie sur couche mince; on obtient 64 mg du dérivé aminé du composé TPC-A en position α du phénol de celui-ci; ce dérivé fond à 238-243°C
30 (décomposition); $[\alpha]_D^{25} = -199^\circ$ (CHCl_3).
- ii) On traite le produit obtenu dans l'exemple 46(ii) comme décrit ci-dessus sous (i) et on recristallise le produit obtenu dans le méthanol; on obtient le dérivé aminé de l'éther méthylique de TPC-A fondant à 225-231°C (décomposition);
35 $[\alpha]_D^{26} = -198^\circ$ (CHCl_3).

EXEMPLE 48

On dissout 100 mg de l'éther méthylique de TPC-A dans 10 ml de 1,2-diméthoxyéthane anhydre et on ajoute 240 mg de fluoaluminate de potassium et un excès d'iodure de méthyle; on place le mélange à l'obscurité et on poursuit l'agitation à température ambiante pendant une nuit. Lorsque la réaction est terminée, on filtre la solution et on distille le solvant du filtrat sous vide; on purifie le résidu par chromatographie sur couche mince et recristallisation dans le méthanol; on obtient le dérivé N-méthylé de l'éther méthylique de TPC-A (98 mg) à l'état de cristaux incolores fondant à 285-292°C (décomposition; $[\alpha]_D^{27} = -166^\circ$ (CHCl_3)).

EXEMPLE 49

On dissout 225 mg de TPC-A dans 5 ml de DMF anhydre et on ajoute sous agitation et en refroidissant à la glace 11 mg d'hydrure de sodium. On ajoute à la solution par le mode opératoire habituel 187 mg du bromure de l'acétyl-D-glucose obtenu à partir de l'acétyl-D-glucose et on poursuit l'agitation pendant 20 h à la température ambiante. Lorsque la réaction est terminée, on ajoute 50 ml d'acétate d'éthyle et on lave la solution à deux reprises par l'eau glacée (20 ml à chaque fois) et à deux reprises par la saumure saturée (20 ml à chaque fois); on sèche sur sulfate de magnésium anhydre et on distille le solvant sous vide; on obtient environ 300 mg de produit huileux épais blanc ou jaune clair. A la substance huileuse, on ajoute 10 ml d'une solution aqueuse de carbonate de potassium à 5% et 10 ml de méthanol, on porte au reflux à chaud pendant 1 h sous agitation, on ajoute 30 ml d'eau glacée et on extrait à trois reprises par 30 ml d'acétate d'éthyle à chaque fois. On combine les extraits, on lave par 50 ml de saumure, on sèche sur sulfate de magnésium anhydre et on distille le solvant sous vide; on obtient environ 200 mg d'une substance solide blanche qu'on soumet à chromatographie sur une colonne de gel de silice en éluant par un mélange chloroforme/méthanol, 10:0,5, qui élimine la partie soluble puis par un mélange chloroforme/méthanol, 10:2, et on recueille les éluats.

On obtient ainsi 53 mg de dérivé de glucoside du TPC-A fondant à 210-216°C (décomposition); $[\alpha]_D^{25} = -203^\circ$ (EtOH).

Essais sur animaux d'expérience :

On a étudié dans des essais sur animaux l'action antinéoplastique in vivo sur tumeur implantée des composés selon l'invention; on a utilisé comme animaux d'expérience des souris CDF1.

Dans la cavité péritonéale de chaque groupe de souris consistant en six souris CDF1 par groupe, on a implanté $10^6/0,1$ ml de cellules P-388 ou $10^5/0,1$ ml de cellules L-1210. Pendant une durée de 24 h à 5 jours après l'implantation des cellules on a administré la quantité voulue des composés de l'invention par voie intrapéritonéale à des doses de 0,05, 0,5, 2, 4 ou 10 mg/kg. On a implanté de la même manière les cellules P-388 et L-1210 au groupe de souris CDF1 témoin et on les a nourris mais on n'a pas administré les composés. On a observé la différence dans les taux d'apothanasie entre les groupes d'animaux; les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 6 ci-après.

TABLEAU 6

P388

<u>Composé</u>	<u>Rapport essai/témoin, %</u>				
	<u>dose, mg/kg.</u>				
	<u>0,05</u>	<u>0,5</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>10</u>
Témoins	100	100	100	100	100
TPC-A					187,4
Ether méthylique de TPC-A (dose, 0,01)	130,1	156,7	164,2	173,6	
Ex. 2	110,3	137,3	153,5	173,0	
Ex. 3	137,3	165,4	162,2		
Ex. 5	142,4	175,1	105,4		
Ex. 7	122,2	142,7	165,4		
Ex. 8	115,8	144,7	150,1	164,0	

TABLEAU 6 (suite)

P388		Rapport essai/témoin, %				
Composé		Dose, mg/kg				
		0,05	0,5	2	4	10
5	Témoins	100	100	100	100	100
	Ex. 9	136,1	146,8	162,9	152,2	
	Ex. 10	112,5	141,5	150,1	155,4	
	Ex. 16	126,5	162,2	164,3		
10	Ex. 19 (2)	113,8	139,6	141,7	153,1	
	Ex. 20	138,4	164,3	121,1		
	Ex. 21	133,6	143,2	151,6		197,2
	Ex. 22	133,3	155,6	168,9		194,7
	Ex. 23	129,0	145,3	164,4		175,0
15	Ex. 24	125,1	144,2	155,9		170,0
	Ex. 25	124,1	150,7	155,9		183,5
	Ex. 26	124,1	148,5	162,3		186,6
	Ex. 27	117,9	149,5	157,9		171,6
	Ex. 28	113,6	144,0	150,1		
20	Ex. 29	126,7	146,7	166,7		168,9
	Ex. 30	122,0	146,3	151,6		150,6
	Ex. 32	127,8	185,6	175,6		183,3
	Ex. 40	111,6	133,9	152,1		
	Ex. 41	117,9	147,4	158,9		
25	Ex. 42	114,6	140,0	159,2		
	Ex. 43	116,6	142,0	154,2		
	Ex. 44	116,6	150,1	165,3		
	Ex. 45	121,7	145,0	162,3		

Parmi les tests d'orientation servant à confirmer les propriétés antinéoplastiques de certains composés, on utilise deux types d'essais : dans l'un de ces types, il s'agit d'essais "in vitro" dans lesquels on utilise des cellules de carcinome en propagation dans un tube à essai; dans l'autre type, il s'agit d'essais "in vivo" dans lesquels on utilise des animaux sur lesquels on a implanté des cellules de carcinome. Au Japon, l'essai "in vivo" est habituellement réalisé avec la tumeur d'Ehrlich, des cellules L-1210, des cellules de sarcome 180, le sarcome d'Yoshida ou la tumeur ascitique du foie, en tant que tumeur ascitique, et le carcinome immobilisé mentionné ci-dessus en tant que carcinome fixé. Récemment, on a mis au point une nouvelle méthode permettant de confirmer les propriétés antinéoplastiques dans laquelle on utilise des cellules P-388 de leucémie lymphocytaire. Il est connu que les cellules P-388 ont une sensibilité plus forte que les cellules L-1210. Parmi les carcinomes fixés, on peut citer par exemple le cancer du poumon de Lewis, le mélanome B-16, les carcinomes MM2, MOPC 104E, Colon 26, MH 134, C-1498 et analogues.

Dans les essais d'orientation tels que décrits ci-dessus, les composés selon l'invention se sont avérés efficaces à l'égard des cellules P-388. On a en outre constaté que les éthers et esters dérivés de TPC-A étaient efficaces sur les tumeurs ascitiques autres que la tumeur P-388; en particulier, l'ester acétique, l'ester caprique et l'éther n-hexylique du TPC-A se sont également avérés efficace contre le mélanome B-16 et le carcinome MM2 (cf. tableau 7).

TABLEAU 7

Composé	Dose mg/kg	P388 (i.p. - i.p.)		L1210 (i.p. - i.p.)		B16 (i.p. - i.p.)		MM2 (i.p. - i.p.)	
		Essai/témoin, %		Essai/témoin, %		Essai/témoin, %		Essai/témoin, %	
Ether méthyllique du TRC-A	0,01	130,1		105,6		-		-	
	0,5	156,7		118,6		133,8 (0,25mg/kg)		103,1 (0,2mg/kg)	
	1	159,9 (IT=400)		120,7		135,3		103,1	
	2	164,2		129,3		139,1		118,4	
	4	173,6		137,3 (5mg/kg)		143,0		90,8 (5mg/kg)	
de l'exemple 22	0,05	133,3		100,9		-		-	
	0,5	155,6		110,0		116,9		102,5	
	2	168,9 (IT=278)		114,4		128,5		109,2	
	5	175,8		120,0		147,8 (4mg/kg)		117,8	
	10	194,7		128,9		141,1 (8mg/kg)		120,9	
de l'exemple 2	0,05	130,4		-		-		-	
	0,5	143,5		115,6		130,5		110,3	
	2	150,0 (IT=100)		126,6		158,2		129,3 (3/6 60<)	
	4	-		130,9		136,2		161,8 (1/7 60<)	
	5	176,1		-		-		-	
de l'exemple 21	0,01	133,7		-		-		-	
	0,1	135,9		-		-		-	
	0,5	- (IT=200)		115,6		143,5		112,1	
	2	152,2		126,6		152,0		127,3 (2/6 60<)	
	5	-		67,3 (10mg/kg)		165,5		93,9 (10mg/kg)	

IT = indice thérapeutique.

Essai de toxicité :

On a déterminé la dose létale des composés de l'invention de la manière suivante :

On a utilisé comme animaux d'expérience des souris mâles CD-1 (ICR) de 4 semaines, à raison de 5 à 10 animaux par groupe; on a mis la quantité voulue de chaque composé de l'invention en suspension dans une solution de carboxyméthylcellulose à 0,5% et on a administré la suspension à chaque souris par voie intrapéritonéale ou intraveineuse. En comptant les animaux survivants et morts et en observant les symptômes généraux durant 7 jours après l'administration des composés, on a estimé la valeur de DL_{50} pour chaque composé à partir de la population létale observée sur la base de la méthode de Litchfield-Wilcoxon. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 8.

TABLEAU 8

Mode d'administration	DL_{50} et limite de confiance 95% (mg/kg)		
	TPC-A	Ether méthyl-lique de TPC-A	Ester acétique de TPC-A
Intrapéritonéal	16,0(13,3-19,3)	10,0(7,0-14,3)	18,4(16,9-20,0)
Intraveineuse	34,0(28,1-41,2)	16,5(12,6-21,5)	20,0(15,2-28,3)

Les résultats rapportés dans le tableau 8 montrent que les valeurs de DL_{50} pour les composés énumérés sont plus basses par administration intrapéritonéale que par administration intraveineuse. Il s'agit d'une tendance tout à fait différente de celle observée avec les médicaments usuels.

Etude d'autres effets pharmacologiques.

Les essais sur animaux décrits ci-dessus montrent que chaque composé de l'invention possède une activité antinéoplasique.

On a procédé à d'autres essais dans lesquels on a mis en évidence d'autres effets pharmacologiques des composés de l'invention.

On a administré chaque composé de l'invention par voie intrapéritonéale à des souris CD-1 (IRC) de 4 semaines

(Nippon Charles Liver K.K) à la dose de 1 à 20 mg/kg, en utilisant des groupes consistant en trois souris chacun. Toutes les 30 min après administration du composé et pendant 180 min au total, on a observé les symptômes ressentis par les souris. L'observation a été faite selon la méthode d'Arwin modifiée et la méthode de Smith, c'est-à-dire une méthode d'observation neuropharmacologique multidimensionnelle.

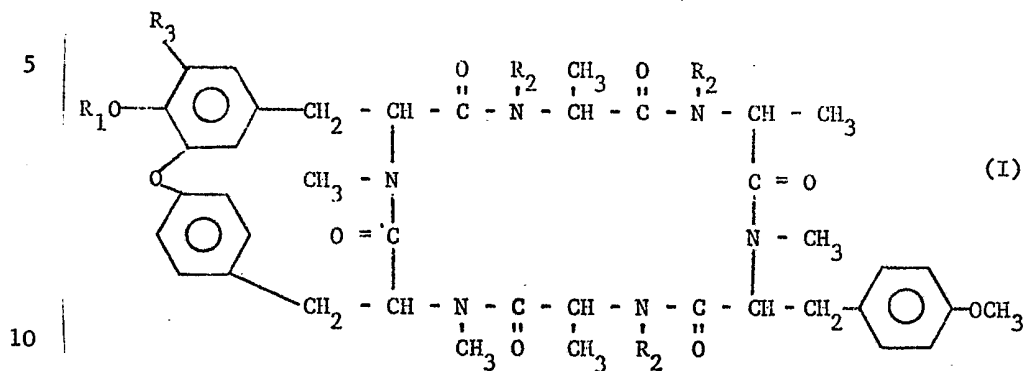
En établissant une comparaison entre le symptôme observé et le modèle de l'action pharmacologique due à des médicaments connus, on a trouvé que chaque composé de l'invention présentait l'effet pharmacologique suivant :

TABLEAU 9

<u>Composé</u>	<u>Effet pharmacologique estimé</u>
15 TPC-A	Action émétique, action anorexigène, action psychotrope, action vasoconstrictrice, action papavérinique, action antiparkinsonienne
Ether méthylique de TPC-A	Action émétique, action anorexigène
20 Ester acétique de TPC-A	Action émétique, action psychotrope, action antidiurétique.

REVENDICATIONS

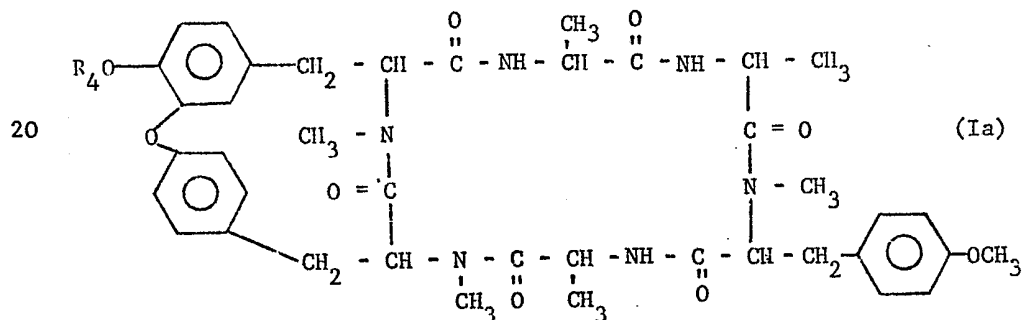
1 - Composés, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule générale (I) :



dans laquelle R_1 représente un atome d'hydrogène, un groupe acyle, un groupe alkyle, cycloalkyle, carboxyalkyle éventuellement à l'état d'ester, un groupe hétérocyclique ou un reste de sucre, R_2 représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle inférieur et

15 R_3 représente un atome d'hydrogène ou un groupe azoté.

2 - Composés selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule générale (Ia)



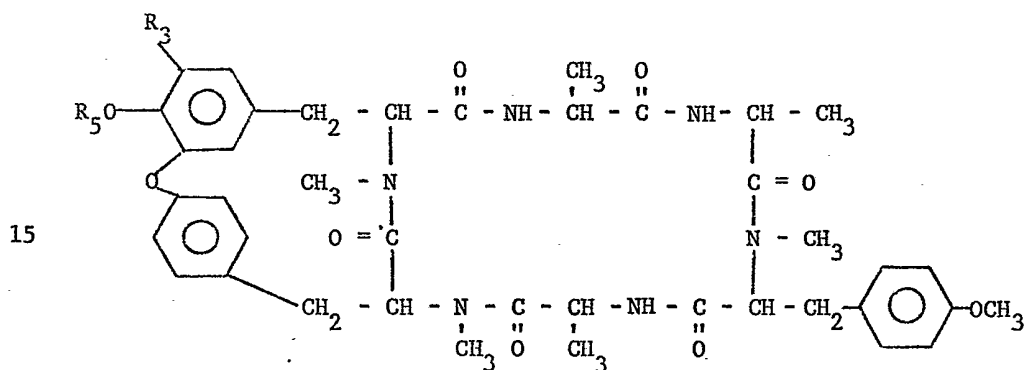
dans laquelle R_4 représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle.

25

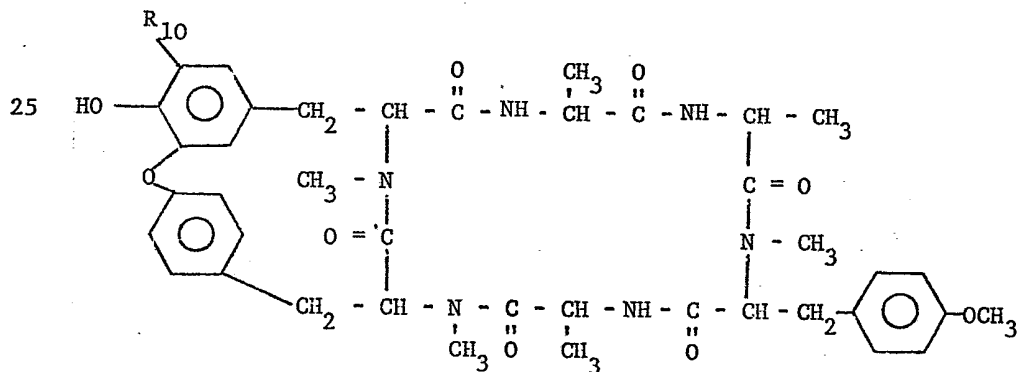
3 - Procédé de préparation des composés de formule générale (Ia) selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on extrait une plante *Rubia* spp. par un solvant, on concentre l'extrait et on soumet l'extrait brut à chromatographie
5 afin d'isoler et de purifier les composants extraits de la plante.

4 - Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le solvant servant à l'extraction est le méthanol, l'éthanol, le chloroforme ou l'acétate d'éthyle.

5 - Procédé de préparation des composés selon la
10 revendication 1, répondant à la formule générale :



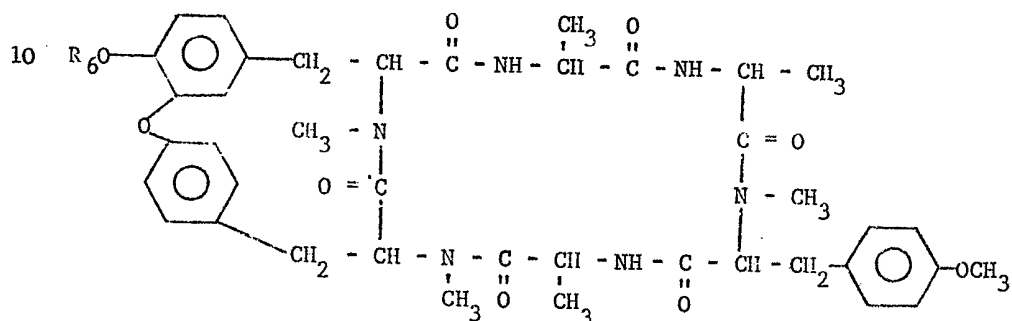
dans laquelle R_5 représente un groupe alkyle, cycloalkyle, carboxy-alkyle éventuellement à l'état d'ester ou un groupe hétérocyclique
20 et R_3 représente l'hydrogène ou un groupe azoté,
ce procédé se caractérisant en ce que l'on fait réagir un composé répondant à la formule



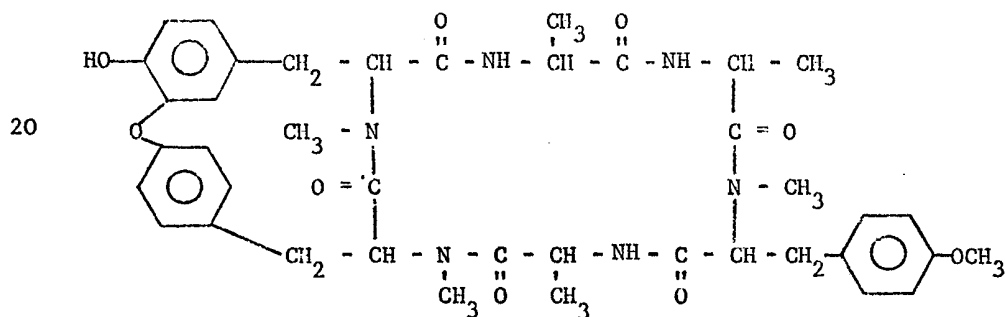
dans laquelle R_{10} représente un atome d'hydrogène ou un groupe nitro, avec un agent alkylant et, lorsque R_{10} représente un groupe nitro, on réduit le produit alkylé.

6 - Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'agent alkylant est le diazométhane, le dihydropyranne ou un halogénure d'alkyle ou sulfate de diméthyle.

7 - Procédé de préparation des composés selon la revendication 1, répondant à la formule générale :



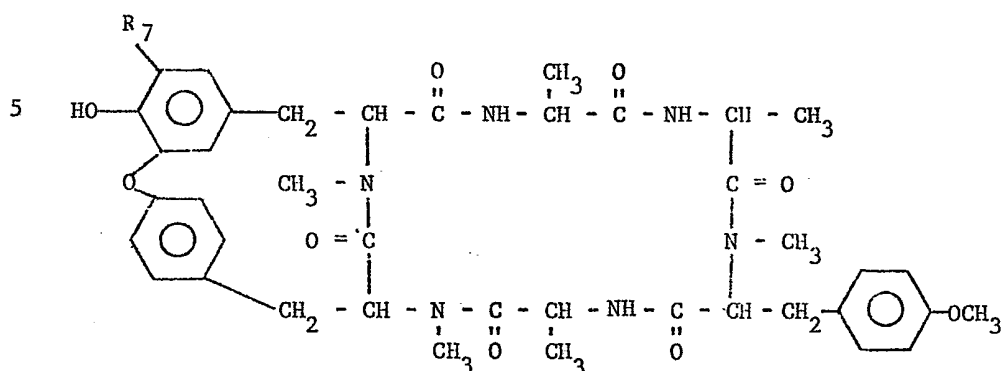
15 dans laquelle R_6 représente un groupe acyle, ce procédé se caractérisant en ce que l'on fait réagir un composé répondant à la formule :



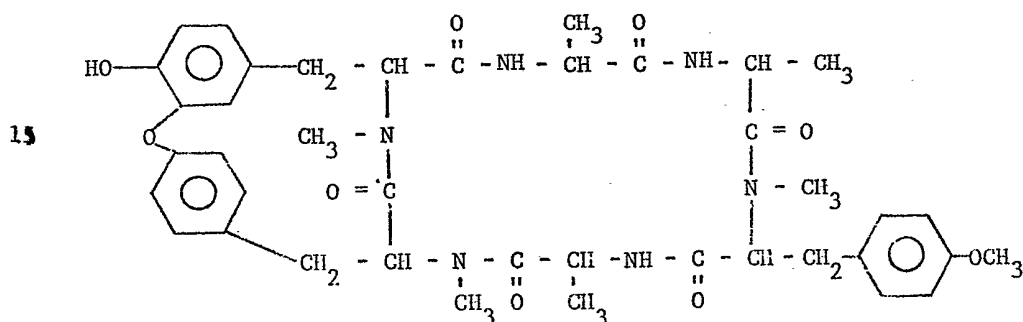
avec un agent acylant.

8 - Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'agent acylant est un chlorure d'acyle ou un anhydride d'acide.

9 - Procédé de préparation des composés selon la revendication 1, répondant à la formule générale



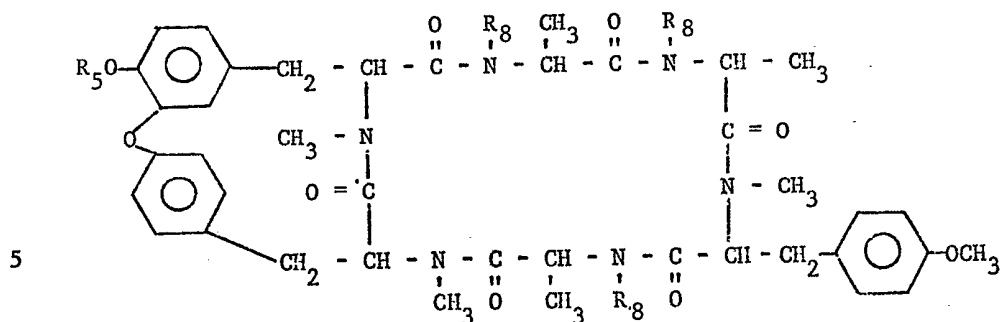
10 dans laquelle R_7 représente un groupe azoté, ce procédé se caracté-
risant en ce que l'on soumet un composé répondant à la formule :



à la nitration, après quoi, si on le désire, on réduit le composé
20 nitré.

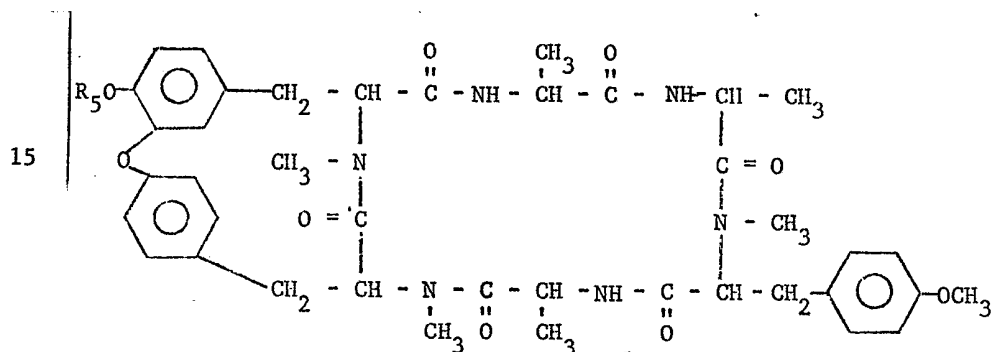
10 - Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'on utilise un agent nitrant modéré comme le nitrate de cuivre.

11 - Procédé de préparation des composés selon la
25 revendication 1 répondant à la formule générale



dans laquelle R_5 représente un groupe alkyle, carboxyalkyle éventuellement à l'état d'ester ou un groupe hétérocyclique et l'un au moins des symboles R_8 représente le groupe méthyle et les autres l'hydrogène,

10 ce procédé se caractérisant en ce que l'on fait réagir un composé de formule



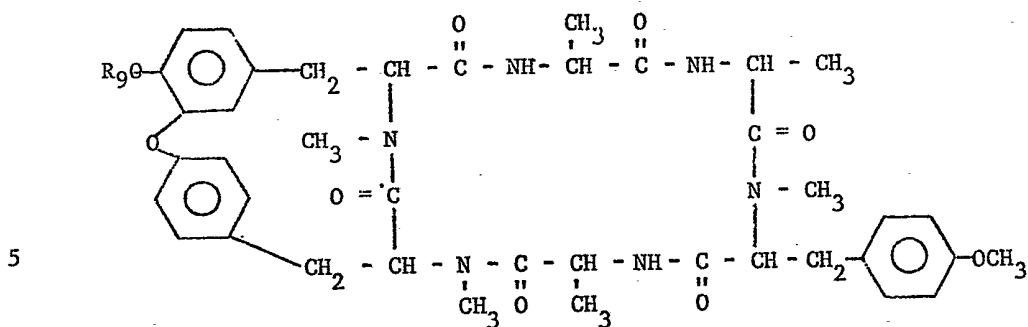
dans laquelle R_5 a la signification indiquée ci-dessus, avec un agent méthylant.

20

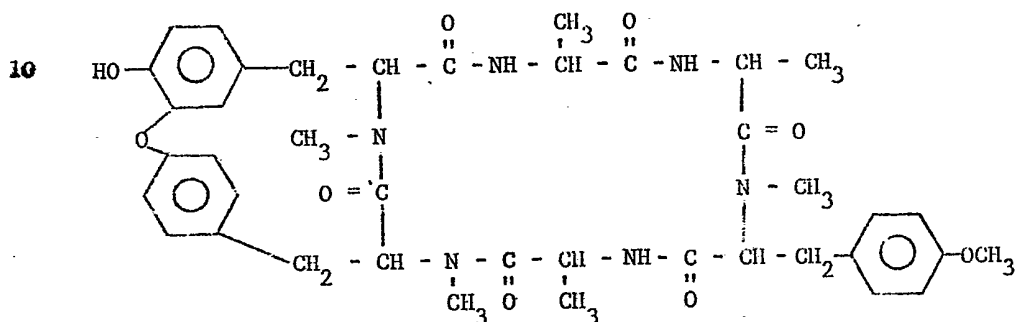
12 - Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'agent méthylant est le diazométhane, le sulfate de diméthyle ou un halogénure de méthyle.

13 - Procédé de préparation des composés selon la revendication 1 répondant à la formule générale

25



dans laquelle R_9 représente un reste de sucre, ce procédé se caractérisant en ce que l'on fait réagir un composé répondant à la formule :



15 avec un reste de sucre activé et protégé, après quoi on élimine le groupe protecteur.

14 - Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que le reste de sucre est un reste de glucose, de galactose, de rhamnose, de fructose ou de xylose.

20 15 - A titre de médicaments nouveaux, utiles notamment en tant qu'agents antinéoplastiques, les composés selon la revendication 1.

16 - Compositions thérapeutiques contenant en tant que composant actif au moins un composé selon la revendication 1.

25 17 - Formes d'administration des compositions thérapeutiques selon la revendication 16.

FIG. 1

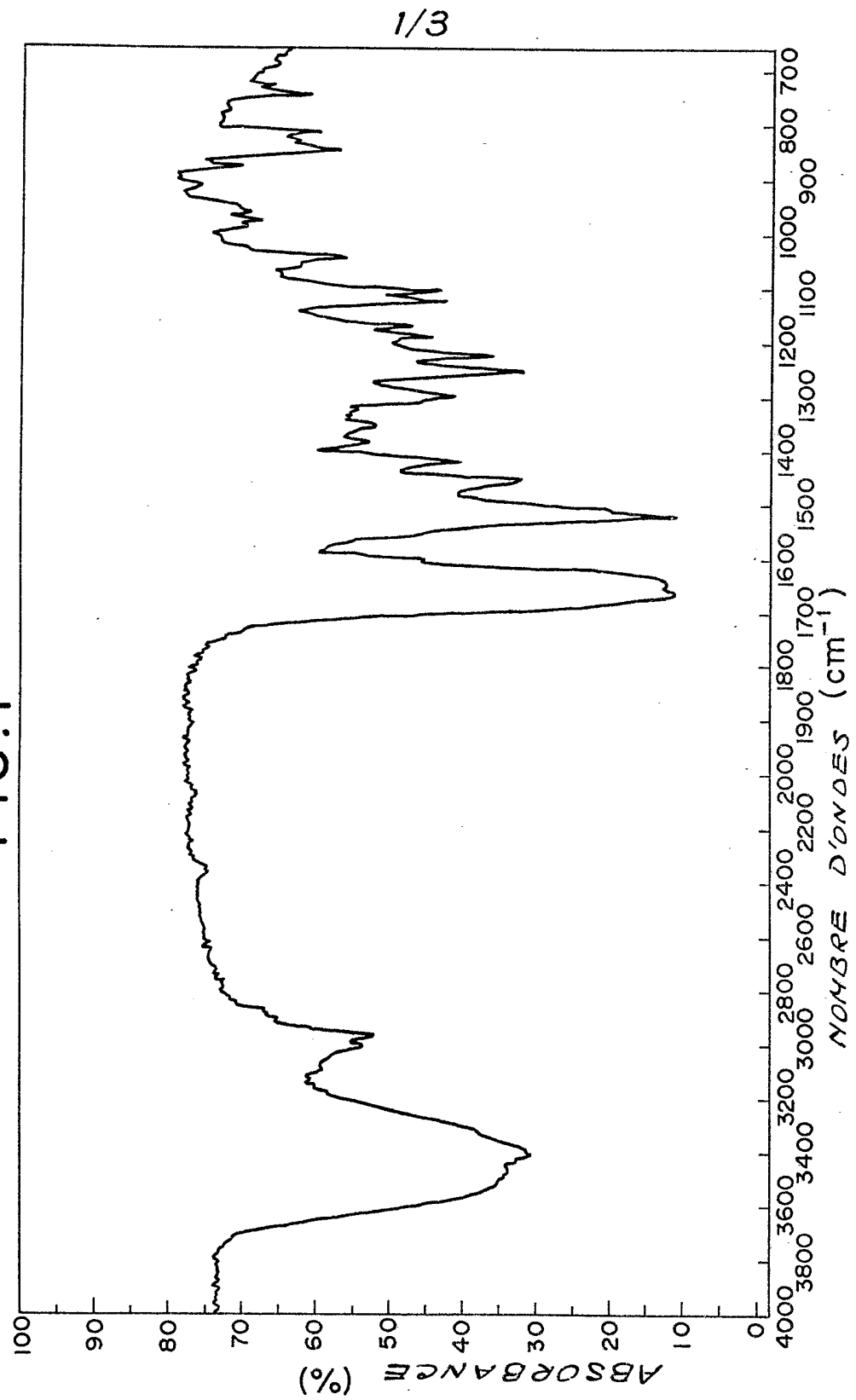


FIG. 2

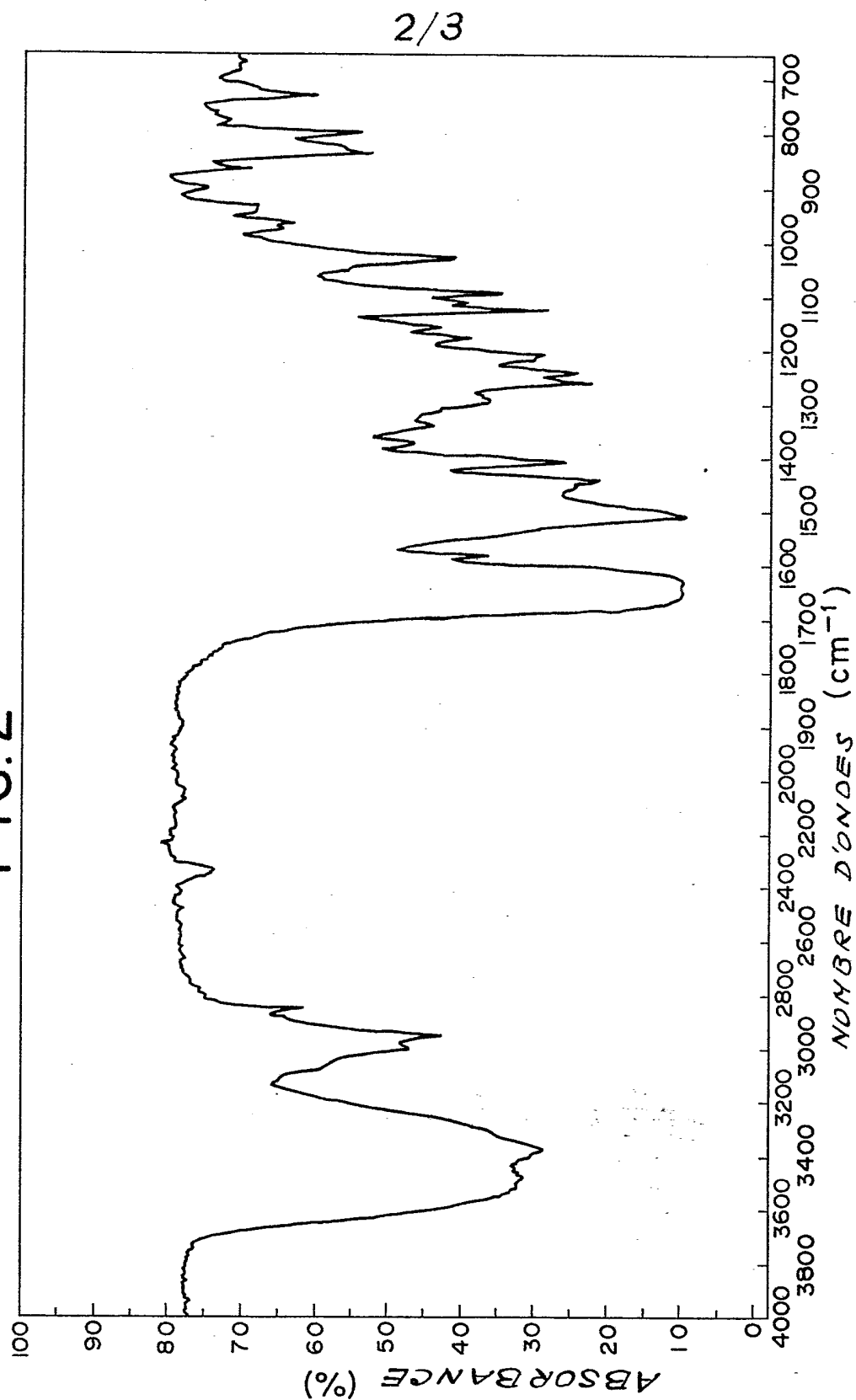


FIG. 3

