



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

① CH 656 883 A5

⑤ Int. Cl.: C 07 K 7/64
C 07 K 9/00

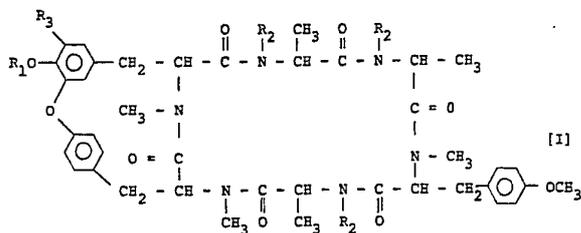
Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

<p>⑲ Numéro de la demande: 4582/82</p> <p>⑳ Date de dépôt: 28.07.1982</p> <p>㉓ Priorité(s): 28.07.1981 JP 56-117968</p> <p>㉔ Brevet délivré le: 31.07.1986</p> <p>④⑤ Fascicule du brevet publié le: 31.07.1986</p>	<p>⑦③ Titulaire(s): Tobishi Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo (JP)</p> <p>⑦② Inventeur(s): Itokawa, Hideji, Setagaya-ku/Tokyo (JP)</p> <p>⑦④ Mandataire: Kirker & Cie SA, Genève</p>
--	--

⑤④ Composés à effet thérapeutique et leur procédé de préparation.

⑤⑦ On décrit de nouveaux composés ayant la formule générale suivante:



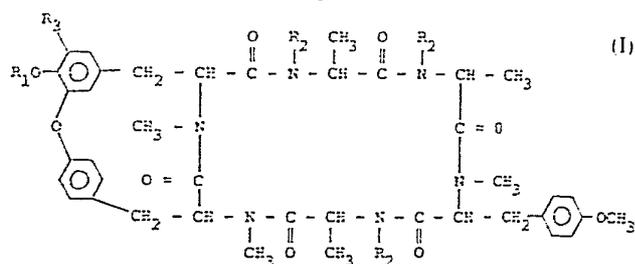
types de substituants, ces nouveaux composés ayant un effet thérapeutique, notamment un effet antinéoplasique, émétique, anorexigénique, psychotropique, vasoconstricteur, papavérinique, antiparkinsonien et/ou antidiurétique.

dans laquelle R₁ est un groupe acyle, alkyle, cycloalkyle éventuellement substitué, carboxyalkyle ou ester de ceux-ci, un groupe hétérocyclique, un reste formant une fraction sucre ou un atome d'hydrogène, R₂ est un atome d'hydrogène ou un alkyle inférieur et R₃ représente un atome d'hydrogène ou un groupe nitro ou amino.

Parmi ces nouveaux composés, certains sont isolés et purifiés à partir plus particulièrement *Rubia akane* et *Rubia cordifolia*, d'autres composés étant préparés en modifiant chimiquement lesdits composés isolés avec différents

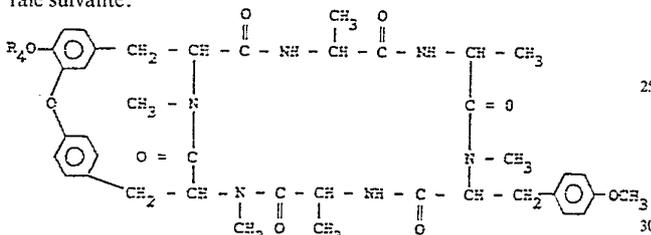
REVENDICATIONS

1. Composé ayant la formule générale suivante:



dans laquelle R_1 est un atome d'hydrogène, un groupe acyle, un groupe alkyle, cycloalkyle éventuellement substitué par un alkyle inférieur, un groupe amino, nitro ou un atome d'halogène, carboxyalkyle ou un ester de ceux-ci, un groupe hétérocyclique ou un reste formant une fraction sucre, R_2 représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle inférieur, et R_3 représente un atome d'hydrogène ou un groupe contenant de l'azote.

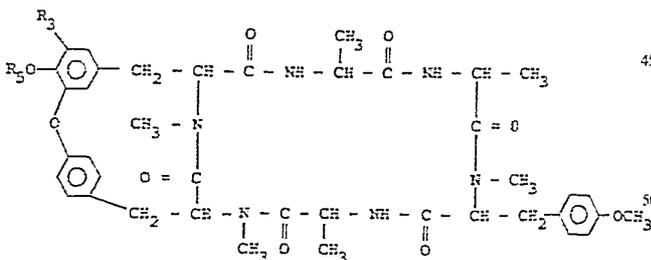
2. Procédé de préparation d'un composé ayant la formule générale suivante:



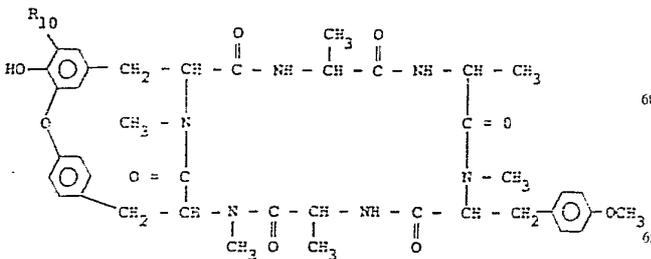
dans laquelle R_4 représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, caractérisé en ce qu'il consiste à extraire les plantes de l'espèce *Rubia akane* ou *Rubia cordifolia* par un solvant, à concentrer l'extrait et soumettre à la chromatographie l'extrait brut obtenu, afin d'isoler et de purifier les ingrédients extraits de *Rubia akane* ou *Rubia cordifolia*.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit solvant utilisé pour l'extraction est le méthanol, l'éthanol, le chloroforme ou l'acétate d'éthyle.

4. Procédé de préparation d'un composé ayant la formule générale suivante:

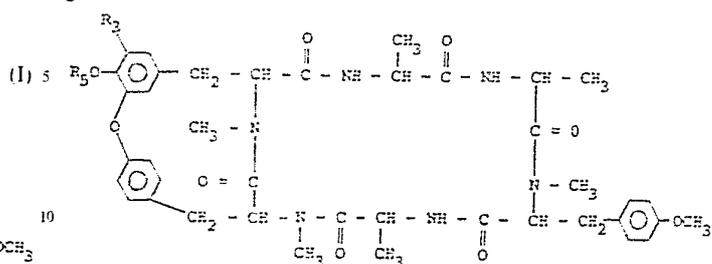


dans laquelle R_5 est un groupe alkyle, cycloalkyle, carboxyalkyle ou ester de ceux-ci, ou un groupe hétérocyclique, et R_3 est un hydrogène ou un groupe nitro, caractérisé en ce qu'on fait réagir un composé ayant la formule suivante:

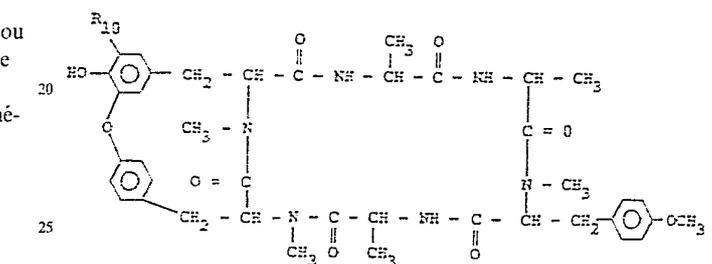


dans laquelle R_{10} est un atome d'hydrogène ou un groupe nitro, avec un agent alkylant.

5. Procédé pour la préparation d'un composé ayant la formule générale suivante:



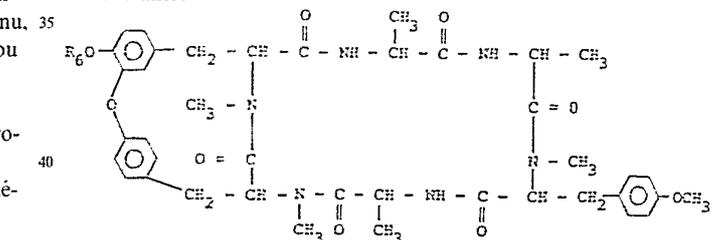
dans laquelle R_6 est un groupe alkyle, cycloalkyle, carboxyalkyle ou ester de ceux-ci, ou un groupe hétérocyclique, et R_3 est un groupe amino, caractérisé en ce qu'on fait réagir un composé ayant la formule suivante:



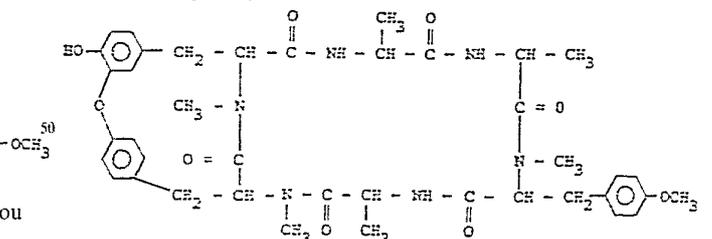
dans laquelle R_{10} est un groupe nitro, avec un agent alkylant et en ce qu'on réduit le produit ainsi obtenu.

6. Procédé selon les revendications 4 et 5, caractérisé en ce que ledit agent alkylant est le diazométhane, le dihydropyranne, un halogénure alkylé ou du sulfate de diméthyle.

7. Procédé de préparation d'un composé ayant la formule générale suivante:



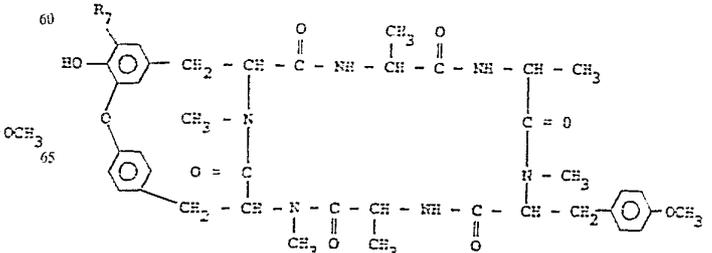
dans laquelle R_6 est un groupe acyle, caractérisé en ce qu'on fait réagir un composé ayant la formule suivante:



avec un agent acylant.

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

9. Procédé de préparation d'un composé ayant la formule générale suivante:



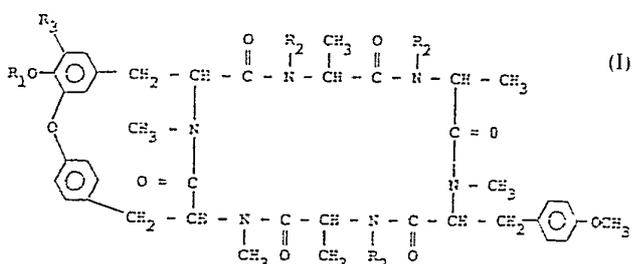
cadre bien déterminé, en vue d'obtenir des ingrédients utiles à partir de ces plantes. Les plantes médicinales ont été utilisées pendant longtemps, et même encore actuellement, comme médicaments ou remèdes populaires, en raison de leur faible toxicité et de leur action pharmacologique modérée; même en médecine moderne, les effets obtenus par les plantes médicinales ont été reconsidérés. C'est ainsi qu'on a trouvé que l'extrait brut de garance (*Rubia akane* et *Rubia cordifolia*) présentait d'excellents effets thérapeutiques, et qu'un produit unique ayant une action antinéoplasique prononcée pouvait être obtenu en purifiant ledit extrait brut, ce qui a conduit l'inventeur à mettre au point la présente invention.

L'invention a principalement pour but de fournir de nouveaux composés à effet thérapeutique.

Un autre but de l'invention est de fournir un procédé de préparation desdits nouveaux composés.

D'autres buts, objets et caractéristiques de l'invention ressortiront de la description qui suit.

Les nouveaux composés selon l'invention sont représentés par la formule générale ci-après (I):



dans laquelle R_1 est un atome d'hydrogène, un groupe acyle, un groupe alkyle, cycloalkyle éventuellement substitué, carboxyalkyle ou un ester de ceux-ci, un groupe hétérocyclique ou un reste formant une fraction sucre, R_2 représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle inférieur, et R_3 représente un atome d'hydrogène ou un groupe contenant de l'azote.

Les nouveaux composés de formule générale (I) préférés sont ceux dans laquelle R_1 représente un groupe acyle de $-COA$ (A étant un groupe alkyle en C_1-C_{20} substitué ou linéaire, saturé ou non saturé; un groupe phényle ou un phényle substitué par un atome d'halogène, un groupe alkyle inférieur, nitro ou amino; un groupe benzyle ou styryle non substitué ou substitué par un atome d'halogène, un groupe alkyle inférieur, un groupe nitro ou amino); un groupe alkyle en C_1-C_{20} linéaire ou ramifié; un groupe cycloalkyle en C_3-C_6 non substitué ou substitué par un alkyle inférieur, un groupe amino, nitro ou un atome d'halogène; un groupe carboxyalkyle en C_1-C_5 ou un ester de ce composé avec un alcool en C_1-C_5 ; un groupe hétérocyclique; un résidu 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 est un atome d'hydrogène ou un groupe contenant de l'azote, tel qu'un groupe amino ou nitro.

On a trouvé que les composés de l'invention présentent une activité antinéoplasique et ont un effet thérapeutique, en particulier, émétique, anorexigénique, psychotropique, vasoconstricteur, papavérinique, antiparkinsonien et/ou une action antidiurétique.

Les figures 1 à 3 des dessins annexés illustrent les résultats des spectres IR observés pour les composés obtenus, respectivement, dans l'exemple 1, c'est-à-dire le composé TPC-A correspondant au composé de formule I dans laquelle R_3 et R_1 représentent tous deux un atome d'hydrogène, son dérivé méthyléther et, dans l'exemple 22, le dérivé acétylé de TPC-A.

Le *Rubia akane* utilisé comme produit de départ, d'où les composés TPC-A et leurs dérivés méthyléthers sont isolés, est une plante vivace du genre sarment qui se développe spontanément dans les champs et les montagnes du globe. La racine rouge-jaune de cette plante a été utilisée comme désinfectant sanguin, emménagogue et hémostatique, en médecine traditionnelle chinoise, et comme remède

populaire pour le traitement cardiopathique à froid, et des contusions, sous forme de décoction.

Il est connu que l'espèce *Rubia* renferme des anthraquinones, népétalactones, triterpénoïdes, saponines, alcaloïdes; toutefois, aucun composé actif individuel n'a jamais été extrait ou isolé.

Le composé TPC-A ayant un groupe hydroxyle, pouvant être extrait et isolé du *Rubia akane* et *Rubia cordifolia*, présente de lui-même un effet antinéoplasique et est considéré comme ayant des effets analogues à d'autres ingrédients pharmacologiquement actifs.

En outre, il est utilisé comme produit intermédiaire pour la préparation de dérivés qui peuvent être obtenus en modifiant chimiquement le groupe libre hydroxyle et ou le groupe imino.

Le composé TPC-A peut être extrait de la racine de *Rubia akane* et *Rubia cordifolia*, en soumettant le *Rubia akane* et le *Rubia cordifolia* séchés à l'extraction au solvant, par exemple méthanol, éthanol, chloroforme et acétate d'éthyle, en concentrant l'extrait, puis en isolant et en purifiant par chromatographie l'extrait concentré brut.

Le dérivé méthyléther de TPC-A peut également être extrait du *Rubia akane* et du *Rubia cordifolia*, sous la forme d'une fraction différente de celle du TPC-A, suivant le même processus. En outre, ce composé peut également être préparé par méthylation du composé TPC-A au niveau du groupe hydroxyle libre, dans un solvant approprié. Ce composé peut également être utilisé comme produit de départ d'autres dérivés.

Dans la réaction de méthylation, un alcool, un éther ou un solvant aqueux peut être utilisé comme solvant approprié, suivant l'agent méthylyant employé. En outre, on peut utiliser un agent méthylyant connu, tel qu'un halogénure de méthyle, le diazométhane ou le sulfate de diméthyle, la méthylation du composé TPC-A pouvant être effectuée conformément à une réaction conventionnelle de méthylation.

Durant le processus d'extraction, si l'extraction est effectuée par chromatographie sur colonne, sur charbon actif, comme éluant, il peut être préférable d'utiliser un solvant moins polaire que l'extrait, tel que le benzène, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le méthanol ou un mélange de ces produits. Lorsque la séparation est effectuée par chromatographie en phase liquide, il est préférable d'utiliser une colonne chromatographique à phase inversée, telle que C-18 (fabrication Waters Associates Inc.), RP-8 ou RP-18 (vendue par Merck & Co., Inc.), ainsi qu'une colonne de Silicagel traitée à l'ODS.

D'autres dérivés du TPC-A ou un méthyléther de celui-ci peuvent être préparés selon les processus ci-après.

Parmi les nouveaux composés de l'invention, les composés dans lesquels R_1 est un groupe alkyle, cycloalkyle ou carboxyalkyle ou un ester de ces produits ou un groupe hétérocyclique, peuvent être facilement préparés en faisant réagir le composé TPC-A, isolé de la garance, avec un agent alkylant tel qu'un halogénure d'alkyle, un agent méthylyant, des halogénures de cycloalkyle ou des halogénures de carboxyalkyle ou des esters de ces produits. On peut mentionner, comme agent alkylant, des halogénures d'alkyle en C_1 à C_{20} , par exemple des bromures, des halogénures de cycloalkyle en C_3 à C_6 , par exemple des bromures, des halogénures de carboxyalkyle en C_1 à C_5 , tels que des bromures, ou un ester alkyle inférieur de ces produits.

L'alkylation du groupe OH sur un noyau phényle est bien connue et, dans la présente invention, l'alkylation du composé TPC-A est effectuée selon une méthode conventionnelle.

Les composés dans lesquels R_1 est un groupe acyle peuvent être préparés en faisant réagir le composé TPC-A avec un agent acylant, selon une méthode d'acylation conventionnelle. Comme agent acylant, on peut utiliser, dans la présente invention, des halogénures d'acyle ou des anhydrides d'acide tels que l'anhydride acétique, l'anhydride propionique, l'anhydride butyrique ou isobutyrique, l'anhydride crotonique, l'anhydride valérique, l'anhydride caproïque, l'anhydride énanthique, l'anhydride caprylique, l'anhydride caprique, l'anhydride stéarique, l'anhydride benzoïque, l'anhydride

O-, m-, p-chlorobenzoïque, l'anhydride m-, p-nitrobenzoïque, l'anhydride cinnamique, l'anhydride phénylacétique et les chlorures ou les bromures de ces acides.

Lorsqu'un halogénure d'acide méthane-sulfonique est utilisé à la place de l'agent acylant, l'ester de l'acide méthane-sulfonique du TPC-A peut être préparé de la même manière.

Les composés dans lesquels R₃ est un groupe contenant de l'azote peuvent être préparés, par exemple par nitration du TPC-A et, si nécessaire, par réduction du groupe nitro, suivant une méthode conventionnelle de nitration ou de réduction.

Les composés dans lesquels au moins l'un des R₂ est un groupe méthyle peuvent être préparés par méthylation des dérivés méthylés du TPC-A, avec un agent méthyliant connu tel que le diazométhane, des halogénures de méthyle, en particulier des iodures, du sulfate de diméthyle, en présence d'un hydroxyde alcalin, d'un carbonate alcalin ou de fluorure de potassium.

Les composés dans lesquels au moins l'un des R₁ est un résidu saccharide peuvent être préparés par réaction entre le 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 effectuée suivant un processus conventionnel et le groupe protecteur peut être, par exemple, un groupe acétyle, benzoyle, benzyle et d'autres groupes acyles qui peuvent être éliminés dans des conditions douces.

Les fragments de saccharide utilisés dans l'invention peuvent être le glucose, le galactose, le rhamnose, le fructose ou le xylose.

L'invention sera maintenant décrite plus en détail en se référant aux exemples non limitatifs ci-après.

Exemple 1:

(i) Extraction

A 500 g du produit de départ séché (racine de *Rubia cordifolia*), on ajoute 1 l de méthanol et l'on poursuit l'extraction au bain d'eau chaude pendant 3 heures, tout en chauffant, puis on sépare l'extrait du résidu par filtration. On répète l'extraction par rapport au résidu, en ajoutant 1 l de méthanol frais. Après avoir répété cette extraction, les extraits obtenus sont rassemblés et concentrés sous vide, ce qui fournit 27 g d'extrait brut.

On dissout 25 g dudit extrait brut dans 200 ml de méthanol et on introduit la solution dans une colonne garnie de 250 g de charbon activé pour chromatographie (fabriqué et vendu par Wako Inc.). Après lavage de la colonne au méthanol, on effectue l'élution au chloroforme-méthanol et les fractions éluées résultantes sont rassemblées, puis concentrées sous vide, ce qui donne 10 g d'un produit huileux, de coloration brun rougeâtre.

9 g dudit produit huileux sont dissous dans une petite quantité de chloroforme et la solution est adsorbée sur une colonne garnie de 400 g de gel de silice. On lave ensuite la colonne en utilisant, dans l'ordre, du chloroforme, un solvant mixte chloroforme-acétate d'éthyle et de l'acétate d'éthyle, avant d'effectuer l'élution avec un mélange chloroforme-méthanol. L'éluat résultant est rassemblé et concentré sous vide, ce qui donne 1,4 g d'un produit huileux.

Par ailleurs, 1,3 g dudit produit huileux est dissous dans une petite quantité de chloroforme, puis la solution est adsorbée sur une colonne remplie de 150 g de gel de silice; on lave ensuite la colonne avec un mélange de chloroforme et de chloroforme-méthanol (100:1), puis on procède à l'élution avec un mélange de chloroforme-méthanol (100:3). Les fractions éluées sont rassemblées et combinées, puis concentrées sous vide, ce qui fournit 250 mg d'un produit solide.

On dissout le produit solide obtenu dans une petite quantité d'un mélange chloroforme-méthanol et, après développement de la solution sur une plaque TLC, type 7544 (Merck & Co., Inc.) à l'aide de solvant mixte chloroforme-méthanol (100:15), les bandes résultantes ayant une coloration bleu foncé par irradiation aux rayons ultraviolets (254 nm), ce qui correspond à des valeurs R_f, respectivement, de 0,60 à 0,71 et de 0,50 à 0,59, sont chargées dans des colonnes distinctes; chaque colonne est éluée avec un mélange chloroforme-méthanol.

puis, après évaporation à sec sous vide, on obtient, à partir de chaque fraction de valeur R_f faible ou élevée, respectivement, 56 mg et 24 mg d'un produit solide brun clair.

La solution renfermant 40 mg dudit produit solide (faible R_f) dans l'acétonitrile aqueux à 45% est soumise à un HPLC de préparation en utilisant une colonne micro Bondapak C-18 (Waters Associates Inc.) et une solution aqueuse d'acétonitrile à 45% comme solvant de développement. L'absorbance à 254 nm étant utilisée comme indication, et l'éluat est évaporé à sec, sous vide, ce qui donne 24 mg d'une poudre blanche (TPC-A). La méthode HPLC de préparation peut être éventuellement répétée pour purifier davantage le produit.

On répète le même processus avec la solution renfermant 20 mg de l'autre produit solide (valeur R_f élevée) dans l'acétonitrile aqueux à 45%, ce qui donne 12 mg d'une poudre blanche (dérivé méthyléther du TPC-A). On recristallise la poudre blanche par le méthanol et l'on obtient 10 mg de cristaux se présentant sous forme d'aiguilles incolores.

(ii) En utilisant 100 g de *Rubia akane* sec, on répète les opérations précitées (i), ce qui fournit 7,3 mg de TPC-A et 4,9 mg de son dérivé méthyléther.

(iii) Préparation du méthyléther du composé TPC-A

Dans une petite quantité de méthanol, on dissout 10 mg du composé TPC-A, solution à laquelle on ajoute 5 ml de diazométhane dans l'éther. Après avoir laissé reposer la solution, tout en refroidissant par l'eau glacée, pendant 1 heure, on évapore la solution à sec, sous vide, et l'on recristallise par le méthanol la poudre blanche résultante, ce qui donne 8 mg de cristaux se présentant sous forme d'aiguilles incolores.

Le produit résultant est identifié comme étant le dérivé méthyléther du TPC-A, sur la base des résultats des mesures NMR et IR.

Les propriétés physiques et chimiques de ces composés, du TPC-A et du méthyléther de ces produits, dérivés de la garance, sont représentées au tableau 1 ci-après. En outre, les diagrammes des spectres IR sont représentés aux figures 1 et 2.

(Tableau en tête de la page suivante)

Exemples 2 à 17:

A un solvant mixte de tétrahydrofurane (4 ml), de méthanol (8 ml) et d'eau (2 ml), on ajoute 100 mg de TPC-A et 20 mg de n-hexylbromure, puis une quantité en excès de carbonate de potassium anhydre; on chauffe ensuite le mélange au reflux, sur bain d'huile, à 100 °C. Après achèvement de la réaction et après avoir interrompu le chauffage, on ajoute de l'eau à la solution réactionnelle, on extrait la solution à l'acétate d'éthyle et on lave l'extrait avec une solution saturée de chlorure de sodium. L'extrait lavé est séché sur du sulfate de magnésium anhydre, le solvant est séparé par distillation sous vide, et le résidu obtenu est lavé au n-hexane et purifié par P-TLC. Le produit ainsi obtenu est recristallisé par le méthanol, ce qui fournit 63 mg de n-hexyléther du composé TPC-A, se présentant sous forme de cristaux incolores.

Suivant la même méthode, mais en utilisant un n-alkylbromure représenté au tableau 1, à la place de n-hexylbromure, on obtient les dérivés n-alkyléther correspondants.

Les propriétés physiques de ces produits sont indiquées au tableau 2.

(Tableau en page suivante)

Exemple 18:

(i) Les opérations de l'exemple 2 sont répétées, excepté qu'on utilise le bromoacétate de méthyle à la place de n-hexylbromure, ce qui permet d'obtenir de l'hydroxycarbonylméthyléther (1) de TPC-A, sous forme de cristaux incolores.

(ii) Le produit (1) obtenu en (i) est traité au diazométhane et recristallisé par le méthanol pour obtenir un méthylester (2) dudit produit (1), sous forme de cristaux incolores. Les propriétés physiques sont indiquées au tableau 3.

POOR QUALITY

Tableau I

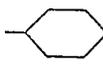
Propriétés	TPC-A	Méthyléther du TPC-A
Poids moléculaire*	756	770
Aspect	poudre blanche	aiguilles incolores
Point de fusion (M.P.)	environ 235 °C, produit devenant progressivement brunâtre (pas de point net de décomposition)	> 289 °C (pas de point net de décomposition)
Pouvoir rotatoire spécifique		
$[\alpha]_D$	-220 (CHCl ₃ , C = 0,1)	-224 (CHCl ₃ , C = 0,25)
UV, λ. EtOH max	276 nm; ε = 3800 282 nm; ε = 3300	276 nm; ε = 3800 282 nm; ε = 3300
NMR, (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)
IR***	Figure 1	Figure 2

* Le poids moléculaire est déterminé par FD-MS.

** La mesure proton NMR est effectuée en utilisant CDCl₃ comme solvant et Si (CH₃)₄ comme étalon interne, à 100 MHz.

*** Les résultats IR sont obtenus selon la méthode au KBr.

Tableau 2

Exemple	R _i	m.p. (°C) (décomp.)	$[\alpha]_D$ (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
12	(CH ₂) ₁₀ CH ₃	228-235	-179	26
13	(CH ₂) ₁₁ CH ₃	240-242	-189	26
14	(CH ₂) ₁₂ CH ₃	238-242	-186	26
15	(CH ₂) ₁₁ -CH ₃	228-235	-153	26
16		215-222	-171	25
17		229-233	-155	26

Exemple 19:

i) En utilisant l'éthylbromobutyrate à la place de bromoacétate de méthyle, la phase i) dans l'exemple 18 est répétée pour préparer l'hydroxycarbonylpropyléther (1) et l'éthoxycarbonylpropyléther (2) de TPC-A.

ii) Le produit (1) est traité au diazométhane, puis recristallisé par le méthanol pour obtenir du méthoxycarbonylpropyléther de TPC-A, sous forme de cristaux incolores. Les propriétés physiques de ces composés sont indiquées au tableau 3. →

Exemple 20:

Dans 4 ml d'un solvant mixte renfermant de l'acétate d'éthyle anhydre (19 ml) et de l'acide chlorhydrique anhydre à 5% contenant de l'acétate d'éthyle (1 ml), on dissout 100 mg du composé TPC-A, puis on ajoute 0,4 ml de 2,3-dihydropyranne et, après avoir scellé le récipient réactionnel, on laisse le mélange reposer pendant une nuit à

25 →

Tableau 3

Exemple	R _i	m.p. (°C) (décomp.)	$[\alpha]_D$ (CHCl ₃)	T (°C)
18 (1)	CH ₂ COOH	211-215	-141	25
18 (2)	CH ₂ COOCH ₃	201-207	-161	24
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

5 °C. Une fois la réaction achevée, on ajoute de l'acétate d'éthyle et la solution est lavée avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, puis séchée sur du sulfate de magnésium anhydre. On sépare le solvant par distillation sous vide et on lave le résidu au n-hexane, après quoi on purifie par le P-TLC. Les cristaux résultants sont recristallisés par le méthanol et l'on obtient 55 mg de tétrahydropyranyléther de TPC-A, sous forme de cristaux incolores, de point de fusion de 286 à 289 °C (avec décomposition), $[\alpha]_D^{25} = -157$ (CHCl₃).

Exemples 21 à 39:

Dans 5 ml de pyridine anhydre, on dissout 50 mg de TPC-A et on ajoute, goutte à goutte, tout en agitant, 15 ml d'anhydride de caproyle. On laisse la solution reposer pendant une nuit, à température ambiante, puis on ajoute du toluène anhydre à la solution réactionnelle et l'on sépare le solvant par distillation sous vide. Le résidu résultant est lavé au n-hexane et le précipité obtenu est recristallisé par le méthanol, ce qui donne 38 mg de caproate de TPC-A se présentant sous forme de cristaux incolores.

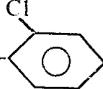
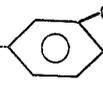
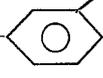
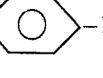
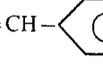
Les mêmes opérations sont répétées, mais en utilisant d'autres acides (y compris des anhydrides d'acide ou du chlorure de méthane-sulfonyle) correspondant aux restes dont la liste est indiquée au tableau 4 ci-après, à la place d'anhydride de caproyle; les produits correspondants indiqués au tableau 4 sont obtenus sous forme de cristaux incolores. Les propriétés physiques de ces produits sont spécifiées au tableau 4.

(Tableau en tête de la colonne suivante)

Exemples 40 à 45:

Dans une fiole du type «aubergine», on introduit 40 mg d'éthoxyde de thallium et l'on ajoute 2 mg d'éthanol anhydre, puis on agite la solution. On ajoute ensuite 110 mg de TPC-A et 1 ml de

Tableau 4

Exemple	R ₁	m.p. (°C) (décomp.)	[α] _D ²⁵ (CHCl ₃)	T (°C)
21	CO(CH ₂) ₄ CH ₃	205-210	-178	19
22	COCH ₃	228-241	-190	18
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
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) ₁₀ CH ₃	105-110	-131	19
32	CO- 	240-245	-188	22
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
38	COCH=CH- 	330-335	-150	23
39	SO ₂ CH ₃	218-225	-172	26

tétrahydrofurane anhydre, on agite à température ambiante pendant 3 heures, puis la solution est soumise à une distillation sous vide, pour éliminer le solvant; le sel de thallium de TPC-A résultant est mis en suspension dans 2 ml de tétrahydrofurane anhydre et on ajoute, goutte à goutte, tout en agitant, une solution de chlorure de 4-méthyle valéryle (20 mg) dans 1 ml de tétrahydrofurane anhydre. On continue l'agitation pendant 2 heures, on filtre la solution réactionnelle pour éliminer la matière solide; le filtrat est soumis à la distillation sous vide et le résidu résultant est lavé au n-hexane, après quoi on purifie par le P-TLC. On soumet le produit à la recristallisation par le méthanol et l'on obtient 75 mg de 4-méthyle valérate, sous forme de cristaux incolores.

On répète les mêmes opérations en utilisant d'autres chlorures d'acide qui correspondent aux restes indiqués au tableau 5, à la place de l'acide 4-méthyle valérique et l'on prépare les produits correspondants ayant un substituant figurant dans la liste du tableau 5. Les propriétés physiques des produits sont également indiquées au tableau 5. →

Exemple 46:

i) Dans 3 ml d'acide acétique, on dissout 100 mg de TPC-A et on ajoute, tout en agitant, une solution de nitrate de cuivre (40 mg) dans 3 ml d'acide acétique. Lorsque la solution réactionnelle passe du bleu au vert, tout en continuant l'agitation, on ajoute de l'eau pour faire cesser la réaction et l'on extrait le produit à l'acétate

→

Tableau 5

Exemple	R ₁	m.p. (°C) (décomp.)	[α] _D ²⁵ (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
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

d'éthyle. On lave l'extrait avec une solution saturée de chlorure de sodium et l'on sèche cet extrait sur du sulfate de magnésium anhydre, après quoi l'extrait est soumis à une distillation sous vide pour éliminer le solvant et l'on recristallise le produit par le méthanol, ce qui donne un composé nitré de TPC-A en position α-phénolique de celui-ci (108 mg), sous forme de cristaux en aiguilles jaunes, d'un point de fusion de 244-250 (avec décomposition) et d'une valeur [α]_D²⁵ de -232 (CHCl₃).

ii) Le produit réactionnel de l'étape i) est traité par le diazométhane et l'on recristallise le produit par le méthanol, de manière à former un composé nitré du dérivé méthyléther de TPC-A, se présentant sous la forme de cristaux incolores, d'un point de fusion de 225-232°C (avec décomposition) et d'une valeur [α]_D²⁵ de -187 (CHCl₃).

Exemple 47:

i) A 7,5 ml d'eau, on ajoute 90 mg de borohydrure de sodium, puis, sous agitation, une petite quantité de Pd/C à 5%; on ajoute ensuite, goutte à goutte 130 mg du produit (exemple 46 i) dans 15 ml de méthanol. Une fois la réaction terminée, on ajoute de l'eau et le produit réactionnel est extrait à l'acétate d'éthyle. L'extrait est lavé avec une solution saturée de chlorure de sodium, séché sur du sulfate de magnésium anhydre, puis le solvant est séparé par distillation sous vide, après quoi on purifie par P-TLC pour former le composé aminé de TPC-A en position α-phénolique de celui-ci (64 mg), de point de fusion 238-243°C (décomposition) et de valeur [α]_D²⁵ de -199 (CHCl₃).

ii) Le produit obtenu dans l'exemple 46 ii) est traité selon les opérations précitées (i) et le produit résultant est soumis à une recristallisation au méthanol, ce qui donne un composé aminé du dérivé méthyléther de TPC-A, de point de fusion 225 à 231°C (décomposition), avec [α]_D²⁵ -198 (CHCl₃).

Exemple 48:

Dans 10 ml de 1,2-diméthoxyéthane anhydre, on dissout 100 mg du dérivé méthyléther de TPC-A et l'on ajoute 240 mg d'alumine-fluorure de potassium et une quantité en excès d'iodure de méthyle, et le mélange est protégé de la lumière, tout en continuant l'agitation pendant une nuit, à température ambiante. Une fois la réaction terminée, la solution est filtrée, le filtrat est soumis à une distillation sous vide pour éliminer le solvant, et le résidu obtenu est purifié par P-TLC, après quoi on recristallise par le méthanol, ce qui donne un dérivé N-méthylé du méthyléther de TPC-A (98 mg), sous forme de cristaux incolores ayant un point de fusion de 285 à 292°C (avec décomposition) et une valeur [α]_D²⁵ de -166 (CHCl₃).

Exemple 49:

Dans 5 ml de DMF anhydre, on dissout 225 mg de TPC-A et on ajoute 11 mg d'hydrure de sodium, en refroidissant par de la glace et tout en agitant. Selon une méthode conventionnelle, on ajoute à la solution 187 mg de bromure d'acétyle D-glucose dérivé de l'acétyle D-glucose, puis on continue l'agitation pendant 20 heures à température ambiante. Une fois la réaction terminée, on ajoute

50 ml d'acétate d'éthyle et on lave la solution deux fois avec de l'eau glacée (20 ml à chaque fois), et deux fois avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (20 ml à chaque fois), la solution étant ensuite séchée sur du sulfate de magnésium anhydre et soumise à une distillation sous vide pour éliminer le solvant, ce qui permet d'obtenir environ 300 mg de produit, sous la forme d'une substance blanche ou jaune clair très huileuse. A la matière huileuse ainsi obtenue, on ajoute 10 ml d'une solution aqueuse de carbonate de potassium à 5% et 10 ml de méthanol; le mélange est chauffé au reflux pendant 1 heure, sous agitation, après quoi on ajoute 30 ml d'eau glacée et l'on extrait trois fois avec 30 ml d'acétate d'éthyle. L'extrait combiné est ensuite lavé avec 50 ml d'une solution aqueuse de chlorure de sodium, séché ensuite sur du sulfate de magnésium anhydre et soumis à une distillation sous vide pour séparer le solvant, ce qui donne environ 200 mg d'un produit solide blanc. Le produit est soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice et élué avec un solvant mixte chloroforme-méthanol (10:0,5) pour éliminer la partie soluble, puis élué avec le même solvant mixte (10:2), et les fractions éluées sont rassemblées. On obtient ainsi 53 mg de composé glucoside de TPC-A, ayant un point de fusion de 210 à 216 °C (avec décomposition) et une valeur $[\alpha]_D^{25}$ de -203 (EtOH).

Essais sur les animaux

Au cours de ces essais sur les animaux, l'action antinéoplasique à l'encontre d'une tumeur implantée a été examinée, *in vivo*, en ce qui concerne les composés selon l'invention, en utilisant des souris CDF1.

Dans la cavité péritonéale des souris de chaque groupe comprenant six souris CDF1 par groupe, 10⁶ 0,1 ml de cellules P-388 ou 10⁶ 0,1 ml de cellules L-1210 furent implantés. Durant 24 heures à 5 jours après implantation des cellules, la quantité désirée des composés de l'invention a été administrée par voie intrapéritonéale, à raison de 0,05, 0,5, 2, 4 ou 10 mg/kg. En ce qui concerne les groupes témoins de souris CDF1, les cellules P-388 et L-1210 furent implantées de la même manière et se développèrent sans administration des composés. La différence des taux d'apoptose entre eux fut observée et les résultats sont indiqués au tableau 6. →

En ce qui concerne les essais de protection visant à confirmer le caractère antinéoplasique de certains composés, on sait qu'il existe dans la technique, deux types d'essai, l'un étant un essai «*in vitro*», dans lequel on utilise des cellules de carcinome en propagation dans un tube à essai, l'autre étant un essai «*in vivo*», dans lequel on utilise des animaux auxquels on a implanté des cellules de carcinome. Au Japon, l'essai «*in vivo*» est habituellement effectué en utilisant la tumeur d'Ehrlich, les cellules L-1210, les cellules 180 du sarcome, le sarcome Yoshida ou la tumeur ascite du foie, en tant que tumeur ascite, et le carcinome immobilisé, mentionné ici sous l'appellation de carcinome fixé. Récemment, on a mis au point une nouvelle méthode de confirmation du caractère antinéoplasique, méthode dans laquelle on utilise des cellules de leucémie lymphocytaires P-388. Il est connu que les P-388 ont une sensibilité plus marquée que les L-1210. Comme carcinome fixé, on peut mentionner, par exemple, le cancer du poumon de Lewis, le mélanome B-16, les MM2, MOPC 104E, Colon 26, MH 134, C-1498 et analogue.

Les nouveaux composés de l'invention se sont révélés efficaces vis-à-vis des cellules P-388, au vu des résultats des essais de protection qui viennent d'être décrits. En outre, on a trouvé que les dérivés éthers et les dérivés estérifiés de TPC-A étaient efficaces vis-à-vis de la tumeur ascite autre que P-388; en particulier les dérivés acétyl-ester, ester de l'acide caprique et n-hexyléther de TPC-A se sont également révélés efficaces vis-à-vis du mélanome B-16, du MM2 (voir tableau 7).

(Tableau en tête de la page suivante)

Essais de toxicité

Pour les composés de l'invention, la dose létale a été déterminée comme suit.

Tableau 6

P388 Composé	T C (%)				
	dose (mg/kg)				
	0,05	0,5	2	4	10
Témoin	100	100	100	100	100
TPC-A					187,4
Méthyléther 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	
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		
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
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		
Ex. 29	126,7	146,7	166,7		168,9
Ex. 30	122,0	146,3	151,6		150,6
Ex. 32	127,3	155,6	175,6		183,3
Ex. 40	111,6	133,9	152,1		
Ex. 41	117,9	147,4	158,9		
Ex. 42	114,6	140,0	159,2		
Ex. 43	116,6	142,9	154,2		
Ex. 44	116,6	150,1	155,3		
Ex. 45	121,7	145,0	162,5		

En utilisant des souris mâles CD-1 (ICR) de 4 semaines, comprenant 5 à 10 souris par groupe, la quantité désirée de chaque composé de l'invention fut mise en suspension dans une solution CMC à 0,5%, et la suspension obtenue fut administrée à chaque souris par voie intrapéritonéale ou par voie intraveineuse. En observant l'état des souris (*vie* ou *mort*), ainsi que le symptôme général pendant 7 jours après administration des composés, la valeur LD₅₀ pour chaque composé fut estimée à partir de la population létale observée en se basant sur la méthode Litchfield-Wilcoxon. Les résultats sont indiqués au tableau 8.

Tableau 8

LD ₅₀ et limite de confiance à 95% (mg/kg)			
Mode d'administration	TPC-A	Méthyléther de TPC-A	Acétyl-ester de TPC-A
Intrapéritonéale	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 (15,2-26,3)

Comme cela ressort des résultats indiqués au tableau 8, les valeurs LD₅₀ des composés précités sont plus faibles dans le cas de l'administration par voie intrapéritonéale que par voie intraveineuse. La tendance est entièrement différente de celle des médicaments habituels.

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.)
		T.C (%)	T.C (%)	T.C (%)	T.C (%)
Méthyléther de TPC-A	0,01	130,1	105,6	—	—
	0,5	156,7	118,6	133,8 (p.25 mg/kg)	103,1 (0,2 mg/kg)
	1	159,9 (TR = 400)	120,7	135,3	103,1
	2	164,2	129,3	139,1	118,4
	4	173,6	137,3 (5 mg/kg)	143,0	90,8 (5 mg/kg)
Ex. 22	0,05	133,3	100,9	—	—
	0,5	155,6	110,0	116,9	102,5
	2	168,9 (TR = 278)	114,4	128,5	109,2
	5	175,8	120,0	147,8 (4 mg/kg)	117,8
	10	194,7	128,9	141,1 (8 mg/kg)	120,9
Ex. 2	0,05	130,4	—	—	—
	0,5	143,5	115,6	130,5	110,3
	2	150,0 (TR = 100)	126,6	158,2	129,3 (3/6 60 <)
	4	—	130,9	136,2	161,8 (1/7 60 <)
	5	176,1	—	—	—
Ex. 21	0,01	133,7	—	—	—
	0,1	135,9	—	—	—
	0,5	— (TR = 200)	115,6	143,5	112,1
	2	152,2	126,6	152,0	127,3 (2/6 60 <)
	5	—	67,3 (10 mg/kg)	165,5	93,9 (10 mg/kg)

Essais concernant d'autres effets pharmacologiques

On a trouvé que chaque composé de l'invention présentait un effet antinéoplasique, au vu des résultats des essais sur les animaux précédemment décrits.

Lors de ces essais, on a étudié d'autres effets pharmacologiques pouvant être obtenus à l'aide de ces composés.

Chaque composé de l'invention fut administré par voie intrapéritonéale à des souris CD-1 (IRC) de 4 semaines (Nippon Charles Liver K.K.) à une dose de 1 à 20 mg/kg, en utilisant des groupes comprenant 3 souris par groupe. Le symptôme de la souris fut observé toutes les 30 minutes après administration du composé, pendant 180 minutes. L'observation fut faite suivant la méthode d'Arwin modifiée et de Smith, c'est-à-dire suivant une méthode d'observation neuropharmacologique multidimensionnelle.

Par comparaison entre le symptôme observé et les modèles d'action pharmacologique résultant des médicaments connus, on a trouvé que chaque composé de l'invention présentait les effets pharmacologiques suivants.

Tableau 9

Composé	Effet pharmacologique observé
TPC-A	Action émétique, action anorexigénique, action psychotrope, action vasoconstrictrice, action papavérinique, action antiparinsonnienne.
Méthyléther de TPC-A	Action émétique, action anorexigénique.
Ester d'acide acétique de TPC-A	Action émétique, action psychotrope, action antidiurétique.

FIG. I

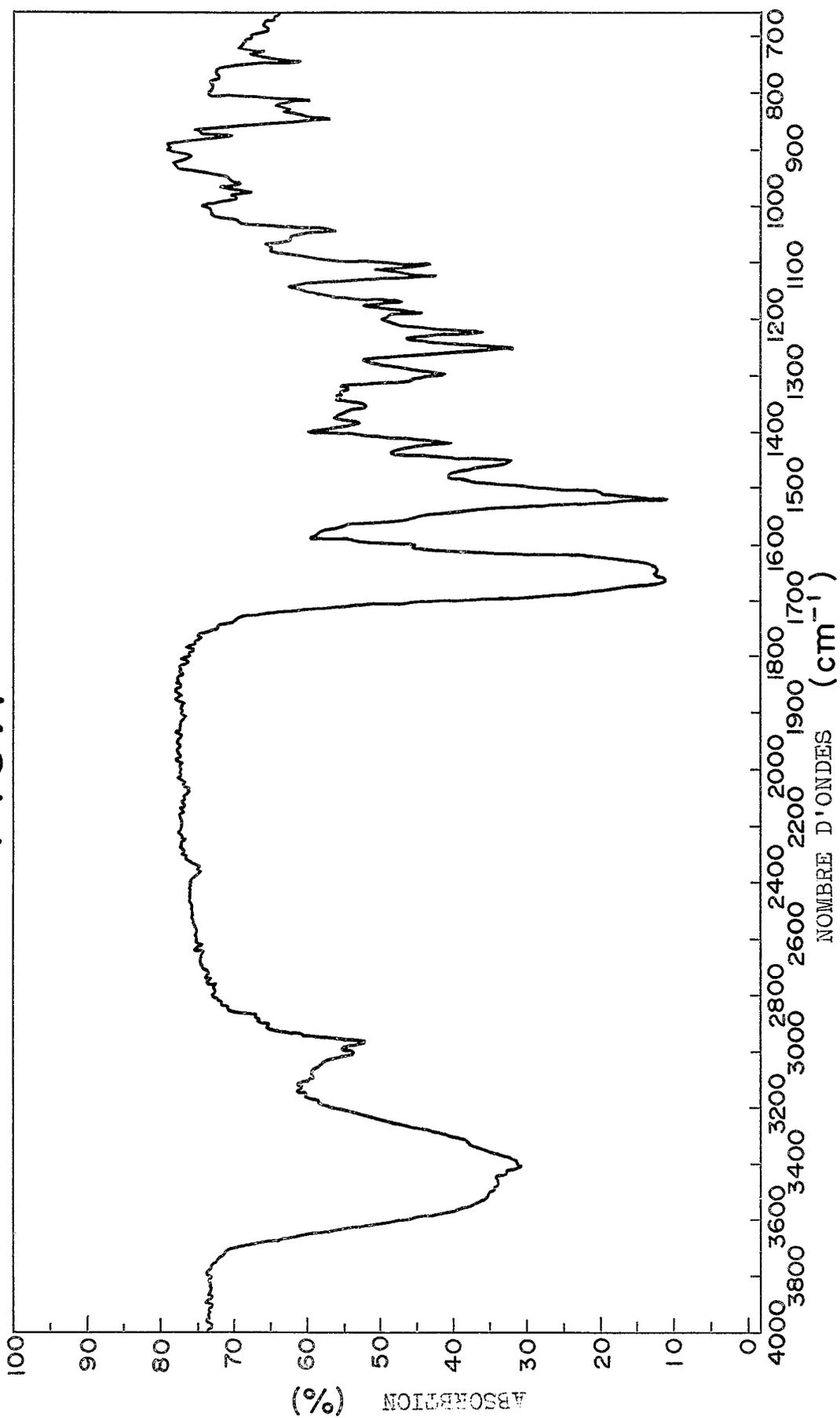


FIG. 2

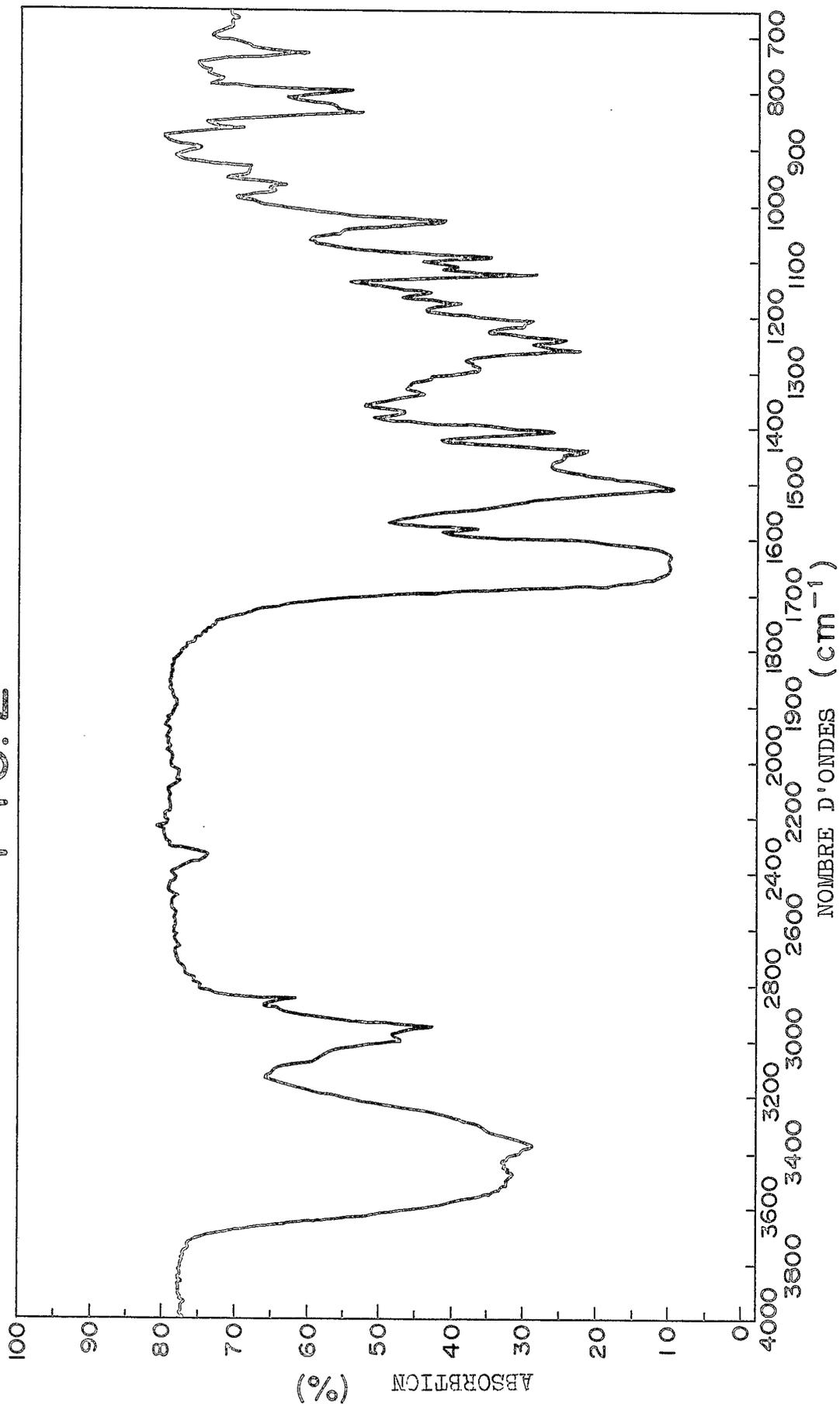


FIG.3

