

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 15507

(54) Glycosides d'anthracycline, procédé pour leur préparation et leur emploi comme médicament.

(51) Classification internationale (Int. Cl. ³). C 07 H 15/24; A 61 K 31/70.

(22) Date de dépôt..... 14 septembre 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : GB, 18 septembre 1981, n° 8128252.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 12 du 25-3-1983.

(71) Déposant : SOCIETE FARMITALIA CARLO ERBA SPA. — IT.

(72) Invention de : Giuseppe Cassinelli, Federico Arcamone et Anna Maria Casazza.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Boettcher,
23, rue La Boétie, 75008 Paris.

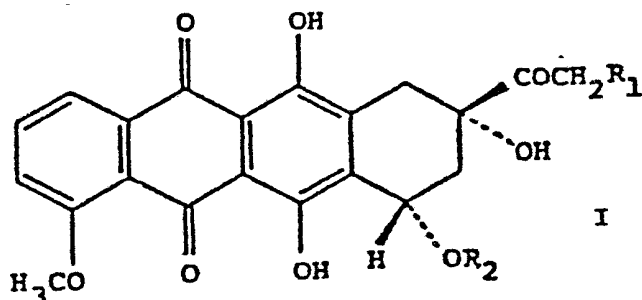
L'invention a pour objet une nouvelle classe de glycosides d'anthracycline à activité antibiotique, qui sont apparentés à la daunorubicine et à la doxorubicine ; elle a aussi pour objet un procédé pour leur
 5 préparation et des compositions pharmaceutiques les contenant en vue de leur emploi comme médicament pour le traitement de certaines tumeurs chez les mammifères.

La daunorubicine et la doxorubicine auxquelles les composés de l'invention sont apparentés sont toutes
 10 deux connues et utilisées comme antibiotiques antitumoraux et sont aussi, toutes deux, amplement décrites dans la littérature. En outre, les matières de départ pour l'obtention des composés de l'invention, la 3',4'-diépi-daunorubicine et la 3',4'-diépi-doxorubicine, sont également toutes
 15 deux des composés connus décrits dans le brevet américain n° 4 112 076 qui appartient à la déposante.

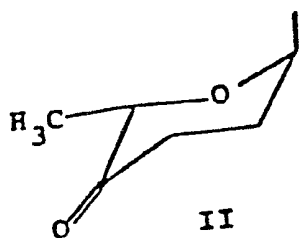
L'invention se rapporte, sous l'un de ses aspects, à une nouvelle classe de glycosides d'anthracycline de formule I

20

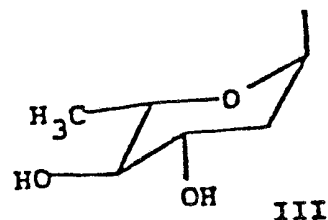
25



dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe hydroxy tandis que R_2 est un résidu α -L-pyranosyle de formule II
 30 ou III



ou



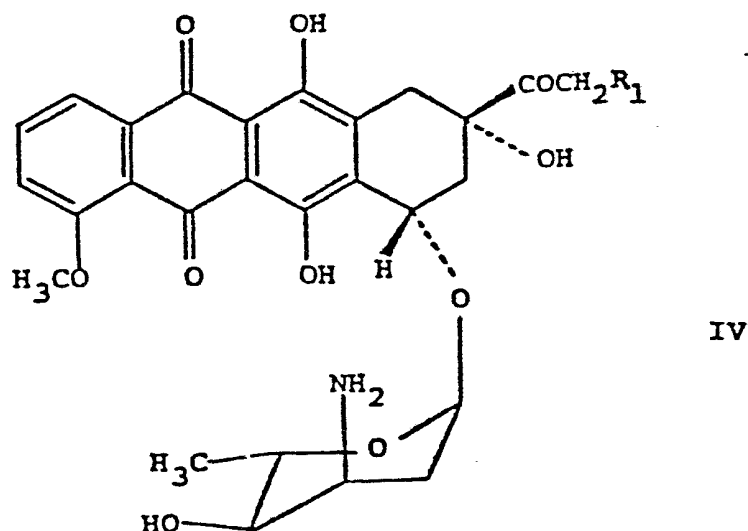
Ces glycosides d'anthracycline contiennent une moitié neutre glycosidique, soit la 2,3,6-tridésoxy- α -L-glycéro-hexopyranoside-4-ulosyle (α -L-cinérulosyle, II) ou la 2,6-didésoxy- α -L-arabino-hexopyranosyle (III) et sont désignés comme suit :

- 5 (1) 3'-désamino-4'-déhydro-daunorubicine (I: $R_1=H$; $R_2=II$) (appelée plus loin composé I-A) ;
- (2) 3'-désamino-3'-hydroxy-4'-épi-daunorubicine (I: $R_1=H$, $R_2=III$) (appelée plus loin composé I-B) ;
- (3) 3'-désamino-4'-déhydro-doxorubicine (I: $R_1=OH$, $R_2=II$)
- 10 (appelée plus loin composé I-C) ;
- (4) 3'-désamino-3'-hydroxy-4'-épi-doxorubicine (I: $R_1=OH$, $R_2=III$) (appelée plus loin composé I-D).

Selon un autre aspect, l'invention se rapporte à un procédé pour la préparation des glycosides d'anthracycline ci-dessus. Ces nouveaux composés sont préparés à

15 partir de 3',4'-diépi-daunorubicine (IV, $R_1=H$) et de 3',4'-diépi-doxorubicine (IV, $R_1=OH$), ces deux glycosides d'anthracycline étant connus et décrits dans le brevet américain déjà cité n° 4 112 076

20



Le procédé de préparation des nouveaux composés comprend la désamination des glycosides d'anthracycline de formule IV dans lesquels un groupe amino axial avoisine un groupe hydroxy équatorial ; on poursuit par la voie d'un

intermédiaire diazoté pour obtenir les composés I-A et I-C comme résultat de la migration de l'hydrure à partir de la position C-4' et les composés I-B et I-D par simple attaque nucléophile de l'eau à la position C-3'.

5 La réaction de désamination est exécutée de préférence à l'aide de nitrite de sodium dans un milieu acide aqueux froid mais elle pourrait, en variante, être effectuée avec du trioxyde d'azote (N_2O_3) ou de nitrites d'alkyle dans un milieu froid aqueux ou alcoolique.

10 Les nouveaux glycosides d'anthracycline de l'invention ont une activité antitumorale. En particulier, la 3'-désamino-3'-hydroxy-4'-épi-doxorubicine (I-D) montre une activité remarquable sur les tumeurs expérimentales chez la souris. En conséquence, l'invention couvre aussi,
15 selon ses autres aspects, les compositions pharmaceutiques comprenant une quantité efficace thérapeutiquement d'un glycoside d'anthracycline de formule I en mélange avec un diluant ou un véhicule pharmaceutiquement acceptable en vue du traitement de certaines tumeurs chez les mammifères par
20 administration à un malade affligé de ces dernières de quantités de ces composés ayant une efficacité thérapeutique.

On donnera maintenant des exemples de préparation des composés de l'invention et les résultats d'essais biologiques prouvant leur activité.

25 EXEMPLE 1

3'-désamino-4'-déhydro-daunorubicine (I-A) et 3'-désamino-3'-hydroxy-4'-épi-daunorubicine (I-B)

Une solution de 0,55 g ; 1 mmole de chlorhydrate de 3'-4'-diépi-daunorubicine (IV: $R_1=H$) dans 25 ml d'eau a
30 été refroidie à 0°C puis traitée à l'aide de 0,72 g ; 7,5 mmols de nitrite de sodium et 7,5 ml d'acide acétique aqueux 1 N en plusieurs parties pendant une durée de 20 minutes, avec agitation, à une vitesse telle que la température n'a pas excédé 0°C. Après 3 heures à 0°C, le mélange
35 en réaction contenant un précipité coloré en rouge a été porté à la température de la pièce. On a fait barboter de l'azote à travers la solution pour éliminer l'excès d'acide nitreux et on a soumis la solution à extraction à

- l'aide de chloroforme. L'extract chloroformique a été lavé à l'eau, séché sur du sulfate de sodium anhydre, soumis à évaporation jusqu'à un faible volume et à chromatographie sur une colonne de gel de silice. L'élution de la colonne à l'aide de chloroforme a procuré la 3'-désamino-4'-déhydro-daunorubicine (I-A) sous forme d'un solide amorphe ayant un point de fusion de 143-144°C (avec décomposition) ;
- $[\alpha]_D^{23} = +190^\circ$ ($c = 0,05$, dans le méthanol). Spectres U.V. et Vis. : $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 235, 253, 290, 480, 496 et 530 nm
- 10 $(E_{1\text{ cm}}^{1\%})$ 808, 557, 188, 236, 242 et 143). Spectre du champ de désorption de masse : m/z 510 ($M^{+\cdot}$); 398 et 562. Spectre RMN- ^1H (CDCl_3): 1,36 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H, CH_3 -5'); 1,70-2,40 (m, 6H, H-8 , H-2' , H-3'); 2,41 (s, 3H, COCH_3); 2,97 (d, $J = 19,5$ Hz, 1H, H-10_{ax}); 3,25 (dd, $J = 19,5$ Hz, 1H, H-10_{eq}); 4,09 (s, 3H, OCH_3); 4,40 (q, $J = 6,5$ Hz, 1H, H-5'); 4,62 (s, 1H, OH-9); 5,41 (m, 1H, H-7); 5,67 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H, H-1'); 7,30-8,10 (m, 3H, protons aromatiques); 13,29, 14,01 δ (deux s, 2H, OH-6 , OH-11).

- Une élution supplémentaire de la colonne avec un mélange 97:3 chloroforme:acétone a donné la 3'-désamino-3'-hydroxy-4'-épi-daunorubicine (I-B) qui a un point de fusion de 165-170°C (avec décomposition), $[\alpha]_D^{20} = +350^\circ$ ($c = 0,025$, dans le méthanol). Spectres U.V. et Vis. : $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 235, 254, 290, 480, 496 et 530 nm $(E_{1\text{ cm}}^{1\%}) = 714, 509, 154, 226,$
- 25 231 et 142). Spectre du champ de désorption de masse m/z 528 ($M^{+\cdot}$); 398, 362. Spectre RMN- ^1H (CDCl_3): 1,36 (d, $J = 6,0$ Hz, 3H, CH_3 -5'); 1,60-2,40 (m, 4H, H-8 , H-2'); 2,41 (s, 3H, COCH_3); 2,86 et 3,30 (deux d, $J = 19$ Hz, 2H, H-10); 3,5-4,0 (m, 2H, H-3' , H-4'); 4,07 (s, 3H, OCH_3); 4,65 (m, 1H, H-5'); 5,25 (m, 1H, H-7); 5,48 (m, 1H, H-1');
- 30

7,30-8,10 (m, 3H, protons aromatiques), 13,26, 13,98

δ (deux s, 2H, OH-6, OH-11).

EXEMPLE 2

5 3'-désamino-4'-déhydro-doxorubicine (I-C) et 3'-désamino-
-3'-hydroxy-4'-épi-doxorubicine (I-D)

La préparation des composés indiqués en titre (I-C) et I-D) à partir de 3',4'-diépi-doxorubicine (IV : $R_1=OH$) a été exécutée conformément au processus décrit à l'exemple 1.

- 10 On a obtenu la 3'-désamino-4'-déhydro-doxo-
 rubicine (I-C) sous forme d'une poudre colorée en rouge
 ayant un point de fusion de 140°C (avec décomposition),
 $[\alpha]_D^{20} = +145$ (c=0,046, dans le méthanol). Spectres
 U.V. et Vis. : $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 235, 254, 290, 490, 496 et 530 nm
- 15 ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 690, 490, 190, 228, 230, 140). Spectre du champ de
 désorption de masse: m/z 526 ($M^{+\bullet}$), 414, 336. Spectre
 RMN- ^{13}C (CDCl_3): 14,9 (C-6'); 27,6 (C-2'); 33,1 (C-3');
 33,9 (C-10); 35,9 (C-8); 56,6 (O- CH_3); 65,4 (C-14);
 68,9 (C-7); 71,3 (C-5'); 76,6 (C-9); 100,3 (C-1') ;
- 20 118,5 (C-3); 119,8 (C-1, C-4a); 133,7 (C-6a, C-10a, C-12a);
 135,8 (C-2); 155,6 (C-11); 156,1 (C-6); 161,0 (C-4) ;
 186,9 (C-5, C-12); 210,3 (C-4') et 213,9 δ (C-13).

- De manière similaire, on a obtenu la 3'-désamino-
 -3'-hydroxy-4'-épi-doxorubicine (I-D) sous forme d'une
- 25 poudre colorée en rouge ayant un point de fusion de 176-180°C
 (avec décomposition); $[\alpha]_D^{23} = +280$ (c=0,046, dans le
 méthanol). Spectres U.V. et Vis. : $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3}$ 235, 254, 290,
 480, 496 et 532 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 674, 478, 186, 223, 228$ et 148).
 Spectre du champ de désorption de masse: m/z 544 ($M^{+\bullet}$), 414,
- 30 378, 336. Spectre RMN- ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD}:\text{CDCl}_3$, 1:1 en volume):

17,8 (C-6'); 33,9 (C-10); 36,3 (C-8); 3,80 (C-2');
 57,0 (OCH_3); 65,4 (C-14); 68,8 (C-7); 69,8 (C-3', C-4');
 77,0 (C-9); 77,9 (C-5'); 101,4 (C-1'); 119,3 (C-3, C-4a);
 120,3 (C-1) ; 134,3 et 135,8 (C-6a, C-10a, C-12a) ;
 5 136,5 (C-2); 155,7 (C-6, C-11); 161,6 (C-4); 187,3
 (C-12) ; 187,6 (C-5) et 214,2 δ (C-13).

Activité biologique

L'activité cytotoxique des nouveaux glycosides d'anthracycline de l'invention a été vérifiée contre les
 10 cellules He La in vitro (temps d'exposition aux composés :
 24 heures) en comparaison avec celle de la daunorubicine et
 celle de la doxorubicine. Les résultats sont portés sur le
 tableau 1 qui suit.

Test d'inhibition d'une colonie de cellules HeLa in vitro

15	Composé	DI ₅₀ (ng/ml)
	Daunorubicine.HCl	12
	Composé I-A	350
	Composé I-B	60
	Doxorubicine.HCl	11
20	Composé I-C	40
	Composé I-D	25

Certains des composés de l'invention ont montré
 des résultats supérieurs à ceux de la daunorubicine et de
 la doxorubicine quand ils ont été essayés contre les leucé-
 25 mies des murinés P-388 et L 1210, spécialement quand ils
 ont été administrés par voie orale. Des résultats de
 l'activité antitumorale contre les différentes leucémies
 des murinés sont portés sur les tableaux 2, 3 et 4 qui
 suivent.

Tableau 2. Activité antitumorale contre la leucémie P388.
 Traitement par voie ip le jour 1.

Composé	Dose (mg/kg)	T/C ^a %	LTS ^b	Morts par toxicité ^c
Daunorubicine ^d	2,9	170,150	0/9,0/10	0/9,0/10
	4,4	154,150,155	0/8,0/9,0/10	2/8,3/9,0/10
	6,6	145,150,160	0/8,0/9,0/10	7/8,5/9,0/10
Composé I-A ^d	30,8	109	0/8	0/8
	30	127	0/8	0/8
	60	160,165	0/3,0/10	0/3,2/10
	78	95	0/10	5/10
	101	100	1/10	5/10
Doxorubicine ^e	4,4	170	0/10	0/10
	6,6	160	0/10	6/10
Composé I-B ^e	15	180	0/5	0/5
	20	290	0/5	0/5
	26	160	0/5	3/5
Doxorubicine ^e	4,4	225	0/8	0/8
	6,6	290	1/8	0/8
	10	300	2/8	0/8
Composé I-C ^e	10	170	2/10	0/10
	15	180	0/8	0/8
	22,5	210	0/8	0/8
	33,7	230	1/8	0/8
Doxorubicine ^f	4,4	245,223	0/10,0/10	0/10,0/10
	6,6	255,258	1/10,0/10	0/10,0/10
	10	345,282	2/10,1/10	0/10,0/10
Composé I-D ^f	6,6	250	1/10	0/10
	10	290	3/10	0/10
	15	> 630, > 658	6/10,6/10	0/10,1/10
	22,5	> 630, > 658	9/10,5/10	0/10,2/10
	33,7	194	3/10	5/10
	50,5	76	1/10	7/10

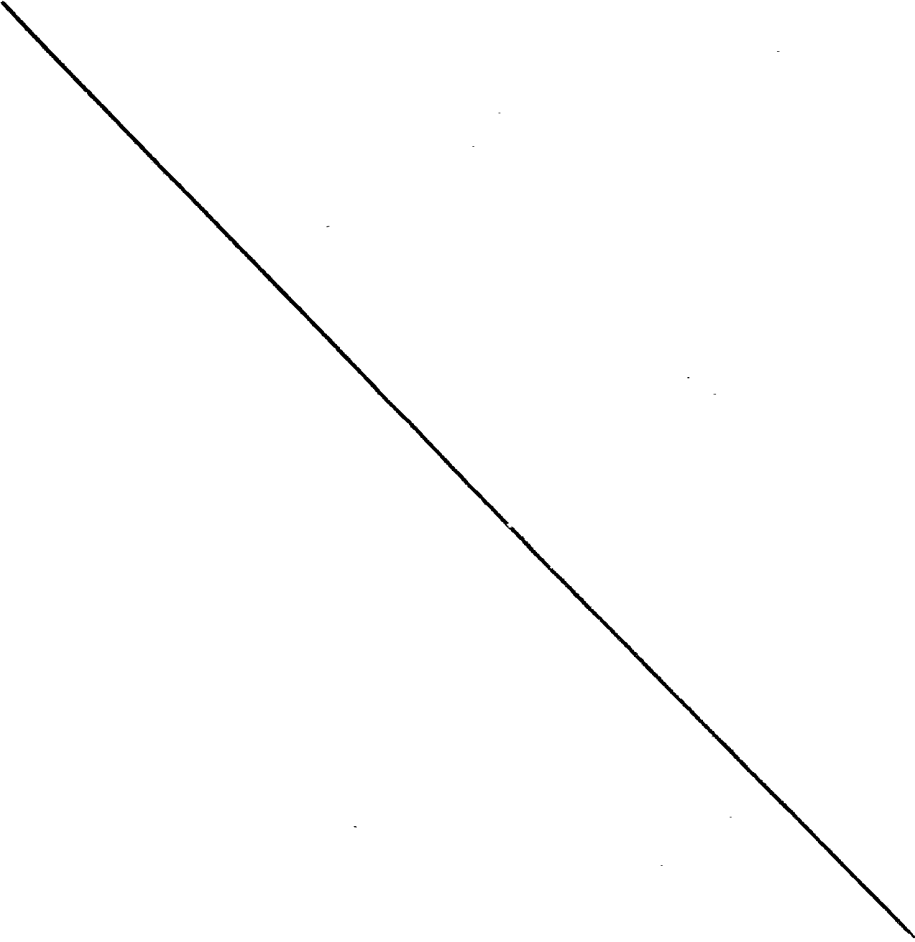
- a Temps médian de survie; % par rapport aux témoins non traités
 - b Survivants à long terme (\geq 60 jours)
 - c Evaluation basée sur les constats d'autopsie des
5 souris mortes.
 - d Résultats obtenus de trois essais
 - e En solution dans Tween 80 à 10%
 - f En solution ou en suspension dans H₂O; résultats
obtenus de deux essais.
- 

Tableau 3. Effet du composé I-D contre la leucémie de la souris.

Tumeur	Voie	T r a i t e m e n t			T/C a %	LTS ^b	Morts par toxicité c
		Jours	Véhicule	Composé Dose ^e mg/kg			
Gross	iv	1	H ₂ O	Doxorubicine	10	200	0/8
					13	241,275	1/18
					16,9	233,175	6/18
				Composé I-D	13,3	183	0/7
					26,6	225	0/8
					39,9	250	3/8
						133	0/7
				Composé I-D	26	158	0/10
L1210	ip	1	Tween ^e		33,9	158	0/10
					44	158	0/10
						166	0/10
				Doxorubicine	4,4	166	0/10
					6,6	177	0/10
					10	3/10	0/6
					8,8	>600	0/6
				Composé I-D	13,3	505	0/6
					20	238	2/8
						157	0/10
				Doxorubicine	10	178	0/10
					13	185	0/10
					16,9	185	0/9
					13,3	264	0/8
				Composé I-D	20	600	0/8
					30	3/8	0/8

a, b, c : voir tableau 2

d résultats de deux essais

e Tween 80 à 10% dans H₂O

Tableau 4. Effet du composé I-C contre la leucémie de Gross

Composé	Véhicule	Voie	Dose (mg/kg)	T/C ^a %	LTS ^b	Morts par toxi- ^c cité
Doxorubicine	Tween 80 ^d	iv	13 ^e	214,275,242	0/20	0/20
			16,9 ^e	228,175,250	1/28	8/28
Composé I-C	"	iv	40 ^f	185,250	0/17	2/17
			48	116	0/10	7/10
			57,6	116	0/10	10/10
Composé I-C	"	orale	40	192	0/8	0/8
			48	200	0/8	0/8
			57,6	200	0/8	2/8

a, b, c voir tableau 2

d voir tableau 3

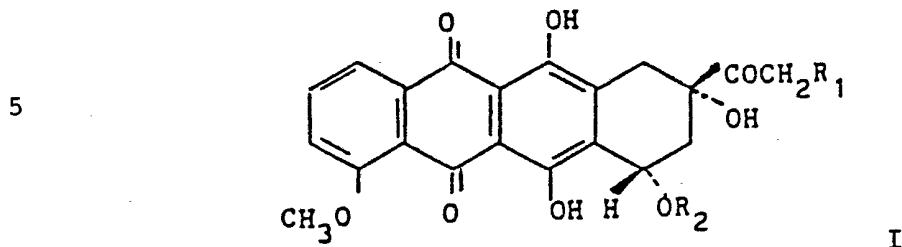
e résultats de trois essais

f résultats de deux essais

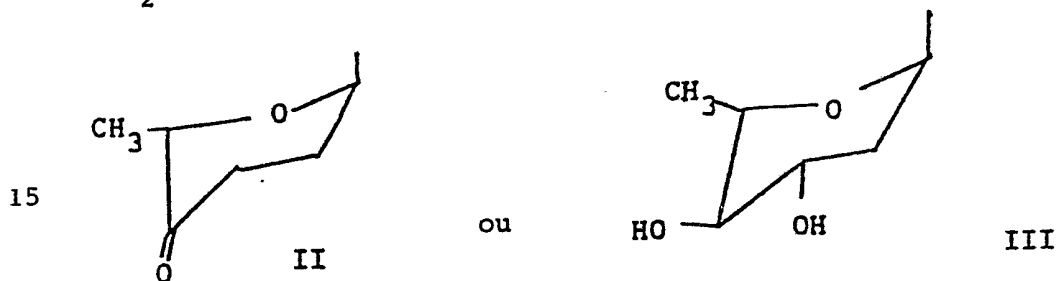
Des variations et des modifications peuvent bien entendu être apportées au procédé de l'invention sans que l'on sorte pour autant de son cadre ou de son esprit.

REVENDICATIONS

1. Glycosides d'anthracycline de formule I :



dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe hydroxy
10 et R_2 est :



2. Composé selon la revendication 1 constitué par la 3'-désamino-4'-déhydro-daunorubicine.

20 3. Composé selon la revendication 1 constitué par la 3'-désamino-4'-déhydro-doxorubicine.

4. Composé selon la revendication 1 constitué par la 3'-désamino-3'-hydroxy-4'-épi-daunorubicine.

25 5. Composé selon la revendication 1 constitué par la 3'-désamino-3'-hydroxy-4'-épi-doxorubicine.

30 6. Composition pharmaceutique comprenant une quantité efficace au point de vue thérapeutique d'un glycoside d'anthracycline selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, de préférence en combinaison avec un véhicule inerte approprié.

7. Procédé pour la préparation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisé en ce qu'on fait réagir séparément, à 0°C environ, une solution aqueuse de chlorhydrate de 3',4'-diépi-daunorubicine ou de chlorhydrate de 3',4'-diépi-doxorubicine avec

35

du nitrite de sodium et de l'acide acétique aqueux 1 N en vue d'obtenir, respectivement, des mélanges désaminés de a) les glycosides de formule I dans laquelle R_1 est H et R_2 est II ou III ou b) les glycosides de formule I dans laquelle R_1 est OH, R_2 est II et III, mélanges que l'on soumet chacun séparément à séparation chromatographique sur gel de silice en éluant d'abord avec du chloroforme puis ensuite avec le mélange chloroforme-acétone 97:3 (en volume) pour recueillir chacun des composés de formule I à partir de son mélange respectif sous forme d'une base libre à l'état pur.

8. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'on exécute la réaction en une durée de 3 heures environ.