

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
18 novembre 2004 (18.11.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/099193 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07D 405/12

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/001012

(22) Date de dépôt international : 27 avril 2004 (27.04.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
03/05389 30 avril 2003 (30.04.2003) FR

(71) Déposant : AVENTIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR).

(72) Inventeurs: MAILLIET, Patrick; 87, rue Dalayrac, F-94120 Fontenay sous Bois (FR). THOMPSON, Fabienne; 25, rue Cotte, F-75012 Paris (FR). BERTIN, Luc; 6, allée Gustave Caillebotte, F-91560 Crosnes (FR). LECLERE, Gérard; 97, avenue d'Estienne d'Orves, F-92160 Antony (FR). TIRABOSCHI, Gilles; 31, rue Albert Thuret, F-94550 Chevilly Larue (FR).

(74) Mandataire : RABOIN, Jean-Christophe; AVENTIS PHARMA S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

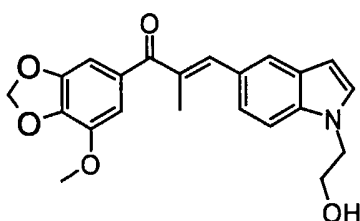
Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: 1-ARYL-3-(INDOL-5-YL)-PROP-2-EN-1-ONES, COMPOSITIONS COMPRISING THE SAME AND USE THEREOF

(54) Titre : 1-ARYL-3-(INDOL-5-YL)-PROP-2-EN-1-ONES, COMPOSITIONS LES CONTENANT ET UTILISATION



(I)

(57) Abstract: The invention relates to 1-aryl-3-(indol-5-yl)-prop-2-en-1-ones, compositions comprising the same and use thereof. The invention particularly relates to novel substituted 1-aryl-3-(indol-5-yl)-prop-2-en-1-ones with a therapeutic activity, of use, in particular, in oncology.

(57) Abrégé : 1-Aryl-3-(indol-5-yl)-prop-2-èn-1-ones, compositions les contenant et utilisation. La présente invention concerne notamment de nouvelles 1-aryl-3-(indol-5-yl)-prop-2-èn-1-ones substituées ayant une activité thérapeutique, utilisables en particulier en oncologie.

1-ARYL-3-(INDOL-5-YL)-PROP-2-EN-1-ONES, COMPOSITIONS LES CONTENANT ET UTILISATION

La présente invention concerne de nouveaux composés chimiques, particulièrement de nouvelles 1-aryl-3-(indol-5-yl)-prop-2-èn-1-ones, les
5 compositions les contenant, et leur utilisation comme médicaments.

Plus particulièrement, l'invention concerne de nouvelles 1-aryl-3-(indol-5-yl)-prop-2-èn-1-ones spécifiques présentant une activité anticancéreuse, et en particulier une activité inhibitrice de polymérisation de la tubuline.

Les 1-aryl-3-(indol-5-yl)-prop-2-èn-1-ones représentent une sous-classe de la
10 famille des chalcones, dans laquelle un noyau phényle a été remplacé par un indole. D'une manière générale, les chalcones sont largement décrites dans la littérature depuis plus d'un siècle. Cependant, bien que plusieurs centaines de publications traitent d'applications thérapeutiques des chalcones, peu d'entre elles évoquent leur utilisation en oncologie.

15 On peut citer parmi les documents décrivant l'utilisation des chalcones en oncologie les brevets et publications suivants :

- WO 01/72980, divulgue des chalcones substituées présentant une activité anticancéreuse et anti-inflammatoire.
- WO 99/22728, revendique notamment, et de manière générique, des
20 chalcones substituées, pour inhiber l'activité 5 α -réductase vis-à-vis d'hormones stéroïdiennes, en vue du traitement de pathologies telles que l'alopécie, la calvitie, l'obésité, des maladies de la peau, le cancer de la prostate, le cancer du sein.
- WO 99/00114, revendique l'utilisation de chalcones dont la chaîne prop-2-
25 èn-1-one peut être saturée ou non.
- WO 98/58913, présente des chalcones dérivées de 1-(2-hydroxyphényl),3-aryl-prop-2-èn-1-one ayant une activité antiproliférative.

- EP 288794-B1, revendique l'utilisation en oncologie de 1-(aryl),3-(4-X-phényl)-prop-2-èn-1-ones où X représente un substituant NR_2 ou NHCOR , avec $\text{R}=\text{alkyle}$.

5 - WO 91/17749, revendique une méthode de traitement du cancer utilisant notamment des chalcones. Ces chalcones sont décrites et revendiquées de manière très générale.

- Michael L. Edwards *et al.*, article paru dans *J. Med. Chem.* 1990, vol. 33, pp 1948-1954, présentent des chalcones utilisables comme agents antimitotiques. Des chalcones sont présentées et testées *in vitro* sur des
10 lignées cellulaires cancéreuses.

- Sylvie Ducki *et al.*, article paru dans *Bioorg. Med. Chem. Letters* 1988, vol. 8, pp 1051-1056, présentent des chalcones ayant une activité antimitotique. Leur étude est basée sur les travaux de Michael L. Edwards *et al.*, cités précédemment. Les auteurs observent que le remplacement d'un substituant
15 4-N,N-diméthylamino par des substituants 4-méthoxy et 3-hydroxy améliore considérablement l'activité antimitotique, notamment vis-à-vis de cellules K562.

Or, de façon surprenante, il a été trouvé que des produits présentant le motif 1-aryl-3-(indol-5-yl)-prop-2-èn-1-ones présentent une activité inhibitrice de
20 polymérisation de la tubuline importante.

De plus, ces produits induisent de la nécrose *in vivo* de façon très importante, ce qui est un résultat très favorable en vue développement ultérieur de médicaments efficaces pour le traitement de cancers.

Ensuite, il a été observé qu'avec les produits de l'invention, la nécrose de la
25 tumeur survient dans les minutes qui suivent l'injection du produit testé, et que le cœur de la tumeur est totalement détruit en moins d'une journée, sans effet apparent sur les cellules saines voisines. Ces produits pourraient dès lors être utiles pour traiter des patients souffrant de tumeurs inopérables, c'est-à-dire dont l'ablation par voie chirurgicale présente un risque très

important (i) pour la survie immédiate du patient, ou (ii) pour les conséquences possibles sur sa qualité de vie (invalidation).

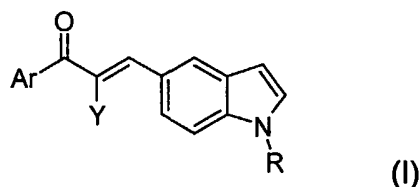
Enfin, les produits de l'invention, sont généralement rapidement métabolisés par l'organisme, ce qui limite leur effet à long terme.

- 5 Un autre problème qui s'est posé consistait à obtenir des produits présentant tous les avantages précédemment décrits sans les inconvénients fréquemment rencontrés lors de l'étude de produits de la famille des chalcones. Ces inconvénients sont (i) les problèmes de toxicité cardiaque, évaluable en particulier en mesurant l'inhibition de récepteurs Herg, (ii)
- 10 enfin, et dans une moindre mesure, les problèmes de mutagénicité, évaluable en particulier dans le test d'Ames.

Il convient de noter que, jusqu'à présent, la demanderesse a effectué un effort important de recherche dans le domaine susmentionné et qu'à sa

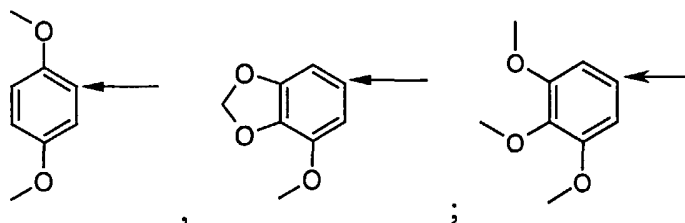
- 15 connaissance, elle n'a pu identifier que deux très petites familles de produits répondant simultanément à tous ces critères.

Ces produits répondent à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

- 20 a) Y est sélectionné dans le groupe constitué par halogène, méthyle,
b) Ar est sélectionné dans le groupe constitué par :



- c) R représente :

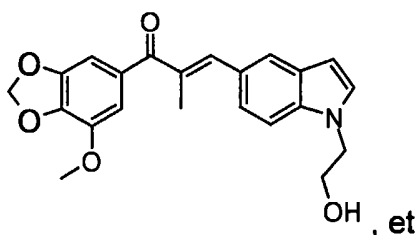
—CH₂—CH₂—OH.

Les produits selon l'invention incluent les isomères. Parmi les isomères, les isomères Z et les isomères E font partie de l'invention. Les isomères E sont préférés.

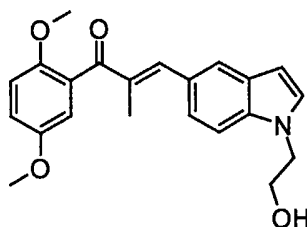
De préférence Y est CH₃.

- 5 Enfin, au sein de cette famille, deux produits se distinguent par leurs qualités remarquables, notamment en raison de leurs avantages additionnels vis-à-vis de problèmes de solubilité, qui sont résolus habituellement et de manière insatisfaisante par la préparation de prodrogues ou de formulations galéniques pouvant induire des effets secondaires importants.
- 10 Ces deux produits sont :

- la E-2-méthyl-3-[1-(2-hydroxyéthyl)-1-H-indol-5-yl]-1-(3,4,5-triméthoxyphényl)-propènone :



- la E-2-méthyl-3-[1-(2-hydroxyéthyl)-1-H-indol-5-yl]-1-(2,5-diméthoxyphényl)-propènone :
- 15



Les produits selon l'invention sont avantageusement valorisés par leur préparation sous la forme d'une composition pharmaceutique, en combinaison avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Un produit conforme à l'invention pourra être utilisé pour la fabrication d'un médicament utile pour traiter un état pathologique, en particulier un cancer.

La présente invention concerne aussi les compositions thérapeutiques contenant un composé selon l'invention, en association avec un excipient pharmaceutiquement acceptable selon le mode d'administration choisi. La composition pharmaceutique peut se présenter sous forme solide, liquide ou de liposomes.

Parmi les compositions solides on peut citer les poudres, les gélules, les comprimés. Parmi les formes orales on peut aussi inclure les formes solides protégées vis-à-vis du milieu acide de l'estomac. Les supports utilisés pour les formes solides sont constitués notamment de supports minéraux comme les phosphates, les carbonates ou de supports organiques comme le lactose, les celluloses, l'amidon ou les polymères. Les formes liquides sont constituées de solutions de suspensions ou de dispersions. Elles contiennent comme support dispersif soit l'eau, soit un solvant organique (éthanol, NMP ou autres) ou de mélanges d'agents tensioactifs et de solvants ou d'agents complexants et de solvants.

Les formes liquides seront de préférence injectables et, de ce fait, auront une formulation acceptable pour une telle utilisation.

Des voies d'administration par injection acceptables incluent les voies intraveineuse, intra-péritonéale, intramusculaire, et sous cutanée, la voie intraveineuse étant préférée.

La dose administrée des composés de l'invention sera adaptée par le praticien en fonction de la voie d'administration du patient et de l'état de ce dernier.

Les composés de la présente invention peuvent être administrés seuls ou en mélange avec d'autres anticancéreux. Parmi les associations possibles on peut citer :

- les agents alkylants et notamment le cyclophosphamide, le melphalan, l'ifosfamide, le chlorambucil, le busulfan, le thiotepa, la prednimustine, la carmustine, la lomustine, la semustine, la steptozotocine, la decarbazine, la témozolomide, la procarbazine et l'hexaméthylmélamine
- les dérivés du platine comme notamment le cisplatine, le carboplatine ou l'oxaliplatine
- les agents antibiotiques comme notamment la bléomycine, la mitomycine, la dactinomycine
- les agents antimicrotubules comme notamment la vinblastine, la vincristine, la vindésine, la vinorelbine, les taxoides (paclitaxel et docétaxel)
- les anthracyclines comme notamment la doxorubicine, la daunorubicine, l'idarubicine, l'épirubicine, la mitoxantrone, la losoxantrone
- les topoisomérases des groupes I et II telles que l'étoposide, le teniposide, l'amsacrine, l'irinotecan, le topotecan et le tomudex
- les fluoropyrimidines telles que le 5-fluorouracile, l'UFT, la floxuridine
- les analogues de cytidine telles que la 5-azacytidine, la cytarabine, la gemcitabine, la 6-mercaptopurine, la 6-thioguanine
- les analogues d'adénosine telles que la pentostatine, la cytarabine ou le phosphate de fludarabine
- le méthotrexate et l'acide folinique
- les enzymes et composés divers tels que la L-asparaginase, l'hydroxyurée, l'acide trans-rétinoïque, la suramine, la

dexrazoxane, l'amifostine, l'herceptin ainsi que les hormones oestrogéniques, androgéniques

- les agents antivasculaires tels que les dérivés de la combretastatine ou de la colchicine et leurs prodrogues.

- 5 Il est également possible d'associer aux composés de la présente invention un traitement par des radiations. Ces traitements peuvent être administrés simultanément, séparément, séquentiellement. Le traitement sera adapté par le praticien en fonction du malade à traiter.

- Un produit conforme à l'invention pourra favoriser la désagrégation d'amas de
10 cellules provenant d'un tissu vasculaire. Plus particulièrement, les produits de la présente invention seront utilisés dans leur première application thérapeutique pour inhiber la croissance des cellules cancéreuses et en même temps la destruction des vaisseaux existants. L'inhibition de la vascularisation est déterminée par un test de détachement cellulaire tel que
15 décrit ci-après.

Test permettant de déterminer l'inhibition de la vascularisation

- Un test de détermination du détachement des cellules endothéliales a été établi afin de sélectionner les produits sur la base de leur activité «in vitro». Ce test de détermination du détachement des cellules endothéliales est
20 caractérisé en ce que les cellules endothéliales, ensemencées dans des plaques dont le fond est recouvert d'un agent liant choisi de préférence parmi la gélatine, la fibronectine ou la vitronectine, après culture, sont additionnées par un milieu contenant le composé à tester, puis les cellules sont marquées avec une substance fluorescente, les cellules qui se sont détachées sont
25 éliminées par lavage et la fluorescence des cellules restantes est comptée au fluorimètre.

Ce test consiste à mesurer le détachement des cellules endothéliales cultivées sur des substrats à base d'un agent liant choisi de préférence parmi

la fibronectine, la vitronectine ou la gélatine. De préférence un jour après l'ensemencement des cellules en plaques contenant par exemple 96 puits, le milieu de culture est remplacé par un milieu contenant le composé à tester en absence de sérum. On prépare six fois la même préparation à trois concentrations différentes (0.1, 0.3 et 0.6 μ M) et six fois le contrôle sans adjonction de produit antivasculaire. Après deux heures de traitement avec la substance à tester, les cellules sont marquées avec la calcéine-AM (1.6 μ g/ml) dans du milieu de culture supplémenté avec 0.1 % de BSA. Les cellules qui se sont détachées sont éliminées par lavage avec le milieu de culture contenant 0.1 % de sérum albumine bovine ; on ajoute 100 μ l de milieu à chaque puits. La fluorescence des cellules restantes est comptée au fluorimètre. Les données obtenues sont exprimées par rapport au témoin (cellules non traitées).

L'évaluation du détachement des cellules endothéliales *in vitro* est déterminée de la façon suivante. Les cellules HDMEC (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells, Promocell, c-122102) sont cultivées dans un milieu ECGM-MV qui contient 5 % de sérum de veau fœtal, des facteurs de croissance (EGF 10 ng/ml, hydrocortisone 1 μ g/ml, 0.4 % supplément de croissance avec héparine) et des antibiotiques (amphotéricine 50 ng/ml, gentamicine 50 μ g/ml). Pour le test de détachement, les HDMEC sont ensemencées à 5,000 cellules dans des plaques 96 puits à fond clair (Costar) pré-coatées avec de la fibronectine (10 μ g/ml) ou de la vitronectine (1 μ g/ml) ou de la gélatine. Vingt quatre heures plus tard, le milieu de culture est remplacé par du milieu ECGM-MV 0.1 % BSA contenant les produits indiqués. Les concentrations testées sont 0,1-0,3 et 1 μ M pour chaque produit. Après deux heures de traitement, les cellules sont marquées pendant une heure à la calcéine (1.6 μ g/ml, Molecular Probes) dans du milieu ECGM-MV 0.1 % BSA. Les cellules détachées sont ensuite enlevées par lavage avec du milieu ECGM-MV 0.1 % BSA; 100 μ l de milieu est ajouté à chaque puits. La fluorescence des cellules qui restent attachées au substratum du puits est comptée à l'aide d'un fluorimètre, Spectrafluor Plus (Tecan,

excitation 485 nm, et émission 535 nm). Les données sont la moyenne de six échantillons différents et sont exprimées en pourcentage du contrôle (cellules non traitées).

Un effet de détachement cellulaire supérieur ou égal à 15 % est considéré
5 comme significatif.

Un produit conforme à l'invention pourra être utile pour inhiber la polymérisation de la tubuline. Une inhibition de la tubuline pourra être effectuée *in-vitro*. Un exemple de méthode d'inhibition de la tubuline *in-vitro* est décrit ci-après.

10 Evaluation de l'inhibition de polymérisation de tubuline

La tubuline est purifiée à partir de cerveaux de porc selon des méthodes publiées (Shelanski et al., 1973, Proc. Natl. Acad. Sci.USA, **70**, 765-768. Weingarten et al., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci.USA, **72**, 1858-1862).
Brièvement, les cerveaux sont broyés et centrifugés dans un tampon
15 d'extraction. La tubuline, contenue dans le surnageant de l'extrait subit deux cycles successifs de polymérisation à 37°C et dépolymérisation à 4°C, avant d'être séparée des MAPs (Microtubule Associated Proteins) par chromatographie sur colonne de phosphocellulose P11 (Whatman). La tubuline, ainsi isolée est pure à plus de 95 %. Elle est conservée dans un
20 tampon nommé RB/2 30 % glycérol, dont la composition est MES-NaOH [acide 2-(N-morpholino)-éthanesulfonique] 50 mM, pH6.8 ; MgCl₂ 0.25 mM ; EGTA 0.5 mM ; glycérol 30 % (v/v), GTP (guanosine-5'-tri-phosphate) 0.2 mM.

La polymérisation de la tubuline en microtubules est suivie par turbidimétrie
25 comme suit : la tubuline est ajustée à une concentration de 10 µM (1 mg/ml) dans le tampon RB/2 30 % glycérol auquel on ajoute 1mM GTP et 6mM MgCl₂. La polymérisation est déclenchée par une augmentation de la température de 6°C à 37°C dans une cuve de 1 cm de trajet optique, placée

dans un spectrophotomètre UVIKON 931 (Kontron) équipé d'un porte cuve thermostaté. L'augmentation de la turbidité de la solution est suivie à 350 nm.

Les produits sont mis en solution à 10 mM dans le DMSO et ajoutés à des concentrations variables (0.5 à 10 μ M) à la solution de tubuline avant polymérisation. La CI_{50} est définie comme la concentration de produit qui
5 inhibe de 50 % la vitesse de polymérisation. On considère comme très actif un produit dont la CI_{50} est inférieure ou égale à 3 μ M.

Evaluation de l'inhibition de prolifération de cellules tumorales HeLa ou de cellules endothéliales HDMEC :

10 On évalue la prolifération des cellules HeLa ou HDMEC en mesurant l'incorporation de [14 C]-thymidine de la façon suivante. Les cellules HeLa (cellules épithéliales tumorale d'origine humaine) sont cultivées dans un milieu DMEM (Gibco) qui contient 10 % de sérum de veau fœtal et des antibiotiques (pénicilline 1 %, streptomycine 1 %). Pour effectuer le test de
15 prolifération, on ensemence les cellules dans des microplaques cytoStar 96 puits (Amersham), à raison de 5000 cellules par puits. On ajoute ensuite la [14 C]-thymidine (0.1 μ Ci/puits) et les produits à évaluer. On utilise des concentrations variables de produits jusqu'à 10 μ M ; le DMSO (solvant utilisé pour solubiliser les produits) ne doit pas excéder 0.5 % dans le milieu. 48
20 heures après incubation à 37°C, on mesure la radioactivité incorporée dans les cellules par comptage de la plaque dans un compteur TRI-LUX (Wallac). La CI_{50} est définie comme la concentration de produit qui diminue de 50 % la radioactivité par rapport à un contrôle non traité. On considère qu'un produit dont la CI_{50} est inférieure à 1 μ M est cytotoxique

25 Evaluation de la nécrose tumorale *in vivo*

Des souris sont élevées soit par IFFA-CREDO (Domaine des Oncins, 69210 L'Arbresle, France) à partir d'une race obtenue par Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA, ou bien par Charles River France (76410 St Aubin lès Elbeuf, France) à partir d'une race obtenue par Charles River, USA. Les

souris pèsent initialement plus de 18 g au début de l'essai. Elles ont un accès libre à la nourriture (UAR reference 113, Villemoisson, 91160 Epinay sur Orge, France) et à l'eau.

Les tumeurs utilisées sont actuellement transplantées dans nos laboratoires.

- 5 Toutes ces tumeurs sont au Frederick Cancer Research Facility (Frederick, MD, USA) au dépôt de tumeurs congelées du National Cancer Institute (NCI), ou à l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA).

- Les techniques de transplantation de tumeur, la chimiothérapie et l'analyse de données, ont été présentées en détail (Corbett *et al.*, 1982a; Corbett *et al.*,
10 1982b).

Pour résumer, les animaux nécessaires pour une expérience sont rassemblés et implantés bilatéralement au jour 0 (zéro).

- La croissance des tumeurs solides se développe librement jusqu'à la taille désirée. Les souris sont alors traitées par injection intraveineuse d'un
15 composé test en solution.

L'échantillonnage de tumeurs s'effectue habituellement (mais pas nécessairement) 24 heures après le traitement.

- Les souris sont tuées par dislocation cérébrale. Les tumeurs implantées, ainsi que la peau les recouvrant et les tissus à proximité sont collectés et
20 conservés dans du formaldéhyde 10 % (v/v) (Carlo Erba, Val de Reuil, France).

- Les échantillons sont ensuite traités, sectionnés, colorés avec de l'hématoxyline, de l'éosine et du jaune safran, puis sont examinés macroscopiquement. La nécrose tumorale (nécrose $\pm$ dégénération) est
25 évaluée microscopiquement en utilisant une échelle d'importance de 0 à 5 :

- 0 = absence de nécrose ;
1 = minimale, <5% ;
2 = faible, 5-25% ;
3 = modérée, 25-50% ;
30 4 = prononcée, 50-75% ;

5 = importante, >75%).

Les valeurs assignées à la nécrose tumorale 24 heures après administration du composé testé correspondent uniquement à une nécrose dépendant du produit pouvant être différenciée avec certitude de n'importe quelle nécrose existante provenant de l'expérience.

La nécrose due à l'expérience a été évaluée sur un contrôle non traité.

Le modèle de tumeur est un adénocarcinome murin C51. Cette tumeur du colon est un adénome colique muqueux de grade III. Celle-ci est maintenue par des passages subcutanés en série tous les 18 jours dans des souris femelles BALB/c. Les expériences ont été conduites dans des souris femelles BALB/c.

Résultats

Dans les conditions telles que décrites, les résultats suivants ont été obtenus pour l'exemple décrit ci-après :

15 – Exemple 2 :

dose sélectionnée : 35 mg/kg – Nécrose de grade 5

Références

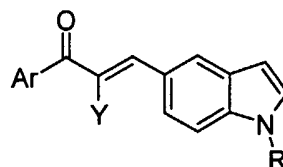
CORBETT, T.H., LEOPOLD, W.R., DYKES, D.J., ROBERTS, B.J., GRISWOLD, D.P., Jr. and SCHABEL, F.M., Jr., Toxicity and anticancer activity of a new triazine antifolate (NSC 127755). Cancer Res., 1982a, **42**, 1707-1715.

CORBETT, T.H., ROBERTS, B.J., TRADER, M.W., LASTER, W.R., Jr., GRISWOLD, D.P., Jr. and SCHABEL F.M., Jr., Response of transplantable tumors of mice to anthracenedione derivatives alone and in combination with clinically useful agents. Cancer Treat. Rep., 1982b, **66**, 1187-1200.

Définitions

« Halogène » est un élément choisi parmi F, Cl, Br, et I.

Les chalcones de formule générale (I),



dans laquelle Ar est tel que défini précédemment, Y est différent d'un atome d'halogène et R est un groupe protecteur de la fonction NH de l'indole, peuvent être préparées par couplage entre une cétone aromatique de formule générale (II), dans laquelle Y est différent d'un atome d'halogène, et un aldéhyde aromatique de formule générale (III), dans les conditions décrites dans J. Med. Chem., 1990, 33, 1948, selon le schéma (I) :

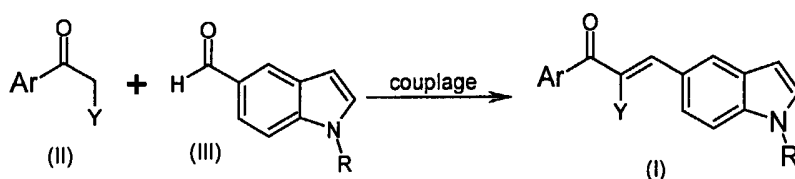


Schéma (I)

On opère généralement dans un appareil de type Soxhlet au reflux d'un alcool, tel que l'éthanol en présence de pipéridine, d'acide acétique et de tamis moléculaire.

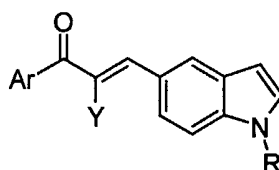
Il est entendu que le couplage entre la cétone de formule générale (II) et l'aldéhyde de formule générale (III) peut être effectué avec un groupe protecteur tel que triméthylsilyle, triéthylsilyle ou *tert*-butyl-diméthylsilyle. Le couplage et le clivage du groupement protecteur de la fonction NH de l'indole peuvent être effectués dans les conditions décrites dans Protective Groups in Organic Chemistry (Wiley éditeur).

Les aldéhydes aromatiques de formule générale (III) sont soit commerciaux soit précédemment décrits dans la littérature.

Les cétones aromatiques de formule générale (II) sont décrites dans la littérature et généralement préparées à partir des aldéhydes aromatiques correspondants qui sont commerciaux. Lorsque Y représente un radical

méthyle, on opère avantageusement en faisant réagir l'aldéhyde avec un réactif organométallique convenablement choisi puis en oxydant l'alcool benzylique ainsi obtenu dans les conditions décrites dans J. Med. Chem., 1990, 33, 1948.

5 Les chalcones de formule générale (I),



dans laquelle Ar est tel que défini précédemment, R est un substituant non substituable dans les conditions d'échange d'halogène et Y représente un atome d'halogène, de préférence un atome de brome ou de chlore, peuvent être préparées par addition d'halogène puis déshydrohalogénéation d'une chalcone dans laquelle Y représente un atome d'hydrogène selon le schéma (II). Il est particulièrement avantageux d'opérer cette séquence d'addition-élimination sur une forme protégée de l'azote indolique, par exemple par un triméthylsilyl, triéthylsilyl, *tert*-butyl-diméthylsilyl, ou *tert*-butyloxycarbonyl, puis de déprotéger. Dans la mesure où Y est le fluor, il est déconseillé d'utiliser des groupes protecteurs silylés, comme cela est connu de l'homme du métier.

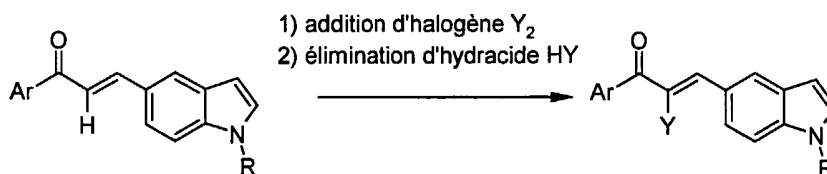
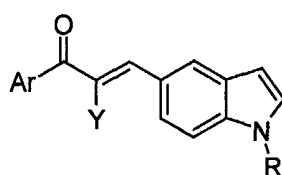


Schéma (II)

20 L'addition d'halogène, de préférence brome ou chlore, s'effectue généralement dans un solvant comme le chloroforme ou le tétrachlorure de carbone à une température comprise entre 0 et 50°C. La déshydrohalogénéation est généralement effectuée dans un solvant tel que le

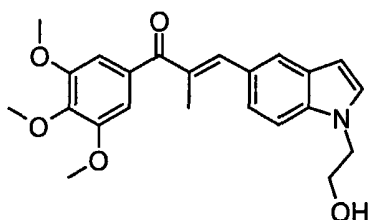
- dichlorométhane en présence d'une base organique ou minérale, comme la triéthylamine ou la soude ou le carbonate de potassium à une température comprise entre 0°C et le reflux du milieu réactionnel. Cette déhydrohalogénéation peut conduire simultanément à la déprotection au moins
- 5 partielle de l'azote indolique, en fonction du groupe protecteur utilisé, particulièrement lorsqu'il s'agit d'un radical *tert*.butyloxycarbonyl.

Les chalcones de formule générale (I),



- dans laquelle Ar, R et Y sont conformes à l'invention peuvent être préparées
- 10 par alkylation d'une chalcone de formule générale (I) dans laquelle le substituant R est un atome d'hydrogène. Cette réaction est conduite en deux étapes. Dans une première étape, après activation de l'azote indolique sous forme d'un sel de métal alcalin, par exemple à l'aide d'un hydrure alcalin tel que NaH, LiH ou KH, on fait réagir un halogénure d'alkyle tel que le 2-
- 15 bromoéthoxy-*tert*-butyl-diméthylsilane pour former un produit de formule générale (I) dans laquelle R 2-*tert*.butyldiméthylsilyloxy-éthyle. Une deuxième étape consiste à cliver le groupe protecteur triméthylsilyle à l'aide d'un fluorure alcalin tel que le fluorure de tétra N-butyle ammonium pour conduire à la formation d'un produit selon l'invention dans lequel R est -CH₂CH₂OH.
- 20 Les exemples suivants sont donnés à titre d'illustration de l'invention.

Exemple 1 : E-2-Méthyl-3-[1-(2-hydroxyéthyl)-indol-5-yl]-1-(3,4,5-triméthoxy-phényl)-propène



Etape 1 : Dans un tricol de 25 mL, surmonté d'un Soxhlet rempli de tamis moléculaire 3A, sont successivement ajoutés 2,24 g de 1-(3,4,5-triméthoxy-phényl)-propanone, qui peut être préparée selon Biorg. Med. Chem. 1998, 8(9),1051, et 2,76 g de 1-*tert*.butyloxycarbonyl-indole-5-carboxaldéhyde - qui
5 peut être préparé selon J. Org. Chem. 2002, 67(17), 6256-59 - dans 100 mL d'éthanol contenant 2 mL de pipéridine et 1 mL d'acide acétique. Le milieu réactionnel est porté au reflux pendant 48 heures. Après refroidissement, le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite puis repris par 100 mL d'acétate d'éthyle, la phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de
10 magnésium et concentrée sous pression réduite. Le produit brut est purifié par flash-chromatographie sur gel de silice (70-230 Mesh), en éluant par un mélange de cyclohexane et d'acétate d'éthyle (70/30 en volumes), on obtient 2,2 g de E-2-méthyl-3-[1-(1-*tert*.butyloxycarbonyl-1-H-indol-5-yl)-1-(3,4,5-triméthoxy-phényl)-propènone pure, sous forme d'une huile jaune pâle
15 utilisée telle quelle à l'étape suivante.

Etape 2 : 0,7 g de E-2-méthyl-3-[1-(1-*tert*.butyloxycarbonyl-1-H-indol-5-yl)-1-(3,4,5-triméthoxy-phényl)-propènone sont dissous dans 15 ml de THF. On ajoute alors successivement 1,5 ml de méthanol, 0,25 g de méthylate de
20 sodium, puis on agite 18 heures à température ambiante. Après concentration sous pression réduite, le milieu réactionnel est repris par 75 ml d'acétate d'éthyle et 35 ml d'eau. La phase organique est décantée, lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous pression réduite. Après purification par flash-chromatographie sur gel de silice (70-230 Mesh),
25 en éluant par un mélange de dichlorométhane et d'oxyde de diisopropyle (50/50 en volumes), on obtient 505 mg de E-2-méthyl-3-(1-H-indol-5-yl)-1-(3,4,5-triméthoxy-phényl)-propènone pure, sous forme d'une huile orangée dont les caractéristiques sont les suivantes :
- spectre de masse (EI) : $m/z = 351$.
30 - analyse élémentaire : % C = 71, 26; %H = 6,54; % N = 3,72.

Etape 3 : A une solution de 1,4 g de E-2-méthyl-3-(1-H-indol-5-yl)-1-(3,4,5-triméthoxy-phényl)-propènone, obtenue à l'étape 2, dans 40 ml de pyridine,

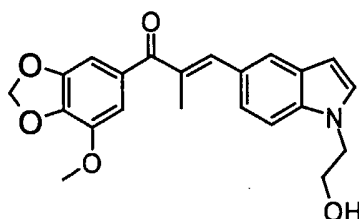
refroidie à 0°, on ajoute lentement 360 mg d'hydruure de sodium, à 60% dans l'huile. Après agitation pendant 1 heure à 0°, jusqu'à cessation du dégagement gazeux, on ajoute 960 mg de 2-bromoéthoxy-*tert*.butyl-diméthylsilane et on porte à 60° pendant 2 heures. Après addition de 80 ml
5 d'eau, le milieu réactionnel est extrait 3 fois par 50 ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques jointes sont lavées à l'eau, séchées sur sulfate de magnésium et concentrées à sec sous pression réduite. Le résidu huileux brun obtenu est purifié par flash-chromatographie sur gel de silice (70-230 Mesh), en éluant par un mélange de dichlorométhane et d'oxyde de
10 diisopropyle (50/50 en volumes). On obtient ainsi 1,5 g de E-2-méthyl-3-[1-(2-*tert*.butyldimethylsilyloxyéthyl)indol-5-yl]-1-(3,4,5-triméthoxy-phényl)-propènone, sous forme d'une huile jaune utilisée telle quelle à l'étape suivante.

Etape 4 : Une solution de 1,5 g de E-2-méthyl-3-[1-(2-
15 *tert*.butyldimethylsilyloxyéthyl)indol-5-yl]-1-(3,4,5-triméthoxy-phényl)-propènone dans 50 ml de tétrahydrofurane est agité 48 heures à température ambiante avec 23,5 ml d'une solution 1M de fluorure de tétra N-butyle ammonium dans le tétrahydrofurane. Après addition de 25 ml d'eau, le milieu réactionnel est extrait 3 fois par 5 ml d'acétate d'éthyle. Les phases
20 organiques jointes sont lavées à l'eau, séchées sur sulfate de magnésium et concentrées à sec sous pression réduite. Le résidu orangé est purifié par flash-chromatographie sur gel de silice (70-230 Mesh), en éluant par un mélange de dichlorométhane et d'éthanol (95/5 en volumes), puis par cristallisation dans l'isopropanol. On obtient ainsi 750 mg de E-2-méthyl-3-[1-
25 (2-hydroxyéthyl)indol-5-yl]-1-(3,4,5-triméthoxy-phényl)-propènone, sous forme de cristaux beiges dont les caractéristiques sont les suivantes :

- spectre de masse (EI) : m/z = 395.
- analyse élémentaire : % C = 69,72 %H = 6,25; % N = 3,53.
- point de fusion (Kofler) = 119°C.

30

Exemple 2 : E-2-Méthyl-3-[1-(2-hydroxyéthyl)-indol-5-yl]-1-(3-méthoxy-4,5-méthylènedioxy-phényl)-propènone



- Etape 1 : Dans un tricol de 250 ml sous atmosphère d'argon, on dissout 5 g d'indole-5-carboxaldéhyde dans 90 ml de DMF et 18 ml de DMSO, puis on refroidit à 0°C. On ajoute alors, par portions, 2,06 g d'hydrure de sodium à 60% dans l'huile, puis on agite en laissant revenir à température ambiante jusqu'à cessation du dégagement gazeux. On coule ensuite, goutte à goutte, 8,6 g de chlorure de (2-triméthylsilyléthyl)oxyméthyle, puis on agite 20 heures à l'ambiante. Le milieu réactionnel est alors coulé sur un mélange de 300 ml d'eau et 100 g de glace pilée, puis extrait 3 fois par 150 ml d'acétate d'éthyle.
- 10 Les phases organiques jointes sont lavées par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, séchées sur sulfate de magnésium et concentrées à sec sous pression réduite. L'huile brune obtenue est purifiée par flash chromatographie sur gel de silice (70-230 Mesh), en éluant par un mélange de cyclohexane et d'acétate d'éthyle (70/30 en volumes), on obtient alors 9 g
- 15 1-(2-triméthylsilyl-éthyl)oxyméthyl-indole-5-carboxaldéhyde, sous forme d'une huile orangée utilisée telle quelle à l'étape suivante.

- Etape 2 : Dans un tricol de 250 mL, surmonté d'un Soxhlet rempli de tamis moléculaire 3A, sont successivement ajoutés 2,1 g de 1-(3-méthoxy-4,5-méthylènedioxy-phényl)-propanone - qui peut être préparée selon J. Org. Chem. 1981, 46(14), 2969-71 - et 2,76 g de 1-(2-triméthylsilyl-éthyl)oxyméthyl-indole-5-carboxaldéhyde dans 100 mL d'éthanol contenant 2 mL de pipéridine et 1 mL d'acide acétique, en chauffant au reflux pendant 96 heures. Après refroidissement, le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite puis repris par 100 mL d'acétate d'éthyle, la phase organique
- 20 est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous pression réduite. Le produit brut est purifié par flash-chromatographie sur gel de silice (70-230 Mesh), en éluant par un mélange de cyclohexane et
- 25

d'acétate d'éthyle (70/30 en volumes), puis cristallisation dans l'oxyde de diisopropyle, on obtient 2 g de E-2-méthyl-3-[1-(2-triméthylsilyl-éthyl)oxyméthyl-1-H-indol-5-yl]-1-(3-méthoxy-4,5-méthylène-dioxy-phényl)-propène pure, sous forme de cristaux blancs dont les caractéristiques sont les suivantes :

- point de fusion (Kofler) = 90°C

Etape 3 : Dans un tricol de 250 ml sous atmosphère d'argon, on dissout 2 g de E-2-méthyl-3-[1-(2-triméthylsilyl-éthyl)oxyméthyl-1-H-indol-5-yl]-1-(3-méthoxy-4,5-méthylènedioxy-phényl)-propène dans 42 ml de THF, puis on ajoute 4,3 ml d'une solution 1M de fluorure de tétra N-butyle ammonium dans le THF et on porte au reflux pendant 20 heures. Après concentration sous pression réduite, le milieu réactionnel est repris par 75 ml d'acétate d'éthyle et 75 ml d'eau. La phase organique est décantée, lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et concentrée à sec sous pression réduite. L'huile rouge obtenue est purifiée par flash chromatographie sur gel de silice (70-230 Mesh), en éluant par un mélange de cyclohexane et d'acétate d'éthyle (70/30 en volumes), puis par recristallisation dans l'isopropanol, on obtient alors 420 mg de E-2-méthyl-3-(1-H-indol-5-yl)-1-(3-méthoxy-4,5-méthylène-dioxy-phényl)-propène pure, sous forme d'un solide beige dont les caractéristiques sont les suivantes :

- point de fusion (Kofler) = 140°C

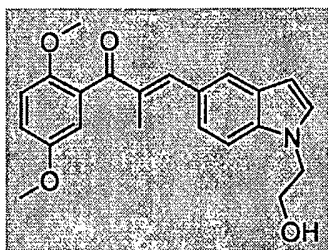
Etape 4 : En opérant comme à l'étape 3 de l'exemple 1, mais à partir de 671 mg de E-2-méthyl-3-(1-H-indol-5-yl)-1-(3-méthoxy-4,5-méthylènedioxy-phényl)-propène, obtenue à l'exemple 17, de 180 mg d'hydruure de sodium à 60% dans l'huile et de 479 mg de 2-bromoéthoxy-*tert*.butyldiméthylsilane dans 20 ml de pyridine, on obtient, après purification par flash-chromatographie sur gel de silice (70-230 Mesh), en éluant par un mélange d'acétate d'éthyle et de cyclohexane (30/70 en volumes), 830 mg de E-2-méthyl-3-[1-(2-*tert*.butyldiméthylsilyloxyéthyl)indol-5-yl]-1-(3-méthoxy-4,5-méthylènedioxy-phényl)-propène, sous forme d'une huile jaune utilisée telle quelle à l'étape suivante.

Etape 5 : En opérant comme à l'étape 4 de l'exemple 1, mais à partir de 830 mg de E-2-méthyl-3-[1-(2-*tert*.butyldimethylsilyloxyéthyl)indol-5-yl]-1-(3-méthoxy-4,5-méthylènedioxy-phényl)-propènone dans 25 ml de tétrahydrofurane et 13,5 ml d'une solution 1M de fluorure de tétrabutylammonium dans le tétrahydrofurane pendant 20 heures, on obtient, après purification par flash-chromatographie sur gel de silice (70-230 Mesh), en éluant par un mélange d'acétate d'éthyle et de cyclohexane (50/50 en volumes), puis par recristallisation dans l'oxyde d'isopropyle, 385 mg de E-2-méthyl-3-[1-(2-hydroxyéthyl)indol-5-yl]-1-(3-méthoxy-4,5-méthylènedioxy-phényl)-propènone, sous forme d'une poudre beige dont les caractéristiques sont les suivantes :

- spectre de masse (EI) : $m/z = 379$
- analyse élémentaire : % C = 69,84 %H = 6,50; % N = 3,62.
- point de fusion (Kofler) = 83°C.

15

Exemple 3 : E-2-Méthyl-3-[1-(2-hydroxyéthyl)-1-H-indol-5-yl]-1-(2,5-diméthoxy-phényl)-propènone



Etape 1 : Dans un tricol de 500 mL, surmonté d'un Soxhlet rempli de tamis moléculaire 3A, sont successivement ajoutés 4,86 g de 1-(2,5-diméthoxy-phényl)-propanone et 6,13 g de 1-*tert*.butyloxycarbonyl-indole-5-carboxaldéhyde - qui peut être préparé selon J. Org. Chem. 2002, 67(17), 6256-59 - dans 280 mL d'éthanol contenant 5 mL de pipéridine et 2,53 mL d'acide acétique, en chauffant au reflux pendant 48 heures. Après refroidissement, le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite puis repris par 100 mL d'acétate d'éthyle, la phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous pression réduite. Le produit brut est purifié par flash-chromatographie sur gel de silice (70-230

Mesh), en éluant par un mélange de cyclohexane et d'acétate d'éthyle (90/10 en volumes), on obtient 2,3 g de E-2-méthyl-3-[1-(1-*tert*.butyloxycarbonyl-1-H-indol-5-yl)]-1-(2,5-diméthoxy-phényl)-propénone pure, sous forme d'une huile jaune utilisée telle quelle à l'étape suivante.

- 5 Etape 2 : 2,3 g de E-2-méthyl-3-[1-(1-*tert*.butyloxycarbonyl-1-H-indol-5-yl)]-1-(2,5-diméthoxy-phényl)-propénone sont dissous dans 57 ml de tétrahydrofurane. On ajoute alors successivement 5,7 ml de méthanol et 0,73 g de méthylate de sodium, puis on agite 20 heures à température ambiante. Après concentration sous pression réduite, le milieu réactionnel est repris par
- 10 75 ml d'acétate d'éthyle et 35 ml d'eau. La phase organique est décantée, lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous pression réduite. Après purification par flash-chromatographie sur gel de silice (70-230 Mesh), en éluant par un mélange d'acétate d'éthyle et de cyclohexane (30/70 en volumes), on obtient 1,5 g de E-2-méthyl-3-(1-H-indol-5-yl)-1-(2,5-
- 15 diméthoxy-phényl)-propénone pure, sous forme d'une pâte jaune dont les caractéristiques sont les suivantes :
- spectre de masse (EI) : $m/z = 321$.
 - point de fusion (Kofler) = 52-55°C.

- Etape 3 : En opérant comme à l'étape 3 de l'exemple 1, mais à partir de 1 g
- 20 de E-2-méthyl-3-(1-H-indol-5-yl)-1-(2,5-diméthoxy-phényl)-propénone, de 280 mg d'hydruure de sodium à 60% dans l'huile et de 750 mg de 2-bromoéthoxy-*tert*.butyl-diméthylsilane dans 30 ml de pyridine, on obtient, après purification par flash-chromatographie sur gel de silice (70-230 Mesh), en éluant par un mélange d'acétate d'éthyle et de cyclohexane (30/70 en volumes), 1,45 g de
- 25 E-2-méthyl-3-[1-(2-*tert*.butyldimethylsilyloxyéthyl)indol-5-yl]-1-(2,5-diméthoxy-phényl)-propénone, sous forme d'une huile brune utilisée telle quelle à l'étape suivante.

- Etape 4 : En opérant comme à l'étape 4 de l'exemple 1, mais à partir de 1,45 g de E-2-méthyl-3-[1-(2-*tert*.butyldimethylsilyloxyéthyl)indol-5-yl]-1-(2,5-
- 30 diméthoxy-phényl)-propénone dans 45 ml de tétrahydrofurane et 25 ml d'une solution 1M de fluorure de tétra N-butyle ammonium dans le tétrahydrofurane pendant 20 heures, on obtient, après purification par flash-chromatographie

sur gel de silice (70-230 Mesh), en éluant par un mélange d'acétate d'éthyle et de cyclohexane (30/70 en volumes), puis par recristallisation dans l'isopropanol, 610 mg de E-2-méthyl-3-[1-(2-hydroxyéthyl)indol-5-yl]-1-(2,5-diméthoxy-phényl)-propénone, sous forme de cristaux jaunes dont les

5 caractéristiques sont les suivantes :

- spectre de masse (EI) : $m/z = 365$
- point de fusion (Kofler) = 112°C .

RESULTATS BIOLOGIQUES

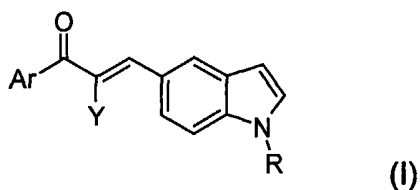
10

Exemple N°	Ames	Tubuline : Inhibition de polymérisation CI_{50} (μM)	Inhibition de prolifération cellulaire CI_{50} (μM)		Herg CI_{50} (μM)	Colon C51 Nécrose tumorale In vivo
			HDMEC	HeLa		
1	négatif	0,8	0,00097 – 0,00329	0,00348 – 0,00375	nd	nd
2	négatif	0,6	0,00022 – 0,00061	0,00123 – 0,00162	> 30	Grade 5 à 35 mg/kg
3	négatif	0,83	nd	nd	nd	nd

nd : non déterminé

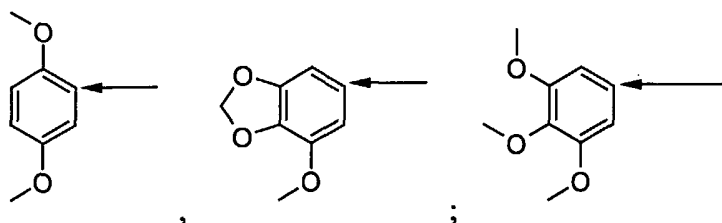
REVENDICATIONS

1. Produit répondant à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

- 5 a) Y est sélectionné dans le groupe constitué par halogène, méthyle,
 b) Ar est sélectionné dans le groupe constitué par :

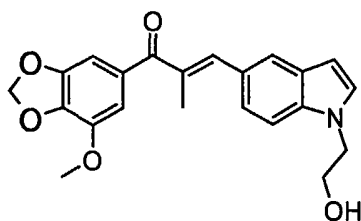


- c) R est $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$;

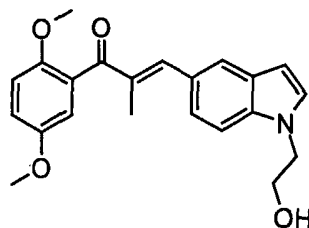
et ses isomères.

- 10 2. Produit selon la revendication 1, caractérisé en ce que Y est CH_3 .

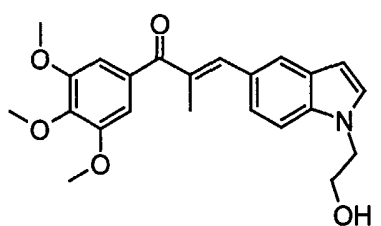
3. E-2-Méthyl-3-[1-(2-hydroxyéthyl)-1-H-indol-5-yl]-1-(3,4,5-triméthoxyphényl)-propène :



4. E-2-Méthyl-3-[1-(2-hydroxyéthyl)-1-H-indol-5-yl]-1-(2,5-diméthoxyphényl)-propène :
 15



5. E-2-Méthyl-3-[1-(2-hydroxyéthyl)-1-H-indol-5-yl]-1-(3,4,5-triméthoxy-phényl)-propène :



- 5 6. Composition pharmaceutique comprenant un produit selon l'une quelconque des revendications précédentes, en combinaison avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.
7. Utilisation d'un produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, comme agent inhibant la polymérisation de la tubuline.
- 10 8. Utilisation d'un produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour favoriser le détachement de cellules endothéliales formant la paroi des vaisseaux alimentant une tumeur.
9. Utilisation d'un produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour favoriser une nécrose tumorale.
- 15 10. Utilisation d'un produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour la fabrication d'un médicament utile pour traiter un état pathologique.
11. Utilisation selon la revendication 10, dans laquelle l'état pathologique est le cancer.