(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) **N° de publication :** **2 843 751**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **02 10407**

(51) Int Cl[7] : **C 07 D 521/00,** C 07 D 409/06, C 07 C 49/172, 47/56, A 61 K 31/385, 31/343, 31/39, 31/12, 31/11, A 61 P 35/00 // (C 07 D 521/00, 339:00, 307:78) (C 07 D 409/06, 339:08) (C 07 D 409/06, 339:06)

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 20.08.02.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 27.02.04 Bulletin 04/09.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire :** *Se reporter à la fin du présent fascicule*

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement public à caractère scientifique et technologique* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** DAO VI THUY, GASPARD CHRISTIANE et MICHELOT ROBERT.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire(s) :** GROSSET FOURNIER ET DEMACHY SARL.

(54) DERIVES DU GOSSYPOL, LEURS PROCEDES D'OBTENTION, ET LEURS UTILISATIONS.

(57) La présente invention a pour objet des dérivés du gossypol, et plus particulièrement des thiodérivés, notamment 1,3-dithiolane et 1,3-dithiane, du gossypol, de la gossypolone, et des méthyle éthers du gossypol, ainsi que leurs procédés d'obtention, et leurs utilisations, notamment dans des compositions pharmaceutiques destinées au traitement des cancers.

FR 2 843 751 - A1

DERIVES DU GOSSYPOL, LEURS PROCEDES D'OBTENTION, ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention a pour objet des dérivés du gossypol, et plus particulièrement des thiodérivés, notamment 1,3-dithiolane et 1,3-dithiane, du gossypol, de la gossypolone, et des méthyle éthers du gossypol, ainsi que leurs procédés d'obtention, et leurs utilisations, notamment dans des compositions pharmaceutiques destinées au traitement des cancers.

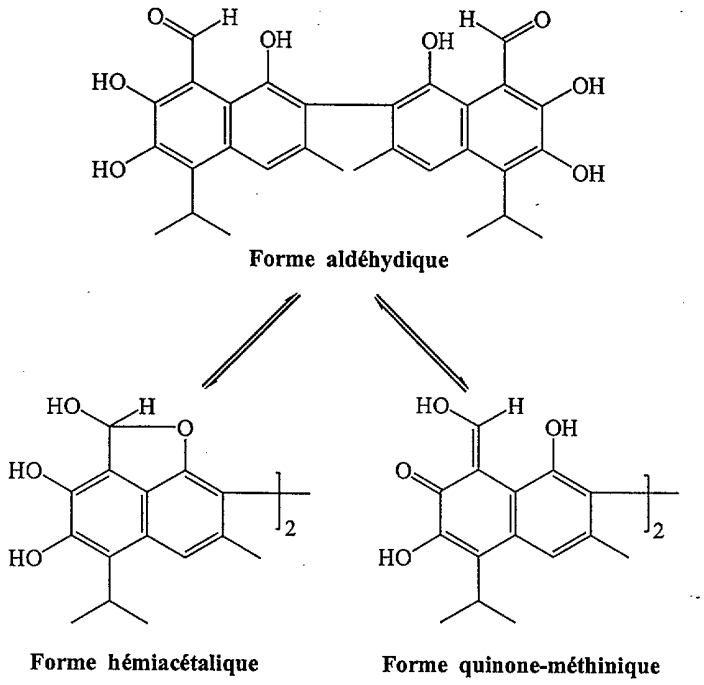
Le gossypol est généralement extrait des graines de cotonnier du genre gossypium (famille des malvacées). La teneur varie de 0,1 à 0,64% selon la variété du gossypium.

La première extraction du gossypol fut réalisée grossièrement par Kuhlmann en 1861, il appela la substance « bleu des grains de coton ». En 1866, Longmore constata que l'huile des graines du coton contient un composé coloré, isolé sous forme d'un solide brun et qui est indiscutablement du gossypol impur. Ce n'est qu'en 1899 que Marchlewski obtint la forme cristalline pure, extraite des graines de coton, qu'il appela gossypol (Adams RC et al., 1960 [(s)]).

S'inspirant des travaux de leurs prédécesseurs, Withers et Carruth, en 1915, améliorèrent d'une manière significative l'extraction du gossypol et leur méthode reste encore de nos jours un des meilleurs procédés utilisés (Adams RC et al., 1960 [(s)]).

La molécule du gossypol se présente sous forme de deux sous-unités naphtaléniques symétriques, qui sont substituées chacune par trois fonctions phénoliques et une fonction aldéhyde.

Elle existe sous trois formes tautomères représentées par les formules suivantes : formes aldéhydique, hemiacétalique et quinone-méthinique. Sa masse molaire est de : 518.5 ($C_{30}H_{30}O_8$).



formes tautomères du gossypol

L'analyse du pouvoir rotatoire du gossypol, a révélé la présence de deux isomères. Le (+) gossypol est principalement abondant dans l'écorce du thephesia populnea et certaines variétés de cotonniers (gossypium hirsutum), tandis que l'isomère lévogyre (le (-) gossypol) est prépondérant dans d'autres variétés de cotonniers telles que le gossypium barbadense *(Zhou RH & Lin XD, 1988; Cass QB et al., 1991).*

La méthode utilisée pour la mesure de l'excès énantiomérique dans les graines des différents cotonniers est celle que Matlin et Zhou ont appliquée à partir de bases de Schiff chirales du gossypol (+) ou (-) en effectuant leur séparation par HPLC *(Zhou RH & Lin XD,1988; Matlin SA et al., 1984; Fish RG et al., 1995).*

Le gossypol possède de nombreuses activités biologiques. S'il fut d'abord étudié principalement pour ses propriétés contraceptives ce sont actuellement ses activités antitumorales qui intéressent les médecins. Comme sa toxicité à doses élevées n'est pas négligeable et entraîne de multiples effets secondaires chez l'Homme, la recherche s'est orientée vers des dérivés plus sélectifs et plus toxiques pour les cellules cancéreuses.

Les nombreuses données bibliographiques sur les activités des dérivés du gossypol indiquent que l'activité est liée à la présence sur le système binaphtalénique

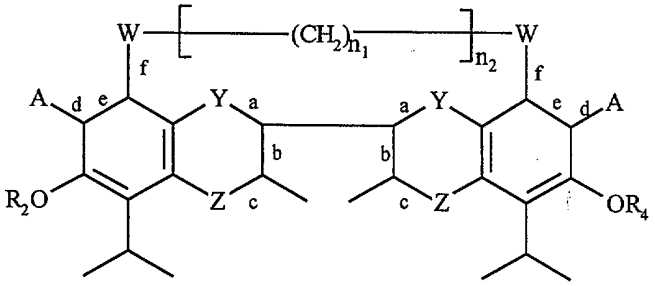
des groupements phénoliques libres en 6,6' et 7,7'. En effet, le blocage de ces fonctions phénol, dans les dérivés méthoxyethers, abolit toute toxicité. La toxicité du gossypol est aussi associée aux fonctions aldéhydes ou à la présence d'une fonction electrophile comme une enamine dans la même position. On imagine facilement que ce centre électrophile peut se lier avec nombre d'entités nucléophiles jouant un rôle important dans le milieu biologique. Par exemple, les groupements amino de la lysine des protéines ou des peptides se couplent facilement avec le gossypol.

L'invention a pour but de fournir de nouveaux dérivés de gossypol présentant l'avantage de ne pas être toxiques aux doses utilisées pour l'organisme humain ou animal, et d'être modifiés au contact des ions nitronium susceptibles d'être spécifiquement présents au niveau des tumeurs, sous forme de composés fortement cytotoxiques et donc capables de tuer spécifiquement les cellules tumorales

L'invention a également pour but de fournir de nouveaux procédés de synthèse des dérivés susmentionnés.

L'invention a aussi pour but de fournir de nouvelles compositions pharmaceutiques, notamment dans le cadre du traitement des cancers, présentant l'avantage de ne pas être toxiques aux doses utilisées pour l'organisme, et de n'exercer leur effet cytotoxique qu'au contact des cellules cancéreuses.

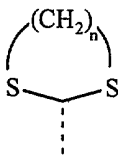
L'invention a pour objet les composés de formule générale (I) suivante :



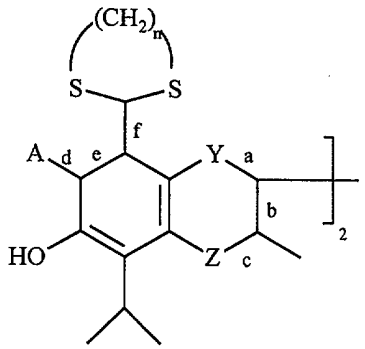
(I)

dans laquelle n_2 représente 0 ou 1, et :

- lorsque n_2 représente 0, alors R_2 et R_4 représentent H, et W représente un cycle de formule suivante :



ce qui correspond à des composés de formule (Ia) suivante :



(Ia)

dans laquelle :

- A représente O ou OH,
- n est un nombre entier de 2 à 5, et de préférence n représente 2 ou 3,
- Y représente C-OH, ou C=O,
- Z représente CH, ou C=O,

sous réserve que lorsque :

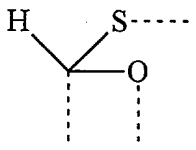
* A représente O, d et f représentent une double liaison, et e représente une simple liaison,

* A représente OH, d et f représentent une simple liaison, et e représente une double liaison,

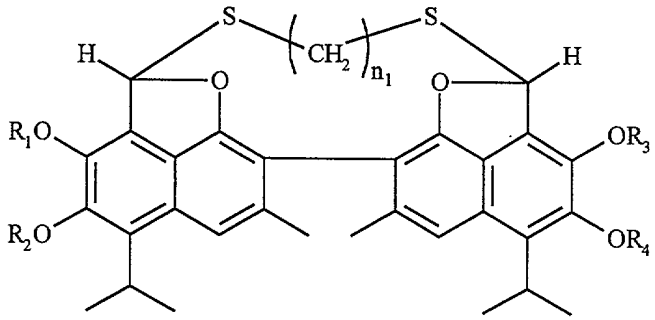
* Y représente C-OH, alors Z représente CH, a et c représentent une double liaison, et b représente une simple liaison,

* Y représente C=O, alors Z représente C=O, a et c représentent une simple liaison, et b représente une double liaison,

– et lorsque n_2 représente 1, alors A représente un groupe OR_1 ou OR_3 tel que défini ci-après, et W représente en association avec Y un groupe de formule suivante :



ce qui correspond à des composés de formule (Ib) suivante :

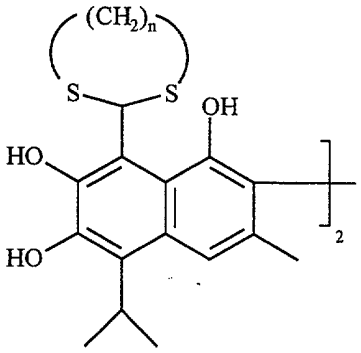


(Ib)

dans laquelle :

- n_1 est un nombre entier de 2 à 5, et de préférence n_1 représente 2 ou 3,
- R_1, R_2, R_3, et R_4, indépendamment les uns des autres, représentent un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle de 1 à 3 atomes de carbone, notamment un groupe méthyle.

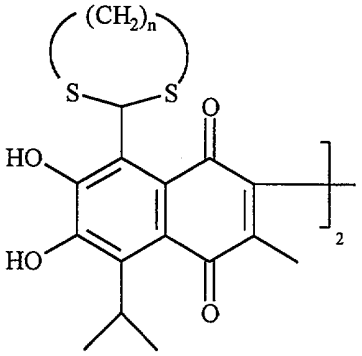
L'invention a plus particulièrement pour objet les composés de formule (Ia) susmentionnée, et à ce titre ceux de formule (Ia-1) suivante :



(Ia-1)

dans laquelle la chaîne hydrocarbonée $-(CH_2)_n-$ est telle que définie ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet encore les composés de formule (Ia-2) suivante :



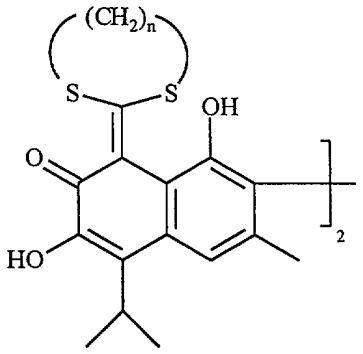
(Ia-2)

dans laquelle la chaîne hydrocarbonée $-(CH_2)_n-$ est telle que définie ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement les composés susmentionnés de formule (Ia-1) ou (Ia-2) dans laquelle n = 2, lesdits composés étant respectivement désignés dithiolanes de gossypol ou de gossypolone.

L'invention concerne plus particulièrement encore les composés susmentionnés de formule (Ia-1) ou (Ia-2) dans laquelle n = 3, lesdits composés étant respectivement désignés dithianes de gossypol ou de gossypolone.

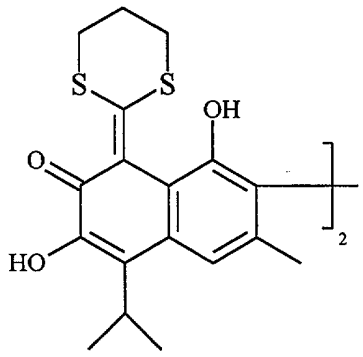
L'invention a plus particulièrement pour objet les composés de formule (Ia-3) suivante :



(Ia-3)

dans laquelle la chaîne hydrocarbonée $-(CH_2)_n-$ est telle que définie ci-dessus.

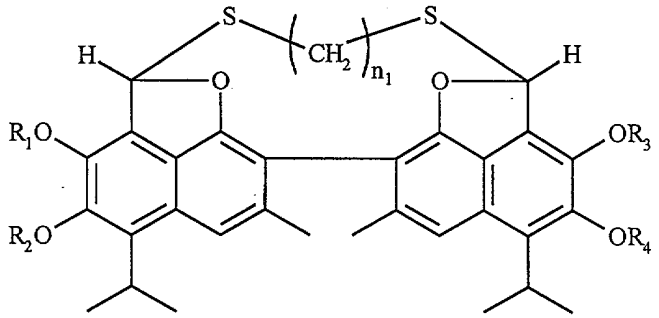
A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet le dérivé dithiane ylidène du gossypol de formule suivante :



Les composés susmentionnés de formule (Ia) sont sous forme d'énantiomères lévogyres (-), ou d'énantiomères dextrogyres (+), ou sous forme d'un mélange racémique comprenant respectivement environ 50% d'énantiomères (-), et environ 50% d'énantiomères (+).

Avantageusement, les composés susmentionnés de formule (Ia) sont sous forme d'énantiomères levogyres (-).

L'invention a plus particulièrement pour objet les composés susmentionnés de formule (Ib) suivante :



(Ib)

dans laquelle :

- n_1 représente 2 ou 3,
- R_1 et R_3 représentent un groupe méthyle, et R_2 et R_4 représentent un atome d'hydrogène,
- ou R_1, R_2, R_3, et R_4 représentent un groupe méthyle.

Avantageusement, les composés de formule (I) susmentionnés sont caractérisés en ce qu'ils sont liés à un polymère ayant un trophisme pour les tumeurs, le cas échéant par l'intermédiaire d'un espaceur.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet les composés susmentionnés de formule (I), caractérisés en ce que l'espaceur relié à un polymère ayant un trophisme pour les tumeurs, est lié à un ou plusieurs des groupements phénoliques susceptibles d'être présents sur lesdits composés, ou est lié à la ou les chaînes hydrocarbonées présentes sur ces composés, notamment dans le cas des composés de formule (Ib) dans laquelle R_1, R_2, R_3, et R_4, sont tous différents de l'hydrogène.

Avantageusement, l'espaceur susmentionné est constitué d'une chaîne hydrocarbonée ou peptidique choisie parmi celles de formules suivantes :

* -NH-(CH_2)p-CO- dans laquelle p représente un nombre entier de 2 à 5,
* -NH-AA-(AA)q-AA-CO- dans laquelle q représente un nombre entier de 2 à 5 et AA est un résidu acide aminé naturel ou non.

Avantageusement encore, le polymère susmentionné ayant un trophisme pour les tumeurs est choisi parmi le Carboxymethyl dextran (CM) ou le N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA), et sont liés à la fonction NH de l'espaceur. De tels polymères

sont décrits notamment dans les articles suivants : M. Harada, H. Sakakibara, T. Yano, T. Suzuki and S. Okuno, Determinants for the drug release from T-0128, comptothecin analogue carboxymethyl dextran conjugate,Journal of Controlled Release (2000), 69, 399-412; R. Duncan, S. Gac-Breton, R. Keane, R. Musila, Y.N. Sat, R. Satchi and F. Searle, Polymer-drug conjugates, PDEPT and PELT : basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic, Journal of Controlled Release (2001), 74, 135-146.

L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule (I) susmentionnée, le cas échéant en association avec un polymère tel que défini ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Avantageusement, les compositions pharmaceutiques susmentionnées de l'invention se présentent sous une forme destinée à l'administration par voie intraveineuse.

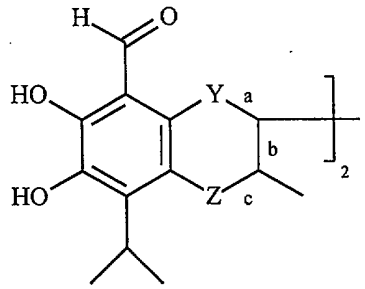
A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet toute composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus, et caractérisée en ce que la dose unitaire en composés de formule (I) en tant que principe actif desdites compositions, est d'environ 1 mg/kg/jour, à environ 25 mg/kg/jour.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation d'un composé de formule (I) susmentionnée, le cas échéant en association avec un polymère tel que défini ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers chez l'homme ou l'animal, et plus particulièrement des tumeurs solides, tels que le carcinome adrénocortical humain, le gliome humain, le cancer du sein humain, le mélanome, ou le cancer de la prostate.

L'invention concerne également l'utilisation de composés de formule (I) susmentionnée, en tant qu'intermédiaires de synthèse de nouveaux dérivés du gossypol et de la gossypolone.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation de composés de formule (I) susmentionnée, caractérisé en ce qu'il comprend le traitement du gossypol ou de la gossypolone, ou de dérivés alkyle éthers de ces derniers dont le cas échéant une ou plusieurs fonctions hydroxyles sont substituées par un groupe alkyle de 1 à 3 atomes de carbone, notamment un groupe méthyle, avec un dithiol de formule $HS(CH_2)_nSH$ dans laquelle n représente un nombre entier de 2 à 5, en présence de $BF_3.Et_2O$.

A titre d'illustration, les composés de formule (Ia) sont obtenus par réaction du dithiol de formule définie ci-dessus, en présence de $BF_3.Et_2O$, avec le gossypol ou la gossypolone regroupés dans la formule (II) suivante :

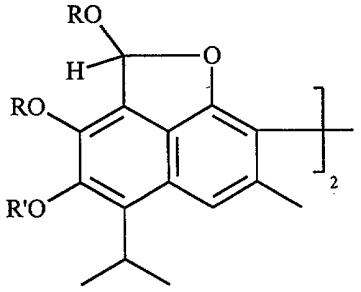


(II)

dans laquelle Y et Z sont tels que définis ci-dessus, ce qui conduit aux composés de formule (Ia-1) lorsque Y représente C-OH, Z représente CH, a et c représentent une double liaison, et b représente une simple liaison, ou aux composés de formule (Ia-2) lorsque Y et Z représentent C=O, a et c représentent une simple liaison, et b représente une double liaison.

Les composés de formule (Ia-3) sont avantageusement obtenus par traitement des composés de formule (Ia-1) avec du fluoroborate de nitrosium.

A titre d'illustration encore, les composés de formule (Ib) sont obtenus par réaction du dithiol de formule définie ci-dessus, en présence de $BF_3.Et_2O$, du tétraméthyle éther ou de l'hexaméthyle éther du gossypol regroupés dans la formule (III) suivante



(III)

le tétraméthyle éther du gossypol correspondant au composé de formule (III) susmentionnée dans laquelle R' = H et R = CH_3, et l'hexaméthyle éther du gossypol correspondant au composé de formule (III) susmentionnée dans laquelle R' = R = CH_3, ce qui conduit à l'obtention des composés de formule (Ib) susmentionnée.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de la synthèse des composés de formule (I) susmentionnée, et de l'étude de l'activité biologique de ces composés sur des cellules KB de carcinome humain.

A. Appareillage

1. Chromatographie Liquide à Haute Performance analytique (HPLC analytique)

Les analyses HPLC ont été réalisées sur une chaîne constituée d'une pompe SpectraSYSTEM™ P1000XR, d'un injecteur-vanne Rheodyne, d'un détecteur à barette de diodes Waters® 996 PDA et en phase inverse sur des colonnes Alltima C18, 5µm, (4,6mm × 250mm) et Alltima C8, 5µm, (4,6mm × 250mm) suivant les conditions isocratiques suivantes :

(I) : A/B = 7/93, débit : 1ml/mn

(II) : A/B = 10/90, débit : 1ml/mn

(III) : A/B = 20/80, débit : 1ml/mn

Avec A = 5% Acétonitrile + 95% Eau + 0,1% TFA

B = 100% Acétonitrile + 0,1% TFA

Le coefficient de capacité k' des produits synthétisés est indiqué. Il correspond au rapport

Tr-To/To (Tr et To étant les temps de rétention du produit et le temps de rétention nul, respectivement)

2. Spectrométrie de Masse

Les spectres de masse (SM) ont été enregistrés sur les spectromètres suivants :

- AEI MS-50 pour l'impact électronique (IE)
- AE MS-9 pour l'ionisation chimique (IC)
- KRATOS MS-80 RF pour la technique de Fast Atom Bombardment (FAB)
- Navigator-Thermoquest pour l'ionisation par électrospray (ESI)
- HPLC couplée à la masse (LC-MS) :

LC : Type de colonne C18 – 4,6 mm d.i
Volume injecté : 20µl
Débit : 1ml/min
Solvants : A/B = 20/80 avec A = 5% Acétonitrile + 95% Eau + 0,1% TFA
B = 100% Acétonitrile + 0,1% TFA
UV : λ = 263 nm
ESI-MS : Débit : 300µl/min
Cône :20 V
Capillaire : 3,5kV
Temp. : 180°C
Pression N_2 : 6 bar

Les masses sont exprimées en unité de masse par charge élémentaire (m/z)

3. *Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire*

Les spectres de RMN du proton (RMN ^1H) ont été réalisés en solution dans des solvants deutériés et enregistrés sur des appareils de type Brücker AM-200 à 200MHz, AM-250 à 250MHz, AM-300 à 300MHz, AM-400 à 400MHz. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane (TMS) pris comme référence interne. Les constantes de couplage (J) sont donnérs en Hertz (Hz). Les caractérisations sont rapportées de la façon suivante : δ : déplacement chimique en ppm (multiplicité, nombre de protons, attribution). Les abréviations s, sl, d, dd, t, q, m signifient respectivement : singulet, singulet large, doublet, doublet de doublet, triplet, quadruplet et multiplet.

Les spectres de RMN du carbone (RMN ^{13}C) ont été réalisés en solution dans des solvants deutériés et enregistrés sur des appareils de type Brücker AM-200 à 50,2MHz, AM-250 à 62,5MHz, AM-300 à 75MHz, AM-400 à 100MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm en prenant le pic central du solvant deutérié comme référence. Une corrélation a été effectuée sur de nombreux produits afin de permettre l'attribution de signaux.

Les solvants utilisés sont le chloroforme ($CDCl_3$), le méthanol (CD_3OD) ou le DMSO (DMSO d_6) deutériés.

Le nom des molécules a été déterminé selon la nomenclature IUPAC, en anglais, par le logiciel Autonom 1.1 (Beilstein Institut).

B. Extraction et Purification du Gossypol

Nous avons choisi la méthode de Carruth (1918) que nous avons améliorée.

Méthode d'extraction du Gossypol de Carruth modifiée

Le concassage des graines de coton + bourre a été effectué avec un broyeur muni d'une grosse grille, le diamètre des trous de la grille est de 2.5 cm ; longueur des couteaux : 19 cm. La séparation des graines concassées de la bourre a été faite à l'aide d'un tamis ; diamètre des mailles : 0,5 cm.

Le broyage a été réalisé sur un broyeur à couteaux muni d'une petite grille diamètre des trous de la grille 3 mm, longueur des couteaux 4 cm.

L'extraction a été faite à l'aide d'un Soxhlet dont le tube peut contenir 1 kg de poudre de graines de coton, muni d'un ballon tricol de 4 litres et d'un bouilleur électrique (bain-marie) réglé vers 40-60°C.

On commence par concasser les graines avec le gros broyeur puis on sépare par tamisage la bourre des graines concassées.

On renouvelle cette opération trois fois afin de récupérer le maximum de graines.

Les graines sont ensuite broyées à l'aide d'un broyeur à petite grille. On effectue un déshuilage par extraction au Soxhlet avec de l'éther de pétrole : 1Kg de graines broyées est introduit dans le tube du Soxhlet et 2,5 litres d'éther de pétrole dans le ballon. Le déshuilage se fait à douce ébullition (40°C), pendant 16 heures. A la fin de cette étape, la poudre, essorée, sortie du Soxhlet et séchée à l'air ambiant.

L'extraction du gossypol se fait dans les mêmes conditions avec de l'éther éthylique. Les graines broyées déshuilées et séchées. On introduit dans le ballon du Soxhlet 2,5 litres d'éther éthylique, afin d'éviter une oxydation éventuelle du produit, une ébullition moyenne (40°C) est maintenue pendant 16 heures.

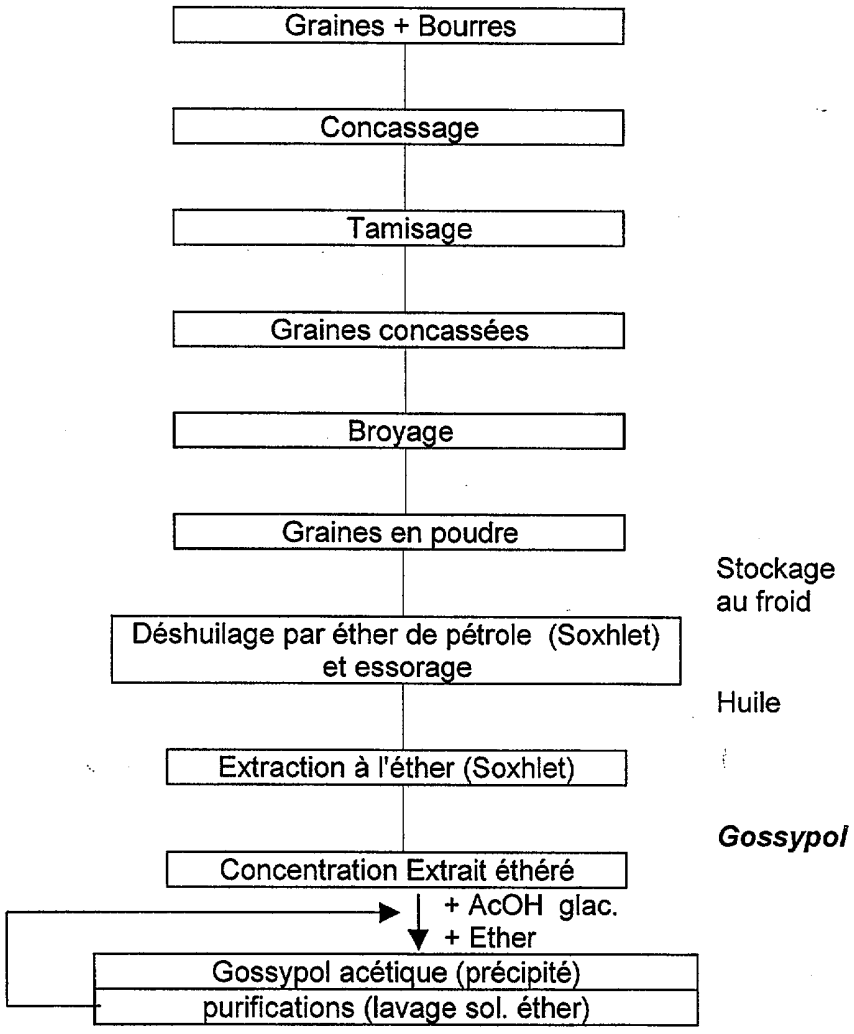
L'extrait éthéré est ensuite filtré. Le filtrat est concentré au maximum au rotavapor à température ambiante. On ajoute ensuite au concentrat 20 ml d'acide acétique glacial et 100 ml d'éther éthylique anhydre : aussitôt un dépôt de gossypol acétique commence à se former, on bouche bien le ballon et on le protège avec une

feuille d'aluminium pour éviter toute oxydation et les effets de la lumière. On laisse en chambre froide et on filtre après 24h.

Le précipité obtenu est lavé à l'éther de pétrole et est séché au dessicateur sur P_2O_5 et sous vide.

On ajoute 10 ml d'heptane au filtrat et on évapore à nouveau pour entrainer l'excès d'acide acétique par évaporation et on le traite par le même protocole que ci-dessus. Cette méthode d'extraction est illustrée dans le schéma suivant :

Schéma **Extraction par la méthode de Carruth modifiée**



Au commencement de notre travail, nous avons obtenu une moyenne de 2,1 g de gossypol acétique extrait par kg d'amandes de coton d'origine camerounaise. Par la suite, nous avons amélioré les conditions de l'extraction (1 à 2 supplémentaires) et de

la précipitation du gossypol acétique (à l'obscurité en chambre froide, évaporation à l'abri de la lumière) pour obtenir des rendements plus proches de 5,1 g de gossypol acétique par kg d'amandes. L'analyse par HPLC de même que la RMN, confirment la pureté du produit obtenu.

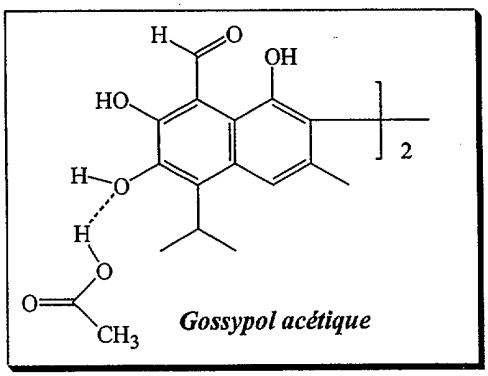
Analyse et caractéristiques du gossypol

L'analyse de la pureté du gossypol a été entreprise par HPLC analytique dans des conditions suivantes (voir figure 1) :

- Colonne : Alltima C18, 5μm, (4,6mm x 250mm)
- (**III**) : A/B= 20/80, avec A = 5%ACN + 95%H_2O + 0,1%TFA ; B = 100% ACN + 0,1%TFA.
- Débit = 1ml/mn, Pression = 2140 psi.
- k'(**III**) = 4,38.

1,6,7,1',6',7' – Hexahydroxy – 5,5' – diisopropyl – 3,3' – Diméthyl – [2,2'] – binaphthalényl – 8,8' – Dicarbaldéhyde (Gossypol)

Composé n°1



Gossypol acétique

$C_{30}H_{30}O_8$

MW = 518,5 (gossypol acétique MW = 578,6)

Forme du produit : solide amorphe jaune.

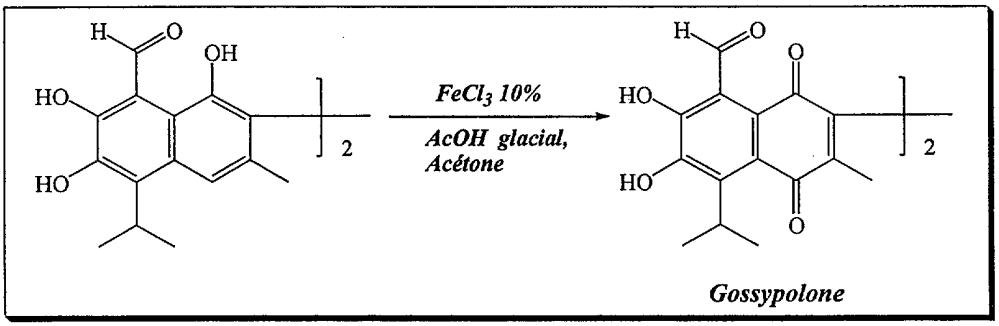
IR ($CHCl_3$) ν_{max} cm^{-1} : 3504 (OH), 1712 (CHO).

SM (FAB) m/z : 525 (M+Li) ; 501 ($MH-H_2O$).

RMN ^1H (300MHz, $CDCl_3$) : 1,54 (d, 12H, 2 HC-($\underline{CH_3}$)$_2$), 2,14 (s, 6H, 2 Ar-$\underline{CH_3}$), 3,90 (m, 2H, 2 **HC**-(CH_3)$_2$), 5,93 (s, 2H, 2 **OH** en positions 1,1'), 6,51 (s, 2H, 2 **OH** en positions 6,6'), 7,80 (s, 2H, 2 Ar-**H**), 11,12 (s, 2H, 2 **CHO**), 15,13 (s, 2H, 2 **OH** en positions 7,7').

RMN ^{13}C (75MHz, $CDCl_3$) : 20,3 (HC-($\underline{C}H_3$)$_2$; Ar-$\underline{C}H_3$), 27,9 (H$\underline{C}$-(CH_3)$_2$), 114,7 ; 115,8 ; 118,2 ; 119,7 ; 129,8 ; 133,7 ; 134,2 ; 143,5 ; 150,5 ; 156,2 (carbones du noyau naphtalénique), 199,4 ($\underline{C}$HO).

C. Oxydation du Gossypol : synthèse de la Gossypolone Composé n° **2**

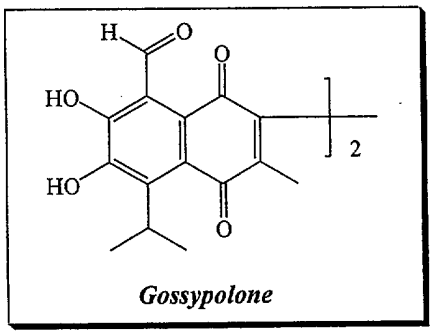


Gossypolone

6,7,6',7' – Tétrahydroxy – 5,5' – diisopropyl – 3,3' – diméthyl - 1,4,1',4' – tetraoxo – 1,4,1',4' – tétrahydro – [2,2']binaphthalényl – 8,8' – dicarbaldéhyde (Gossypolone)

Réaction : la réaction a été effectuée par la méthode écrite par Haas et al. (*Hass RH & Shirley DA, 1965*). 1,5g (2,59 mmol) du gossypol sont dissous dans un mélange de 75mL d'acétone et de 150mL d'acide acétique glacial. Le mélange réactionnel est chauffé dans un bain-marie (60-70°C) en ajoutant 112,5mL (42 mmol) de la solution aqueuse 10% de chlorure de fer, pendant 15 minutes. Ensuite, le mélange réactionnel est laissé refroidir à température ambiante, 200mL d'eau sont alors ajoutés pour former un précipité noir qui contient le sel de fer et qui est séparé par la filtration. Le résidu obtenu est traité avec l'acide sulfurique 20%, la phase aqueuse est extraite par l'éther, les phases organiques sont réunies, lavées, séchées sur sulfate de sodium,

filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par une précipitation dans chloroforme/hexane.



Gossypolone

$C_{30}H_{26}O_8$

MW = 546,5

Forme du produit : solide amorphe vert foncé

Condition de HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C18, 5μm, (4,6mm x 250mm)
- (III) : A/B = 20/80, avec A = 5% ACN + 95% H_2O + 0,1% TFA ; B = 100% ACN + 0,1% TFA.
- Débit = 1ml/mn, Pression = 2140 psi.
- k' (III) = 2,75

HPLC de la Gossypolone (Figure 2)

Rendement : 85% (1,2g)

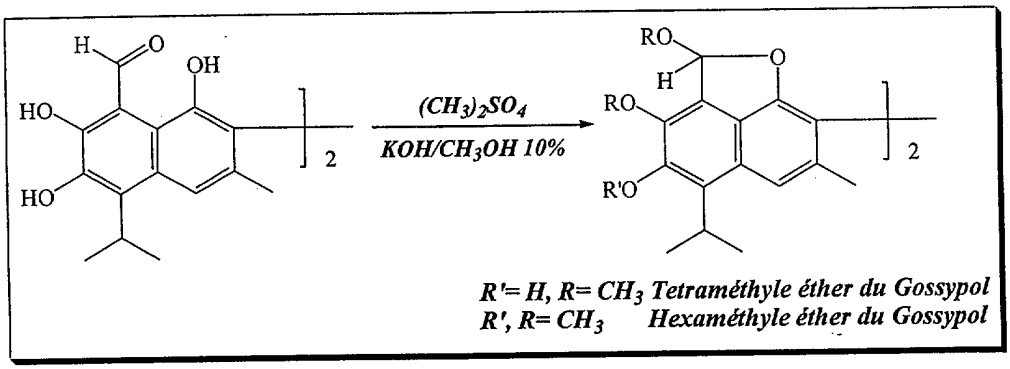
IR ($CHCl_3$) ν_{max} cm^{-1} : 3514 (OH), 1640 (C=O).

SM (FAB) m/z : 553 (M+Li).

RMN ^{1}**H** (300MHz, $CDCl_3$) : 1,52 (d, 12H, 2 HC-($\underline{CH_3}$)$_2$), 2,14 (s, 6H, 2 Ar-$\underline{CH_3}$), 4,11 (m, 2H, 2 $\underline{HC}$-(CH_3)$_2$), 6,61 (s, 2H, 2 $\underline{OH}$ en positions 6,6'), 11,62 (s, 2H, 2 $\underline{CHO}$), 13,13 (s, 2H, 2 $\underline{OH}$ en positions 7,7') ;

RMN ^{13}C (300MHz, $CDCl_3$) : 19,8 (Ar-$\underline{C}H_3$) 19,9 (HC-($\underline{C}H_3)_2$), 28,8 (H$\underline{C}$-($CH_3)_2$), 116,1 ; 127,2 ; 127,8 ; 138,3 ; 141,7 ; 147,4 ; 149,5 ; 152,6 (carbones du noyau naphtalénique), 184,6 ; 186,7 (C=O du groupement quinonique), 198,6 ($\underline{C}$HO).

D. Protection du Gossypol par méthylation des groupes phénoliques

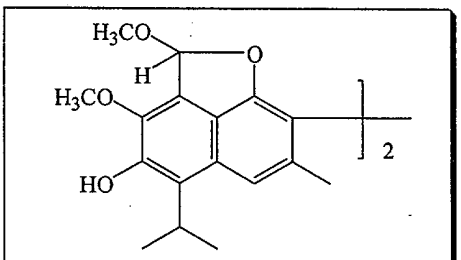


R'= H, R= CH_3 Tetraméthyle éther du Gossypol
R', R= CH_3 Hexaméthyle éther du Gossypol

1. Synthèse du tetraméthyle éther du Gossypol Composé n° 3

5,5' – diisopropyl – 2,4,2',4' – tétraméthoxy – 7,7' – diméthyl – 2H,2'H – [8,8']bi[naphtho [1,8-bc]furanyl] – 3,3' – diol

Réaction : par le sulfate de méthyle en présence de méthylate de potassium dans le méthanol (*Morris et al, 1937*)). On dissout 1g (1,73 mmole) de gossypol acétique dans 5 ml de méthanol et 5 ml de sulfate de méthyle, on chauffe très légèrement au bain marie puis, lorsque tout est dissous, on ajoute 7 ml de potasse méthanolique à 10% goutte à goutte. Il faut éviter que le mélange réactionnel ne soit trop basique. L'adjonction de potasse (0,5 ml /5 minutes) est une phase critique dont dépendra la pureté du produit. On laisse la réaction se poursuivre pendant la nuit. La couleur du mélange réactionnel devient brun foncé et un précipité de sulfate de potassium est formé. Au matin, on détruit le sulfate de méthyle en excès par une solution aqueuse de soude à 10%. Un précipité est formé, on le sépare par filtration puis le lave avec du méthanol froid. L'analyse HPLC indique la présence d'un seul produit.



Tetraméthyle éther du Gossypol (TMG)

$C_{34}H_{38}O_8$

MW = 574,7

Forme du produit : solide amorphe blanc.

Condition de HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C18, 5μm, (4,6mm × 250mm)
- **(II)** : A/B = 10/90, avec A = 5% ACN + 95% H_2O + 0.1% TFA ; B = 100% ACN + 0.1% TFA.
- Débit = 1ml/mn, Pression = 1500psi.
- k'**(II)** = 2,82

Rendement : 85% (0,85g).

SM (FAB) m/z : 575 (MH^+).

RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$) : 1,52 (d, 12H, 2 HC-($\underline{CH_3}$)$_2$), 2,29 (s, 6H, 2 Ar-$\underline{CH_3}$), 3,83 (m, 2H, 2 **H**$\underline{C}$-(CH_3)$_2$), 3,28 (s, 6H, 2 O-HC-O$\underline{CH_3}$), 4,19 (s, 6H, 2 O$\underline{CH_3}$ en positions 7,7'), 6,28 (s, 2H, 2 **OH** 6,6' en positions), 7,1 (s, 2H, 2 O-$\underline{HC}$-O- OCH_3), 7,42 (s, 2H, 2 Ar-$\underline{H}$).

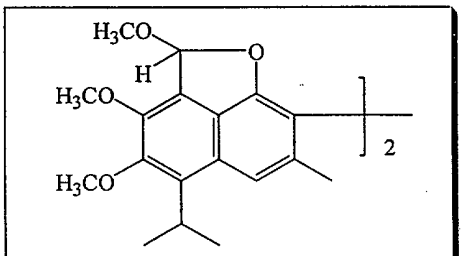
RMN ^{13}C (300MHz, $CDCl_3$) : 20,6 (HC-($\underline{C}H_3$)$_2$), 21,0 (Ar-$\underline{C}H_3$), 26,8 (H$\underline{C}$-(CH_3)$_2$), 51,7 (O-HC-O$\underline{C}H_3$) ; 58,2 (O$\underline{C}H_3$ 7,7' en positions) ; 107,5 (O-H$\underline{C}$-O-OCH_3), 109,0 ; 113,3 ; 114,1 ; 121,0 ; 125,3 ; 126,6 ; 136,9 ; 141,7 ; 145,7 ; 155,3 (carbones du noyau naphtalénique).

2. Synthèse du Hexaméthyle éther du Gossypol Composé n° 4

5,5' – diisopropyl – 2,34,2',3',4' – hexaméthoxy – 7,7' – diméthyl – 2H,2'H – [8,8']bi [naphtho[1,8-bc]furanyl]

Réaction : On dissout 2g (3,46mmole) de gossypol acétique dans 20 ml de méthanol et 20 ml de sulfate de méthyle, on chauffe au bain-marie puis, lorsque tout est dissous, on ajoute 32 ml de potasse méthanolique à 10 % goutte à goutte. Le mélange réactionnel devient basique puis rapidement très acide après chaque ajout de potasse méthanolique. L'apparition de l'acidité est de moins en moins rapide. Finalement, le mélange réactionnel est soumis à une agitation magnétique sous argon, pendant 48h à température ambiante. Ensuite, le sulfate de méthyle en excès est décomposé par une solution aqueuse de soude à 10%, un précipité blanc est formé, on l'isole par filtration puis le lave avec du méthanol froid.

L'analyse HPLC indique la présence de 2 produits, l'un d'eux étant majoritaire (72,5%). Un essai de séparation sur gel de silice L= 50 cm, d = 2,1 cm ; toluène éther 9/1) a permis de séparer deux fractions de même masse (MH+ = 603)



Hexaméthyle éther du Gossypol (HMG)

$C_{36}H_{42}O_8$

MW = 602,7

Forme du produit : solide amorphe blanc.

Condition de HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C18, 5μm, (4,6mm × 250mm)

- (II) : A/B = 10/90, avec A = 5% ACN + 95% H_2O + 0,1% TFA ; B = 100% ACN + 0,1% TFA.
- Débit = 1ml/mn, Pression = 1500 psi.
- k'(II) = 6,14 (83%) ; 6,53 (17%)

Rendement : 76,9% (1,6g)

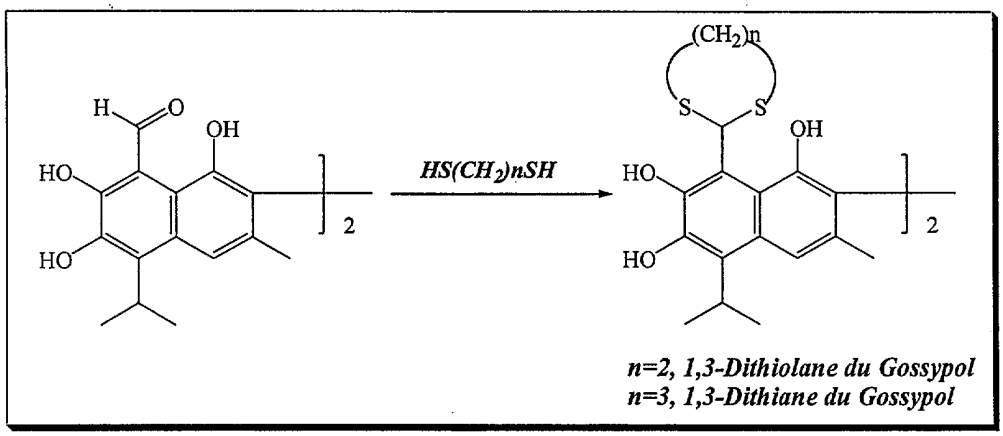
SM (FAB) m/z : 603 (MH^+).

RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$) : 1,54 (d, 12H, 2 HC-($\underline{C}H_3)_2$), 2,32 (m, 6H, 2 Ar-$\underline{C}H_3$), 3,31 - 3,46 (m, 6H, 2 O-HC-O$\underline{C}H_3$), 3,83 - 4,19 (m, 14H, 2 $\underline{H}C$-($\underline{C}H_3)_2$, 4 O$\underline{C}H_3$ en positions 6,7,6',7'), 6,95 - 7,06 (m, 2H, 2 O-$\underline{H}C$-O- OCH_3), 7,48 (m, 2H, 2 Ar-$\underline{H}$).

RMN ^{13}C (75MHz, $CDCl_3$) : 21,1 (Ar-$\underline{C}H_3$), 22,1 (HC-($\underline{C}H_3)_2$), 27,1 (H$\underline{C}$-($CH_3)_2$), 52,4 & 52,7 (O-HC-O$\underline{C}H_3$) ; 54,0 & 54,4 (O$\underline{C}H_3$ en positions 7,7'), 58,2 & 58,5 (O$\underline{C}H_3$ en positions 6,6'), 61,4 (O-H$\underline{C}$-O-OCH_3), 108,5 & 108,7 ; 110,4 ; 115,0 & 115,2 ; 116,5 ; 123,7 ; 124,9 & 125,1 ; 136,6, 136,7 & 137,0 ; 147,6 ; 150,0 ; 154,9 (carbones du noyau naphtalénique).

E. Dérivés 1,3-Dithiane , 1,3-Dithiolane du Gossypol et de la Gossypolone - Dérivés thioethers des dérivés méthyles éthers du Gossypol

1. Dérivés 1,3-Dithiane, 1,3-Dithiolane du Gossypol



n=2, 1,3-Dithiolane du Gossypol
n=3, 1,3-Dithiane du Gossypol

Méthode générale : A une solution de 1g (1,73 mmole) de gossypol acétique dissous dans 40mL d'éther a été ajouté 3.eqv de dithioethane (dithiopropane). Le mélange réactionnel est refroidi à -20°C, puis, on ajoute goutte à goutte 1.eqv de $BF_3.OEt_2$. Ensuite, ce mélange est soumis à une agitation magnétique, en l'absence de lumière et sous argon, pendant 24h à température ambiante. Au matin, le précipité jaune formé est séparé par filtration, lavé avec d'éther.

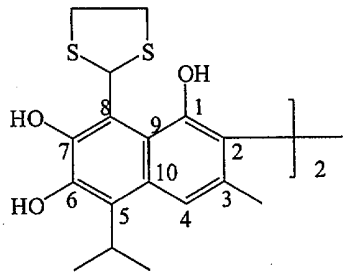
La pureté de ces produits est évaluée par HPLC analytique dans des conditions suivantes :

Condition de HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C18, 5µm, (4,6mm × 250mm)
- (III) A/B = 20/80, avec A = 5% ACN+ 95% H_2O+ 0.1% TFA ; B =100% ACN+ 0,1% TFA.
- Débit : 1ml/mn, Pression = 2140 psi.

8,8' – Bis – [1,3]dithiolan – 2 – yl – 5,5' – Diisopropyl – 3,3' – diméthyl – [2,2']binaphthalényl – 1,6,7,1',6',7' – hexaol (GDTE)

Composé n° **5**



1,3-Dithiolane du Gossypol

$C_{34}H_{38}O_6S_4$

MW = 670,9

Forme du produit : solide amorphe jaune.

HPLC du 1,3-Dithiolane du Gossypol (Figure 3)

Rendement : 67% (778 mg)

HPLC : k' (III) = 9,17

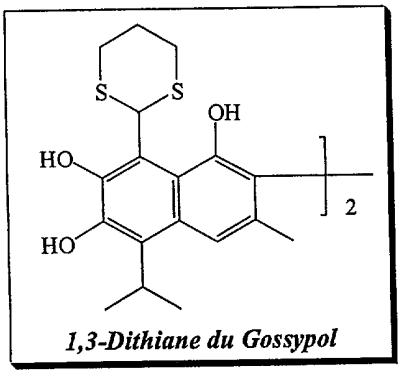
SM (ESI) m/z : 699 ($M-H^-$)

RMN ^{1}**H** (400MHz, $CDCl_3$) : 1,54 (d, 12H, 2 HC-($\underline{CH_3}$)$_2$), 2,00 (s, 6H, 2 Ar-$\underline{CH_3}$), 3,31 ; 3,65 (dd, 8H, 2 C-S-$\underline{CH_2}$-$\underline{CH_2}$-S), 3,94 (m, 2H, 2 $\underline{HC}$-(CH_3)$_2$), 7,51 (s, 2H, 2 $\underline{Ar\text{-}H}$), 8,13 (s, 2H, 2 S-$\underline{HC}$-S), 7,96, 8,29, 8,63 (sl, 6H, 6 $\underline{OH}$ en positions 1,1',6,6',7,7').

RMN ^{13}**C** (100MHz, $CDCl_3$) : 20,4 (Ar-$\underline{C}H_3$), 20,6 (HC-($\underline{C}H_3$)$_2$), 26,2 (H$\underline{C}$-(CH_3)$_2$), 39,7(C-S-$\underline{C}H_2$-$\underline{C}H_2$-S) ; 50,6 (S-H$\underline{C}$-S) ; 111,7 (C-8), 115,4 (C-4), 117,4 & 117,6 (C-2 & C-9), 125,7 (C-5), 129,2 (C-10), 132,3 (C-3), 143,9 (C-6), 146,0 (C-7), 150,7 (C-1).

8,8' – Bis – [1,3]dithian – 2 – yl – 5,5' – Diisopropyl – 3,3' – diméthyl – [2,2']binaphthalényl – 1,6,7,1',6',7' – hexaol (GDTP)

Composé n° **6**



1,3-Dithiane du Gossypol

$C_{36}H_{42}O_6S_4$

MW = 698,9

Forme du produit : solide amorphe jaune.

Rendement : 93% (1,12g)

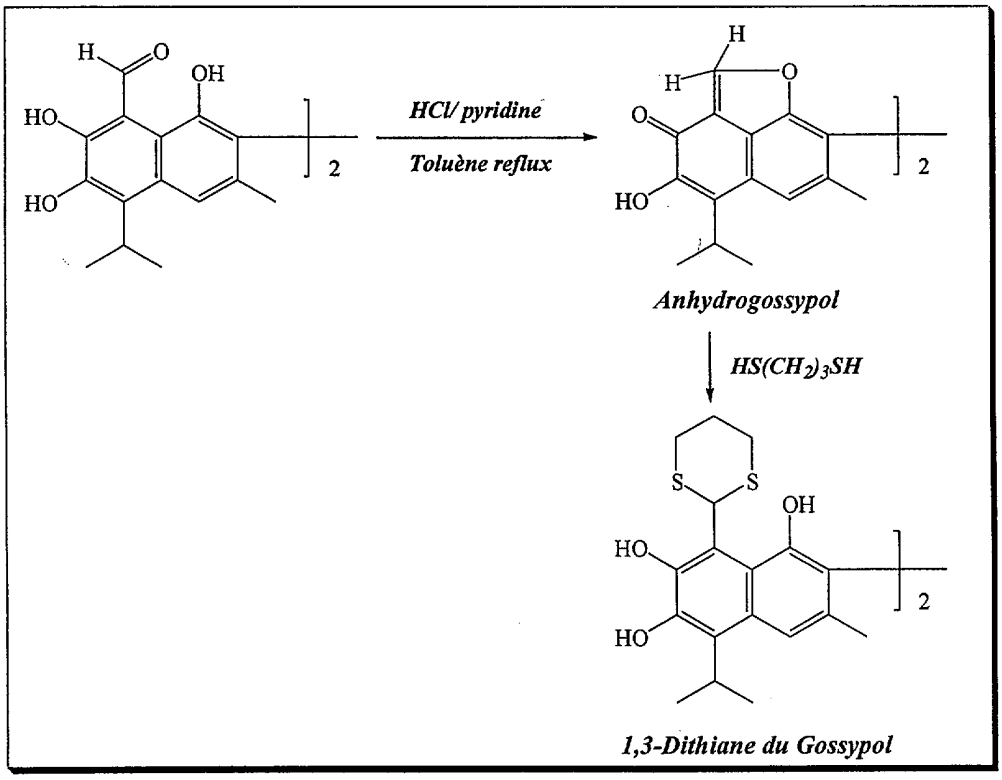
HPLC : k' (**III**) = 10,25

SM (ESI) m/z : 721 (M+Na)

RMN ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$) : 1,47 (d, 12H, 2 HC-($\underline{CH_3}$)$_2$), 1,74 ; 2.15 (m, 4H, 2 C-S-CH_2-$\underline{CH_2}$-CH_2-S), 1,96 (s, 6H, 2 Ar-$\underline{CH_3}$), 2,93 (m, 8H, 2 C-S-$\underline{CH_2}$-CH_2-$\underline{CH_2}$-S), 3,87 (m, 2H, 2 $\underline{HC}$-(CH_3)$_2$), 7,55 (s, 2H, 2 Ar-$\underline{H}$), 7,83 (s, 2H, 2 S-$\underline{HC}$-S) ; 7,77, 8,25, 8,63 (sl, 6H, 6 OH en positions 1,1',6,6', 7,7').

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$) : 20,4 (Ar-$\underline{C}H_3$), 20,5(HC-($\underline{C}H_3$)$_2$), 26,2 ($\underline{HC}$-(CH_3)$_2$), 25,0 (C-S-CH_2-$\underline{C}H_2$-CH_2-S), 31,6 (C-S-$\underline{C}H_2$-CH_2-$\underline{C}H_2$-S), 45,7 (S-H$\underline{C}$-S), 111,4 (C-8), 115,6, 115,7 (C-4 & C-9), 117,9 (C-2), 125,6 (C-5), 129,4 (C-10), 132,4 (C-3), 143,7 (C-6), 146,7 (C-7), 150,7 (C-1).

2. Dérivés 1,3-Dithiane du Gossypol à partir de l'anhydrogossypol



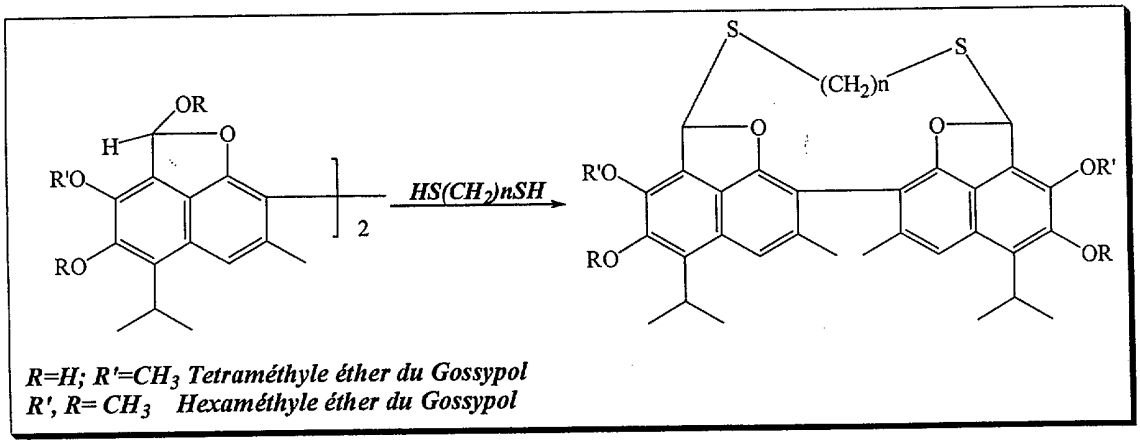
Réaction :

Synthèse d'anhydrogossypol : Dans des conditions anhydres, HCl gaz est passé sur la surface d'une solution de 2,5g de pyridine anhydre dans 12,5g de toluène anhydre jusqu'à ce que le sel précipité de chlorure de pyridinium ne se forme plus. Ensuite, on ajoute 500mg (0,87 mmole) de gossypol acétique dans 70mL de toluène, le mélange réactionnel est soumis à une agitation magnétique, sous l'azote, chauffé à 110°C. Après 3h de la réaction, on arrête la réaction. Par CCM, on constate qu'il n'y a plus de gossypol et un seul produit est formé.

Synthèse du 1,3-dithiane du gossypol : on suppose que le rendement de cette réaction est 100%, On ajoute 262μL (2,61 mmol) de dithiopropane dans ce mélange réactionnel d'anhydrogossypol. Ce mélange est laissé sous agitation magnétique pendant la nuit à température ambiante. Au matin, le précipité jaune formé est séparé par filtration, lavé avec hexane.

Les analyses de RMN, masse et HPLC analytique prouvent que ce produit possède les mêmes caractéristiques que celles du 1,3-dithiane du gossypol.

3. Dérivés thioethers des dérivés méthyles éthers du Gossypol



R=H; R'=CH_3 Tetraméthyle éther du Gossypol
R', R= CH_3 Hexaméthyle éther du Gossypol

Méthode générale : A une solution de 0,1-1M de 1.eqv de dérivés méthyle éthers du gossypol dans le chloroforme a été ajouté 3.eqv de dithioethane (dithiopropane). Le mélange réactionnel est refroidi à -20°C, puis, on ajoute goutte à

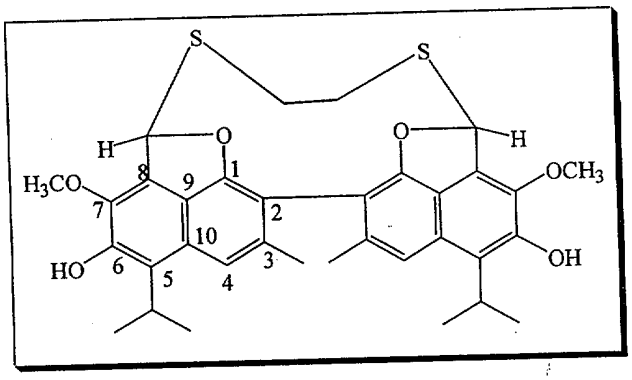
goutte 1.eqv de $BF_3.OEt_2$. Ensuite, ce mélange est soumis à une agitation magnétique, en l'absence de lumière et sous argon, pendant 24h à température ambiante. Au matin, le précipité formé est séparé par filtration, lavé avec l'hexane. Ce précipité peut être purifié par une précipitation dans un mélange de chloroforme et hexane

La pureté de ces produits est contrôlée par HPLC analytique dans des conditions suivantes :

Condition de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C18, 5μm, (4,6mm × 250mm)
- **(II)** A/B = 10/90, avec A = 5% ACN+ 95% H_2O+ 0,1% TFA ; B =100% ACN+ 0,1% TFA.
- Débit : 1ml/mn, Pression = 1500 psi.

Composé n° **7** *(pas de nomenclature accessible)*



$C_{34}H_{36}O_6S_2$

MW = 604,7

Forme du produit : solide amorphe blanc.

Rendement : 24,2%

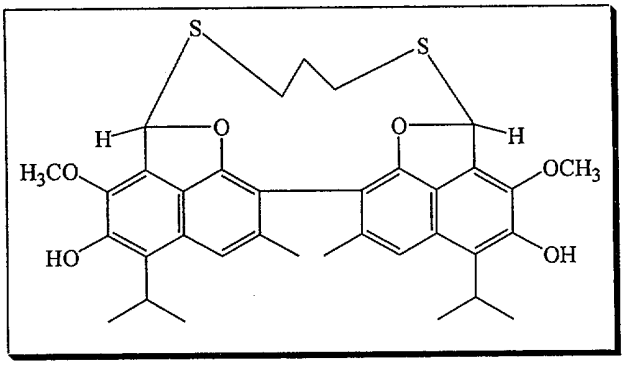
HPLC : k' **(II)** = 3,82

SM (EI) m/z : 605 (MH^+)

RMN ^{1}**H** (300MHz, $CDCl_3$) : 1,41 (d, 12H, 2 HC-($\underline{CH_3}$)$_2$), 2,30 (s, 6H, 2 Ar-$\underline{CH_3}$), 2,61, 2,95 (d, 4H, C-S-$\underline{CH_2}$-$\underline{CH_2}$-S), 3,66 (m, 2H, 2 $\underline{HC}$-(CH_3)$_2$), 4,10 (s, 6H, 2 O$\underline{CH_3}$ en positions 7,7'), 6,18 (s, 2H, 2 $\underline{OH}$ en positions 6,6'), 6,98 (s, 2H, 2 O-$\underline{HC}$-S), 7,30 (s, 2H, 2 Ar-$\underline{H}$).

RMN ^{13}**C** (75MHz, $CDCl_3$) : 20,7 (HC-($\underline{C}H_3$)$_2$; Ar-$\underline{C}H_3$), 26,9 (H$\underline{C}$-(CH_3)$_2$), 30,7 (C-S-$\underline{C}H_2$-$\underline{C}H_2$-S), 59,3 (O$\underline{C}H_3$ en positions 7,7'), 90,2 (O-$\underline{HC}$-S), 109,4 (C-2), 114,2 (C-4), 118,2 (C-8), 121,2 (C-9), 125,8, 126,1 (C-5, C-10), 137,2 (C-3), 139,8 (C-7), 146,4 (C-6), 156,5 (C-1).

Composé n° **8** (pas de nomenclature accessible)



$C_{35}H_{38}O_6S_2$

MW = 618,8

Forme du produit : solide amorphe blanc.

Rendement : 60,3%.

HPLC : k' (**II**) = 4,09

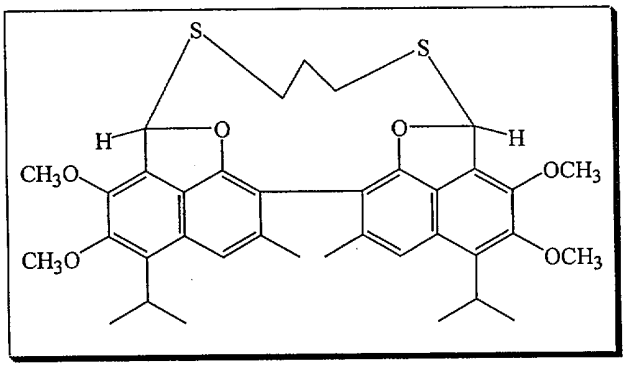
SM (ESI) m/z : 619 (MH)

RMN ^{1}**H** (300MHz, $CDCl_3$) : 1,43 (d, 12H, 2 HC-($\underline{CH_3}$)$_2$), 1,67 (m, 4H, S-CH_2-$\underline{CH_2}$-CH_2-S), 2,14 (s, 6H, 2 Ar-$\underline{CH_3}$), 2,98 & 3,02 (m, 4H, S-$\underline{CH_2}$-CH_2-$\underline{CH_2}$-S), 3,72 (m, 2H,

2 **HC**-$(CH_3)_2$), 4,09 (s, 6H, 2 O**C**H_3 en positions 7,7'), 7,31 (s, 2H, 2 Ar-**H**), 7,39 (s, 2H, 2 O-**HC**-S), 8,60 (s, 2H, 2 OH en positions 6,6').

RMN ^{13}**C** (75MHz, $CDCl_3$) : 20,3 (Ar-**C**H_3), 20,5 (HC-(**C**$H_3)_2$), 25,9 (H**C**-$(CH_3)_2$), 27,0 (S-**C**H_2-CH_2-**C**H_2-S), 27,6 (S-CH_2-**C**H_2-CH_2-S), 58,2 (O**C**H_3 en positions 7,7'), 88,6 (O-H**C**-S), 108,9 (C-2), 113,4 (C-4), 118,1 (C-8), 120,6 (C-9), 125,1, 125,2 (C-5, C-10), 136,2 (C-3), 140,5 (C-7), 147,1 (C-6), 155,1 (C-1).

Composé n° **9** *(pas de nomenclature accessible)*



$C_{37}H_{42}O_6S_2$

MW = 646 ,8

Forme du produit : solide amorphe blanc.

Rendement : 27 ?3%.

HPLC : k' **(II)** = 10,71

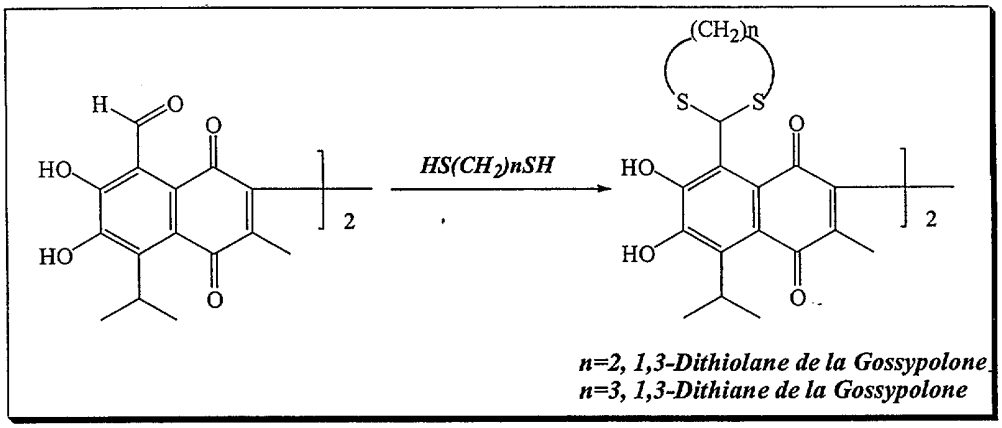
SM (ESI) m/z : 647 (MH^+)

RMN ^{1}**H** (400MHz, $CDCl_3$) : 1,51 (d, 12H, 2 HC-(**C**$H_3)_2$), 2,24 (s, 6H, 2 Ar-**C**H_3), 1,76 (m, 2H, C-S-CH_2-**C**H_2-CH_2-S), 3,04 ; 3,34 (m, 4H, C-S-**C**H_2-CH_2-**C**H_2-S), 3,82 (m, 2H, 2 **HC**-$(CH_3)_2$), 3,87 (s, 6H, 2 O**C**H_3 en positions 6,6'), 4,13 (s, 6H, 2 O**C**H_3 en positions 7,7'), 7,12 (s, 2H, 2 O-**HC**-S), 7,44 (s, 2H, 2 Ar-**H**).

RMN ^{13}**C** (300MHz, $CDCl_3$) : 20,9 (Ar-**C**H_3), 22,0 (HC-(**C**$H_3)_2$), 27,1 (H**C**-$(CH_3)_2$, C-S-CH_2-**C**H_2-CH_2-S), 27,5 (C-S-**C**H_2-CH_2-**C**H_2-S), 59,2 (O**C**H_3 en positions 7,7'),

61,4 ($O\underline{C}H_3$ en positions 6,6'), 89,5 (O-H$\underline{C}$-S), 111,0 (C-2), 115,7 (C-4), 121,4 (C-8), 124,0 (C-9), 125,9 (C-10), 136,0 (C-5), 137,1 (C-3), 145,2 (C-7), 151,0 (C-6), 155,5 (C-1).

4. Dérivés 1,3-Dithiane, 1,3-Dithiolane de la Gossypolone



n=2, 1,3-Dithiolane de la Gossypolone
n=3, 1,3-Dithiane de la Gossypolone

Méthode générale : A une solution de 1g (1,83 mmole) de gossypolone dissoute dans 50mL de chloroforme a été ajouté 3.eqv de dithioethane (dithiopropane). Le mélange réactionnel est refroidi à -20°C, puis, on ajoute goutte à goutte 1.eqv de $BF_3.OEt_2$. Ensuite, ce mélange est soumis à une agitation magnétique, en l'absence de lumière et sous argon, pendant 24h à température ambiante. On vérifie que la réaction est terminée, l'HPLC du mélange réactionnel donne un seul pic, et le pic de la gossypolone de départ a disparu. Le mélange réactionnel est lavé avec $NaHCO_3$ 5% (3X20mL), à l'eau (3 fois) et est séché sur sulfate de sodium, filtré et évaporé sous pression réduite pour donner un résidu vert. Le résidu est repris dans l'éther et reprécipité dans l'hexane.

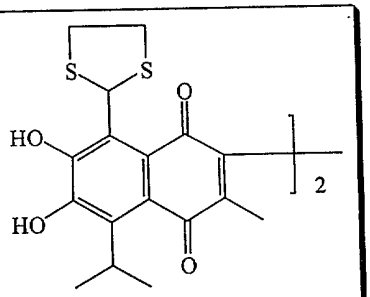
La pureté de ces produits est analysée par l'HPLC analytique dans des conditions suivantes :

Conditions de l'HPLC analytique :

- Colonne : Alltima C18, 5µm, (4,6mm × 250mm)
- **(III)** : A/B = 20/80, avec A = 5% ACN + 95% H_2O + 0.1% TFA ; B =100% ACN + 0.1% TFA.
- Débit = 1ml/mn, Pression = 2140 psi.

8,8' – Bis – [1,3]dithiolan – 2 – yl – 6,7, 6', 7' - tétrahydroxy – 5,5' – diisopropyl – 3,3' – diméthyl – [2,2']binaphthalényl – 1,4,1',4'- tétraone (GnDTE)

Composé n° **10**



1,3-Dithiolane de la Gossypolone

$C_{34}H_{34}O_8S_4$

MW = 698,8

Forme du produit : solide amorphe vert clair

Rendement : 65% (830mg)

HPLC : k' (**III**) = 4,70

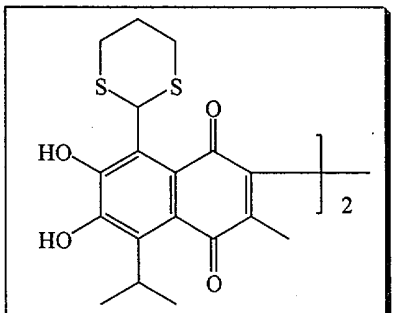
SM (ESI) m/z : 697 ($M-H^-$)

RMN ^1H (300MHz, $CDCl_3$) : 1,43 (d, 12H, 2 HC-($\underline{CH_3}$)$_2$), 1,99 (s, 6H, 2 Ar-$\underline{CH_3}$), 3,40, 3,58 (m, 8H, 2 C-S-$\underline{CH_2}$-$\underline{CH_2}$-S), 4,03 (m, 2H, 2 $\underline{HC}$-(CH_3)$_2$), 7,15 (s, 2H, 2 S-$\underline{HC}$-S), 6,63, 8,89 (sl, 4H, 4 OH en positions 6,6',7,7').

RMN ^{13}C (75MHz, $CDCl_3$) : 14,4 (Ar-$\underline{C}H_3$), 19,4 & 19,6 (HC-($\underline{C}H_3$)$_2$), 28,2 (H$\underline{C}$-(CH_3)$_2$), 39,8 ; 40,0 (C-S-$\underline{C}H_2$-$\underline{C}H_2$-S), 50,1 (S-H$\underline{C}$-S), 119,9 (C-8), 125,5 (C-9), 128,8 (C-10), 136,8 (C-5), 139,4 (C-2), 145,8 (C-3), 147,2 (C-7), 149,7 (C-6), 185,4 (C-1), 187,6 (C-4).

8,8' – Bis – [1,3]dithian – 2 – yl – 6,7, 6', 7' - tétrahydroxy – 5,5' – diisopropyl – 3,3' – diméthyl – [2,2']binaphthalényl – 1,4,1',4'- tétraone

Composé n° **11**



1,3-Dithiane de la Gossypolone

$C_{36}H_{38}O_8S_4$

MW = 726,9

Forme du produit : solide amorphe vert clair.

Rendement : 89% (1,18g)

HPLC : k' **(III)** = 5,97

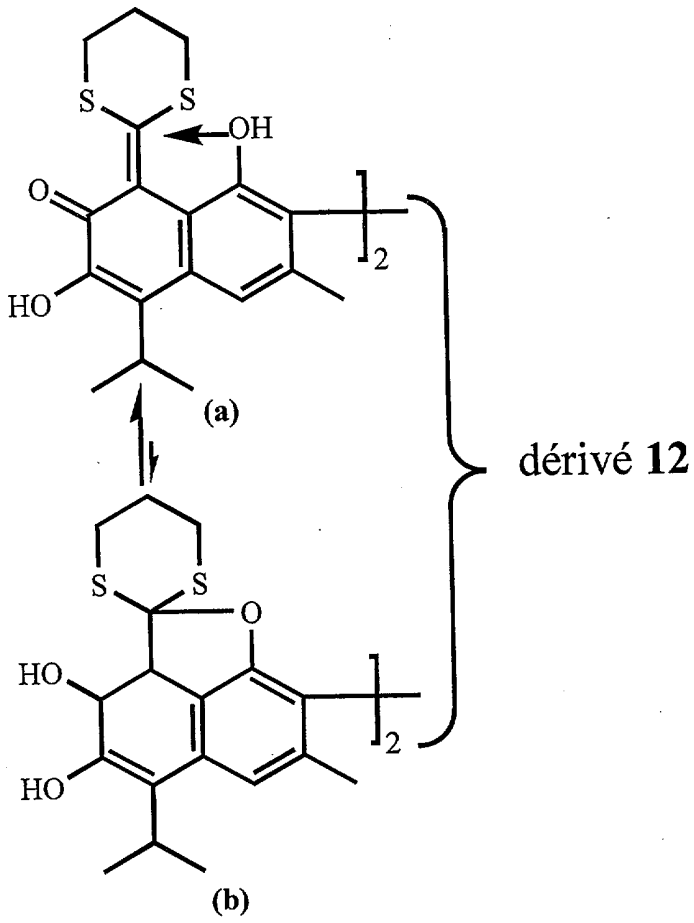
SM (ESI) m/z : 749 (M+Na).

RMN ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$) : 1,43 (dd, 12H, 2 HC-($\underline{CH_3}$)$_2$), 1,99 (s, 6H, 2 Ar-$\underline{CH_3}$), 1,87 ; 2,15 (m, 4H, 2 C-S-CH_2-$\underline{CH_2}$-CH_2-S), 2,85 ; 3,10 (m, 8H, 2 C-S-$\underline{CH_2}$-CH_2-$\underline{CH_2}$-S), 4,02 (m, 2H, 2 $\underline{HC}$-(CH_3)$_2$), 7,23 (s, 2H, 2 S-$\underline{HC}$-S), 6,57 ; 8,18 (sl, 4H, 4 OH en positions 6,6',7,7').

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$) : 14,5 (Ar-$\underline{C}H_3$), 19,9 & 20,0 (HC-($\underline{C}H_3$)$_2$), 28,2 (H$\underline{C}$-(CH_3)$_2$), 24,8 (C-S-CH_2-$\underline{C}H_2$-CH_2-S), 31,2 (C-S-$\underline{C}H_2$-CH_2-$\underline{C}H_2$-S), 43,1 (S-H$\underline{C}$-S), 121,5 (C-8), 123,4 (C-9), 128,8 (C-10), 136,8 (C-5), 139,4 (C-2), 145,9 (C-3), 147,0 (C-7), 149,5 (C-6), 185,3 (C-1), 187,8 (C-4).

Composé n° **12**

Le gossypol dithiane **6** se transforme, sous l'action du fluoroborate de nitrosonium, en un nouveau dérivé **12** de toxicité comparable à celle du gossypol.



8'-Dimercaptomethylene-8-[1,3]dithian-2-ylidene-1,6,1',6'-tetrahydroxy-5,5'-diisopropyl-3,3'-dimethyl-8H,8'H-[2,2']binaphthalenyl-7,7'-dione (12a)

150 microlitres d'une solution contenant 20mg de NO^+,BF_4^- dans 400 microlitres de CH_2Cl_2 and 50 microlitres de DMF sont versés dans une solution de 150mg de 1,3 dithiane gossypol 6 dans 15 ml de DMF à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivie par HPLC et, après 24h, **6** donne **12** (68%). Le dérivé 12 a été séparé par HPLC préparative pour les études structurales qui indiquent la présence majoritaire de la forme **12a** :

HPLC Rendement 14 %. : k'(II) : 3,19 ;

ESI-MS : m/z 694 (M)

^{1}H RMN (400MHz, $CDCl_3$) δ 1,53 (d, 12H, 2 HC-($\underline{CH_3}$)$_2$), 1,99 (s, 6H, 2 Ar-$\underline{CH_3}$)

^{13}C **RMN** (100MHz, $CDCl_3$) δ 20,3-20,7 (Ar-$\underline{C}H_3$), 21,3-21,4 (HC-($\underline{C}H_3)_2$), 28,1-28,2 (H$\underline{C}$-$(CH_3)_2$), 27,0 (C-S-CH_2-$\underline{C}H_2$-CH_2-S), 29,6-30,0 (C-S-$\underline{C}H_2$-CH_2-$\underline{C}H_2$-S), 41,9 ; 65,1 (S-H$\underline{C}$-S), 107,9-149,9 ; 173,0 & 187,8 (noyau naphthalene)

F/ BIOLOGIE

Activités biologiques

La toxicité sur cellules KB est reportée dans le tableau 1. Nous avons vérifié que le fait de masquer les groupements aldéhydes du gossypol ou de la gossypolone entrainait une importante diminution de la toxicité cellulaire (100 fois pour le gossypol dithiane **6** et 10 fois pour le dithiane de la gossypolone **11**).

Le blocage des groupes phénols entraîne une diminution totale de la toxicité pour les dérivés thiomethoxy **7, 8** et **9**.

Composé	IC_{50}
Gossypol **1**	*5.7 10^{-6}M*
5	4.5 10^{-4}M
6	1.2 10^{-4}M
Gossypolone **2**	*2.4 10^{-6}M*
10	2.0 10^{-5}M
11	3.5 10^{-5}M
Tetraméthoxy Gossypol **3**	*>25 10^{-6}M*
7	atoxique
8	atoxique
Hexaméthoxy Gossypol **4**	*>25 10^{-6}M*
9	atoxique
12	5.5 10^{-6}M

Tableau 1. Toxicité des thiodérivés sur les cellules KB

Toxicité des thiodérivés en présence d'un donneur de NO.

Dithianes et dithiolanes réagissent facilement avec un donneur d'ions nitronium NO^+ dans un solvant organique. Lorsque le mélange réactionnel est versé dans l'eau, l'intermédiaire issu du dithiane de la gossypolone donne à nouveau la gossypolone tandis que le dithiane du gossypol conduit, après les mêmes opérations, à un produit

nouveau **12**, ayant à peu près la même toxicité que le gossypol (tableau 1). Dans tous les cas, la protection par formation de dithiane réduit considérablement la toxicité, laquelle est restaurée par l'action de l'ion nitronium suivie de l'hydrolyse des intermédiaires.

Dans le milieu biologique, l'oxyde nitrique, lorsqu'il est lié au hème des cytochromes peut être considéré comme un ion nitronium potentiel, un intermédiaire de la formation des nitrosothiols.

$$NO + Fe^{3+} \rightarrow [NO\text{-}Fe^{3+}] \rightarrow [NO^{+}] + Fe^{2+}$$
$$NO^{+} + R\text{-}S^{-} \rightarrow RS\text{-}NO$$

La très faible toxicité des thiodérivés du gossypol sur les cellules KB nous a encouragés a examiner cette toxicité en présence d'un donneur de NO dans un milieu de culture cellulaire.

L'expérience a été réalisée en incubant le gossypol dithiane **6** simultanément avec le dipropylènetetramine nonoate (DPTA NONOate).

Nous avons observé que le nonoate, à des concentrations non toxiques pour les cellules KB, augmentait significativement la toxicité de **6** (tableau 2)

Concentration de **6**	Sans DPTA Nonoate	Avec DPTA Nonoate		
		10^{-4} M	$5\ 10^{-5}$M	10^{-5}M
$5\ 10^{-5}$M	29%	59%	22%	11%
10^{-5}M	0%	41%	11%	0%

Tableau 2. Toxicité de **6** en présence de DPTA NONOate

Conclusion

La toxicité des dérivés du gossypol a souvent été attribuée à la présence du dialdéhyde qui peut éventuellement ponter des enzymes ou des acides nucléiques.

Nos résultats ajoutent à ces hypothèses la possibilité pour les dithiols de se coupler au gossypol. Ainsi, les groupements dithiols dans les enzymes natives pourraient lier irreversiblement le gossypol, ce qui contribuerait à sa toxicité.

L'oxyde nitrique est produit en quantités importantes par les macrophages activés dans une réponse inflammatoire contre des bactéries, des virus ou des cellules tumorales. NO est particulièrement abondant au voisinage des tumeurs solides qui sont très vascularisées et pour lesquelles il joue un rôle fondamental dans l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire.

Dans ces conditions, NO peut aussi, dans le milieu biologique, révéler la toxicité, à proximité des tumeurs de dérivés dont la toxicité est convenablement masquée par combinaison avec le soufre. Nous proposons ainsi une voie nouvelle pour cibler la cytotoxicité envers des cellules qui expriment NO ou bien se développent dans de fortes concentrations d'oxyde nitrique.

Partie expérimentale biologique

Les activités cytotoxiques *in vitro* de tous les thiodérivés du gossypol ont été mesurées sur des cellules KB (carcinome de l'épiderme buccal humain) en provenance de l' American Type Culture Collection.

La lignée de cellules KB a été cultivée dans MEM (minimal essential medium, with Earle's salt solution) acheté chez Seromed, contenant 10% serum fœtal bovin, 2 mM de L-glutamine, 60 u/ml de penicilline G et streptomycine sulfate et 40 µg/ml de gentamycine. Pour les essais, les cellules KB ont été cultivées à l'état de monocouches dans des microplaques plastiques Nunc à 24 puits (25,000 cellules ensemencées par puits dans 1 ml de milieu de culture).

Les produits ont été dissous dans le dimethylsulfoxide (DMSO), et des dilutions en cascades ont été faites dans ce solvant puis ajoutées dans les cultures à raison de 10µl par puits, immédiatement après avoir rincé les cellules et ajouté un nouveau

milieu de culture (concentration finale du DMSO < 1%). Des cultures de contrôle ont reçu une dilution équivalente de DMSO.

Toutes les cultures ont été incubées à 37°C sous une atmosphère 95% air-5% CO_2 dans un incubateur humide. Après 3 jours d'incubation la viabilité des cellules en monocouche a été évaluée en ajoutant dans chaque puits 100µl d'une solution à 0.02% dans le milieu de culture de rouge neutre vital et après une nouvelle incubation de 8 à 16 h. Après lavage par du tampon phosphate et lyse des cellules avec une solution à 1% de sodium lauryl-dodecyl sulfate, une mesure photométrique du colorant extrait a été réalisée à 540nm avec un lecteur de microplaques Uniskam-II (Labosystems, Life Sciences International).

Pour la plupart des dérivés étudiés, les concentrations finales mesurées étaient dans l'intervalle 0,5µM à 10µM et les mesures ont été faites en duplicates dans chaque microplaque. Les IC_{50} ont été calculés par interpolation entre les pourcentages de cellules tuées en fonction de la concentration du dérivé étudié.

Pour étudier l'effet du DPTA NONOate sur la toxicité du dérivé **6**, les cellules KB ont été cultivées comme décrit ci-dessus, en présence de sérum fœtal bovin. Après 24 h d'incubation à 37°C, **6** et le nonoate ont été ajoutés simultanément aux cultures. Des échantillons standard et de contrôle ont été incorporés dans chaque microplaque pour déterminer la viabilité des cultures avec le nonoate, avec **6**, ou sans aucun produit ajouté. Le pourcentage de destruction des cellules a été déterminé comme précédemment après une incubation de 48 h à 37°C.

LEGENDE DES FIGURES

- Figure 1 : HPLC du gossypol
- Figure 2 : HPLC de la gossypolone
- Figure 3 : HPLC du 1,3-dithiolane du gossypol
- Figure 4 : HPLC du 1,3-dithiane du gossypol
- Figure 5 : HPLC du composé n° 8
- Figure 6 : HPLC du composé n° 9
- Figure 7 : HPLC du 1,3-dithiolane de la gossypolone
- Figure 8 : HPLC du 1,3-dithiane de la gossypolone

BIBLIOGRAPHIE

Borch RF, Bernstein MD, Durst HD, (1971), *J Am Chem Soc*, **93**, 2897-2904, *The cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent*

Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, Bredt DS and Israel MA (1195) *Cancer Res* , **55**, 727-730

Dao VT, Gaspard C, Mayer M, Werner GH, Nguyen SN, Michelot RJ, (2000), *European Journal of Medicinal Chemistry*, **35**(9), pp 805-813, *Synthesis and cytotoxicity of gossypol related compounds*

Deck LM, Vander Jagt DL & Royer RE, (1991), *J. Med. Chem.*, **34**, 3301-3305, *Gossypol and derivatives: A new class of aldose reductase inhibitors*

Fardella G, Barbetti P, Grandolini G, Chiappini I, Ambrogi V, Scarcia V, Candiani AF, (1999), *Eur. J. Med. Chem*, **34**, 515-523, *Phenylthio-dervivatives of α-methylene-γ-lactones as pro-drugs of cytotoxic agents.*

Greene TW, (1981), in *Protecting Groups in Organic Synthesis*, pp.129-133, John Wiley, New York.

Hass RH, Shirley DA, (1965), *J.Org.Chem*, **30**, 4111-4113, *The oxidation of gossypol. II. Formation of gossypolone with ferric chloride*

Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, Rhodes P, Westmore K Emson PC and Moncada S (1995) *Proc Nat Acad Sci* USA **92**, 4392-4396.

Ku B & Oh DY, (1989), *Synthetic communications*, **19**(3&4), 433-438, *Tetrachlorosilane catalyzed dithioacetalization*

Kumar V & Dev S, (1983), *Tetrahedron Letters*, **24**(12), 1289-1292, *Titanium tetrachloride, an efficient and convenient reagent for thioacetalization.*

Kunesch N, Barbier MP, Dalkafouki A, Poisson JE, (1990), *Ann.Pharmaceutiques.Francaises*, **48**(1), 1-6, *Préparation de dérivés de la fonction aldéhyde du gossypol*

Loewenthal HJE, (1973), in *Protecting Groups in Organic Chemistry* (Edited by JFW McOmie), p.334. Plenum Press, New York.

Maeda H & Hakaike T *Nitric Oxide and Oxygen Radicals in Infection, Inflammation, and Cancer Biochemistry (Moscow)*, **63** (1998), Number 7, 1007-1019.

Megson I L, *Drugs of the Future* (2000),**25**(7), 701-715 *Nitric Oxide donor drugs*

Miller RF & Adams R , (1937), *J Am Chem Soc.*, **59**, 1736-1738, *Structure of gossypol. IV. Anhydrogossypol and its derivatives*

Morris RC, Adams R, (1937), *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 1731-1735. *The structure of gossypol III. Gossypol ethers*

Oishi T, Kamemoto K, Ban Y, (1972), *Tetrehedron Letters*, **11**, 1085-1088, *A novel cleavage of thioketals through the alkylation by* $Et_3O^+.BF_4^-$.

Ong BS, (1980), *Tetrahedron Letters*, 21, 4225

Prazma J, Petrusz P, Mims W, Ball SS and Weisler MC (1995) *Otolaryngol.Head Neck Surg* **113**, 541-549.

Royer RE, Deck LM, Campos NM, Hunsaker LA & Van der Jagt DL, (1986), *J. Med. Chem.*, **29**, 1799-1801, *Biologically active derivatives of gossypol: Synthesis and antimalarial activities of peri-acylated gossylic nitriles*

Satchell DPN & Satchell RS, (1990), *Chem.Soc.Rev.*, **19**, 55-81, *Mechanisms of hydrolysis of Thioacetals*.

Schill G & Logemann E, (1973), *Chem. Ber.*, **106**, 2910

Seebach D & Corey EJ, (1975), *J. Org. Chem*, **40**(2), 231-237, *Generation and synthetic application of 2-Lithio-1,3-dithianes*.

Thomsen LL, Lawton FG, Knowles RG, Beesley JE, Riveros-Moreno V and Moncada S (1994) *Cancer Res*, **84**, 1352-1354.

Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG Knowles RG and Moncada S, (1995) *Br J Cancer*, **72**, 41-44.

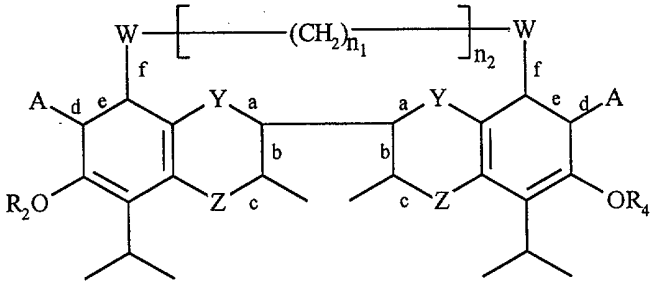
Vanin A F Biochemistry (Moscow), **63** (1998), Number 7, 924-938). *Dinitrosyl iron complexesand S-nitrosothiolsare two possible forms for stabilisation and transport of nitric oxide in biological systems*

Wink D A, Vodovotz y, Cook J A, Krishna MC, Kim S., Coffin D, DeGraaf W, Deluca AM, Liebman J, Mitchell JB ; *The Role of Nitric Oxide Chemistry in Cancer Treatment* Biochemistry (Moscow), **63** (1998), Number 7, 948-957.

York C, Surya Prakash GK, Olah GA, (1996), *Tetrahedron*, **52**(1), 9-14, *Desulfurative fluorination using Nitrosonium tetrafluoroborate and pyridinium poly(hydrogen fluoride)*.

REVENDICATIONS

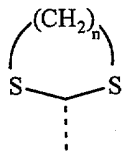
1. Composés de formule générale (I) suivante :



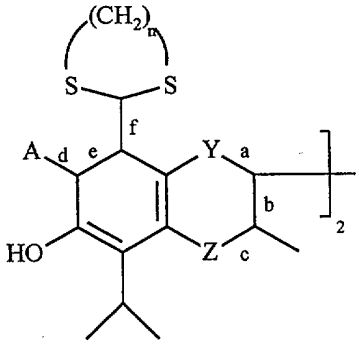
(I)

dans laquelle n_2 représente 0 ou 1, et :

- lorsque n_2 représente 0, alors R_2 et R_4 représentent H, et W représente un cycle de formule suivante :



ce qui correspond à des composés de formule (Ia) suivante :



(Ia)

dans laquelle :

- A représente O ou OH,
- n est un nombre entier de 2 à 5, et de préférence n représente 2 ou 3,
- Y représente C-OH, ou C=O,
- Z représente CH, ou C=O,

sous réserve que lorsque :

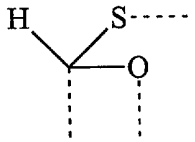
* A représente O, d et f représentent une double liaison, et e représente une simple liaison,

* A représente OH, d et f représentent une simple liaison, et e représente une double liaison,

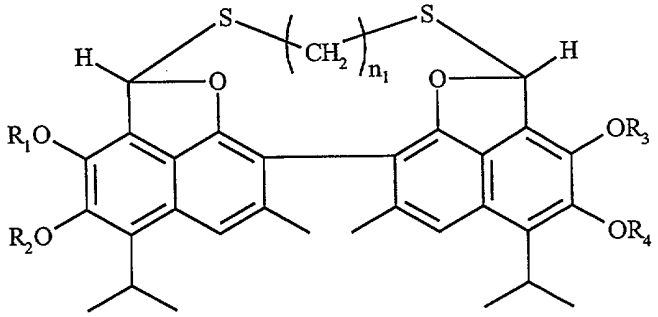
* Y représente C-OH, alors Z représente CH, a et c représentent une double liaison, et b représente une simple liaison,

* Y représente C=O, alors Z représente C=O, a et c représentent une simple liaison, et b représente une double liaison,

– et lorsque n_2 représente 1, alors A représente un groupe OR_1 ou OR_3 tel que défini ci-après, et W représente en association avec Y un groupe de formule suivante :



ce qui correspond à des composés de formule (Ib) suivante :

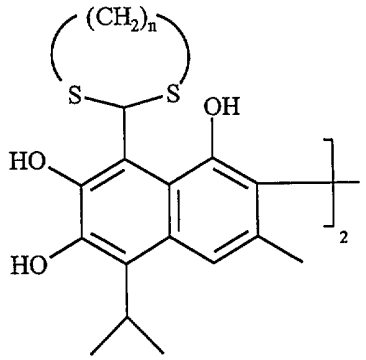


(Ib)

dans laquelle :

- n_1 est un nombre entier de 2 à 5, et de préférence n_1 représente 2 ou 3,
- R_1, R_2, R_3, et R_4, indépendamment les uns des autres, représentent un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle de 1 à 3 atomes de carbone, notamment un groupe méthyle.

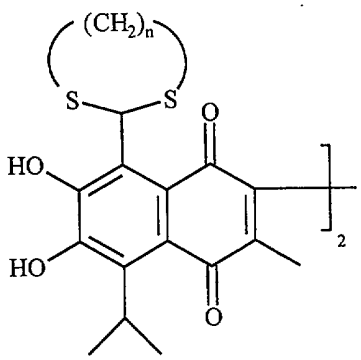
2. Composés selon la revendication 1, de formule (Ia-1) suivante :



(Ia-1)

dans laquelle la chaîne hydrocarbonée -$(CH_2)_n$- est telle que définie dans la revendication 1.

3. Composés selon la revendication 1, de formule (Ia-2) suivante :



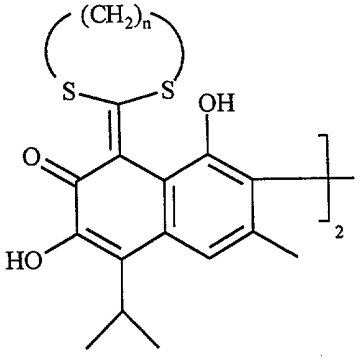
(Ia-2)

dans laquelle la chaîne hydrocarbonée -$(CH_2)_n$- est telle que définie dans la revendication 1.

4. Composés selon l'une des revendications 1 à 3, de formule (Ia-1) ou (Ia-2) dans laquelle n = 2, lesdits composés étant respectivement désignés dithiolanes de gossypol ou de gossypolone.

5. Composés selon l'une des revendications 1 à 3, de formule (Ia-1) ou (Ia-2) dans laquelle n = 3, lesdits composés étant respectivement désignés dithianes de gossypol ou de gossypolone.

6. Composés selon la revendication 1, de formule (Ia-3) suivante :



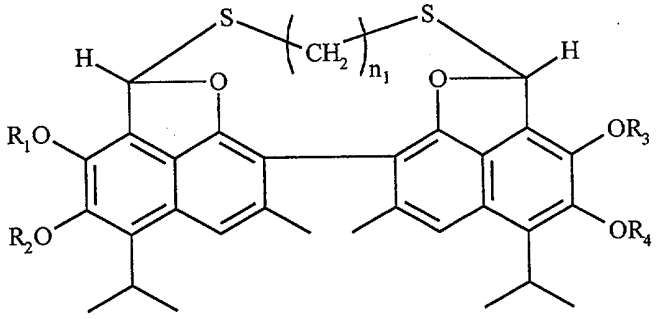
(Ia-3)

dans laquelle la chaîne hydrocarbonée -$(CH_2)_n$- est telle que définie dans la revendication 1.

7. Composés selon l'une des revendications 1 à 6, sous forme d'énantiomères lévogyres (–), ou d'énantiomères dextrogyres (+), ou sous forme d'un mélange racémique comprenant respectivement environ 50% d'énantiomères (–), et environ 50% d'énantiomères (+).

8. Composés selon l'une des revendications 1 à 7, sous forme d'énantiomères levogyres (-).

9. Composés selon la revendication 1, de formule (Ib) suivante :



(Ib)

dans laquelle :

- n_1 représente 2 ou 3,
- R_1 et R_3 représentent un groupe méthyle, et R_2 et R_4 représentent un atome d'hydrogène,
- ou R_1, R_2, R_3, et R_4 représentent un groupe méthyle.

10. Composés selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisés en ce qu'ils sont liés à un polymère ayant un trophisme pour les tumeurs, le cas échéant par l'intermédiaire d'un espaceur.

11. Composés selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisés en ce que l'espaceur relié à un polymère ayant un trophisme pour les tumeurs, est lié à un ou plusieurs des groupements phénoliques susceptibles d'être présents sur lesdits composés, ou est lié à la ou les chaînes hydrocarbonées présentes sur ces composés,

notamment dans le cas des composés de formule (Ib) dans laquelle R_1, R_2, R_3, et R_4, sont tous différents de l'hydrogène.

12. Composés selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'espaceur est constitué d'une chaîne hydrocarbonée ou peptidique choisie parmi celles de formules suivantes :

* -NH-(CH_2)p-CO- dans laquelle p représente un nombre entier de 2 à 5,
* -NH-AA-(AA)q-AA-CO- dans laquelle q représente un nombre entier de 2 à 5 et AA est un résidu acide aminé naturel ou non.

13. Composés selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisés en ce que le polymère ayant un trophisme pour les tumeurs est choisi parmi le Carboxymethyl dextran (CM) ou le N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA), et sont liés à la fonction NH de l'espaceur.

14. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 13, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

15. Composition pharmaceutique selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme destinée à l'administration par voie intraveineuse.

16. Composition pharmaceutique selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que la dose unitaire en composés de formule (I) en tant que principe actif desdites compositions, est d'environ 1 mg/kg/jour, à environ 25 mg/kg/jour.

17. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 13, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers chez l'homme ou l'animal, et plus particulièrement des tumeurs solides, tels que le carcinome adrénocortical humain, le gliome humain, le cancer du sein humain, le mélanome, ou le cancer de la prostate.

18. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 13, en tant qu'intermédiaires de synthèse de nouveaux dérivés du gossypol et de la gossypolone.

19. Procédé de préparation de composés selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend le traitement du gossypol ou de la gossypolone, dont le cas échéant une ou plusieurs fonctions hydroxyles sont substituées par un groupe alkyle de 1 à 3 atomes de carbone, notamment un groupe méthyle, avec un dithiol de formule $HS(CH_2)_nSH$ dans laquelle n représente un nombre entier de 2 à 5, en présence de $BF_3.Et_2O$.

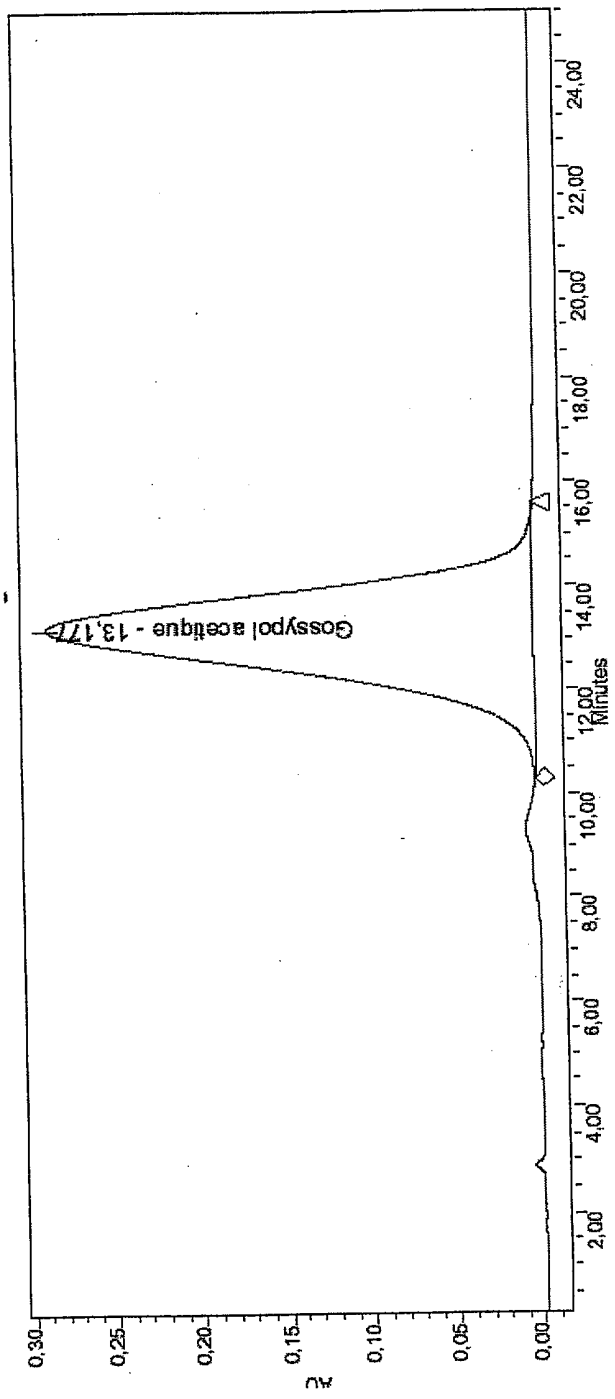

Gossypol acétique - 13,177
AU
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
2,00
4,00
6,00
8,00
10,00
12,00
14,00
16,00
18,00
20,00
22,00
24,00
Minutes

FIGURE 1

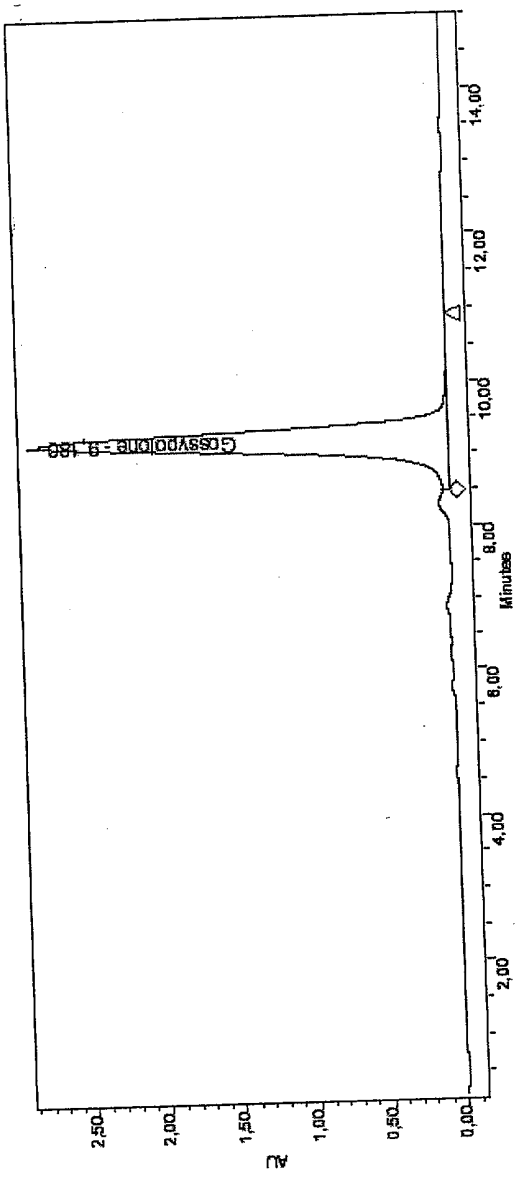

GC65VD01.DTE - 9,180
AU
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
2,00
4,00
6,00
8,00
10,00
12,00
14,00
Minutes

FIGURE 2

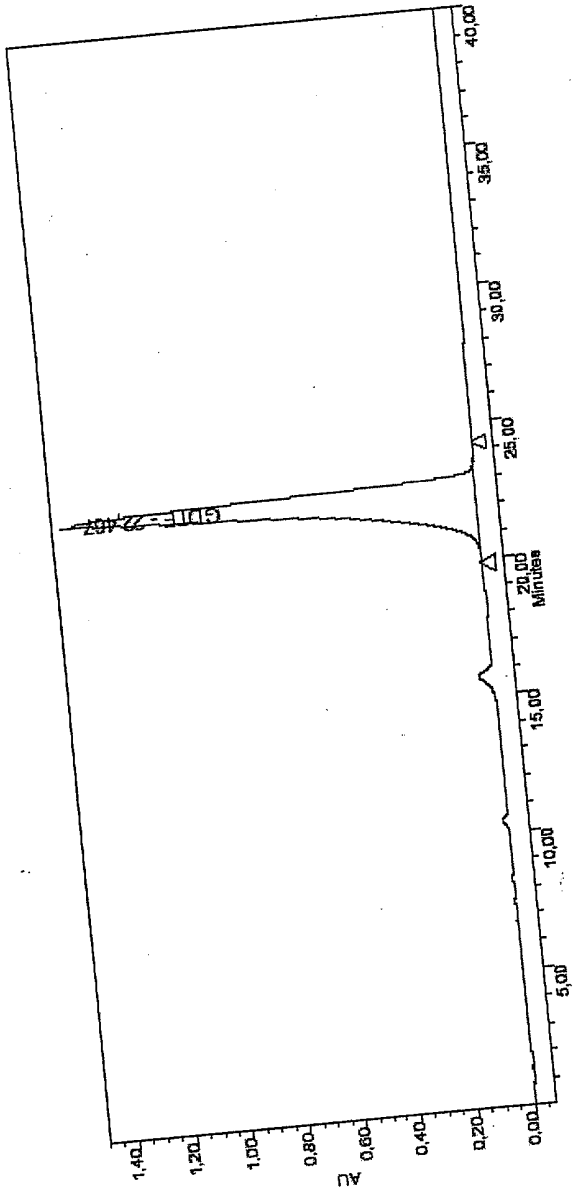

GDLF - 22.482
AU
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
5,00
10,00
15,00
20,00
Minutes
25,00
30,00
35,00
40,00

FIGURE 3

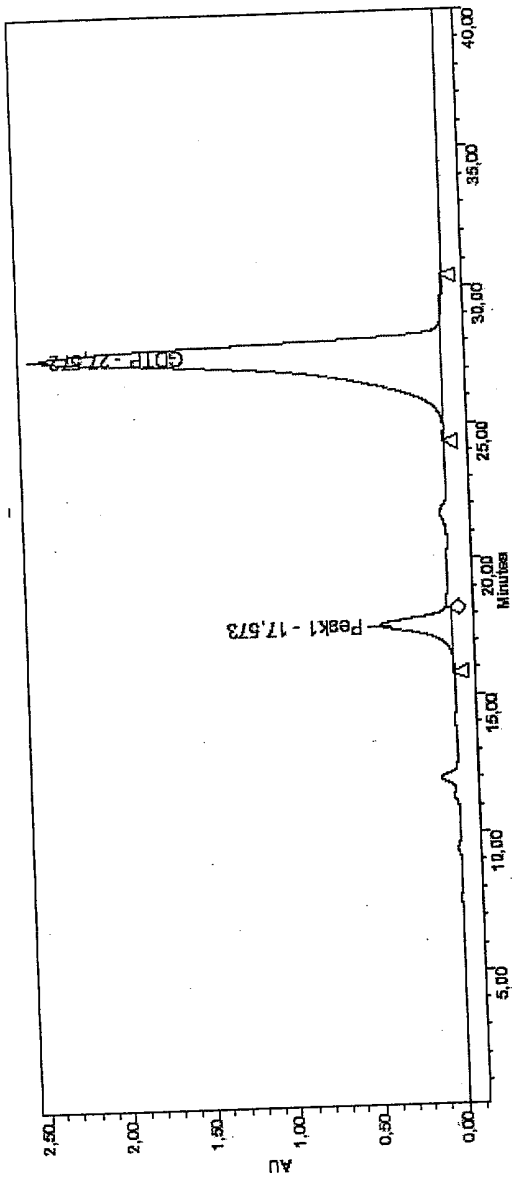

GDIP - 27,512
Peak1 - 17,573
AU
Minutes
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
5,00
10,00
15,00
20,00
25,00
30,00
35,00
40,00

FIGURE 4

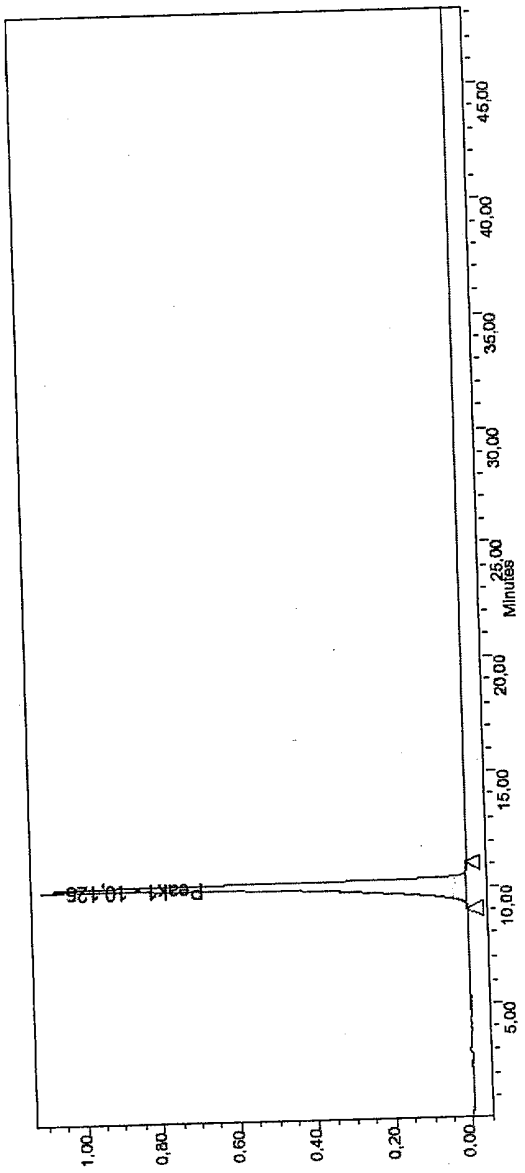

Peak1 - 10,126
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
5,00
10,00
15,00
20,00
25,00
30,00
35,00
40,00
45,00
Minutes

FIGURE 5

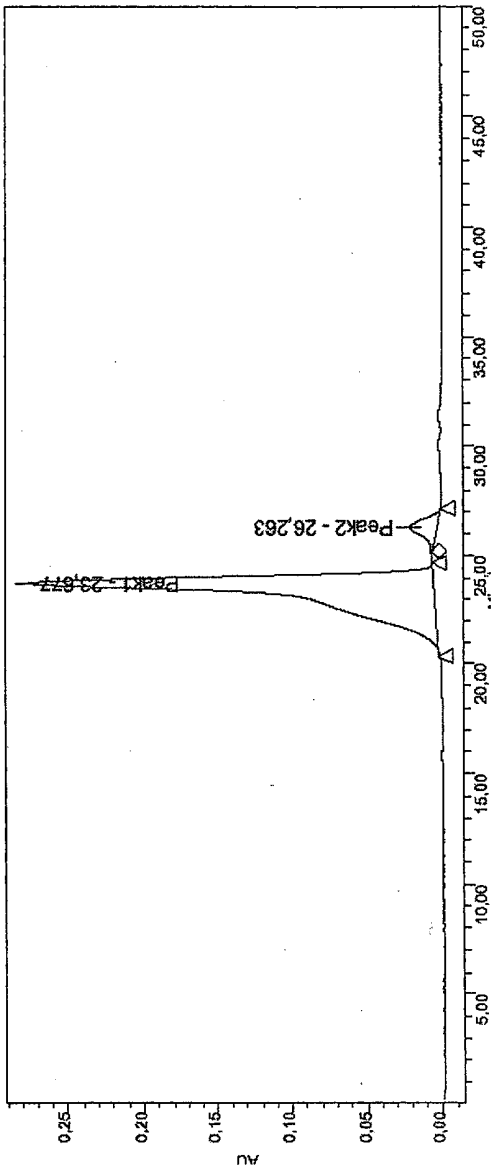

Peak1 - 23,872
Peak2 - 26,263
AU
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
5,00
10,00
15,00
20,00
25,00
30,00
35,00
40,00
45,00
50,00

FIGURE 6

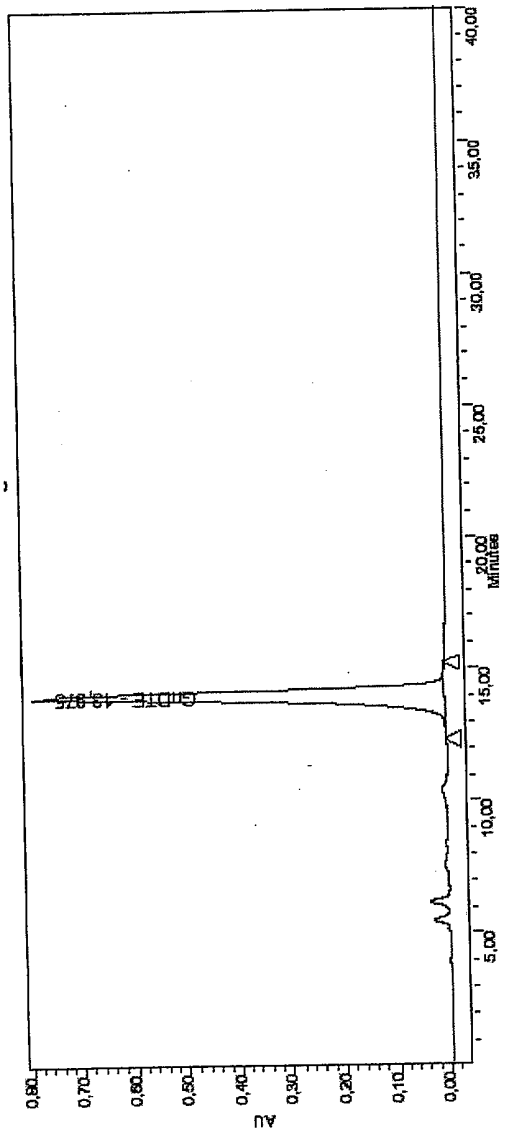

0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
AU
5,00
10,00
15,00
20,00
25,00
30,00
35,00
40,00
Minutes

FIGURE 7

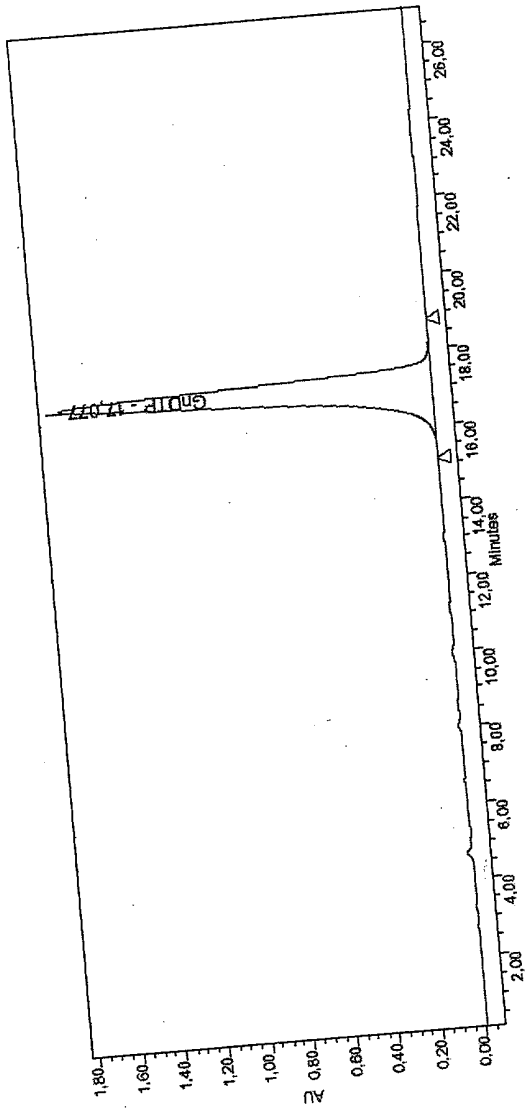

GNOIF - 17.077
Minutes
mV
2,00
4,00
6,00
8,00
10,00
12,00
14,00
16,00
18,00
20,00
22,00
24,00
26,00
0,00
0,20
0,40
0,60
0,80
1,00
1,20
1,40
1,60
1,80

FIGURE 8

INPI
INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement national

FA 629563
FR 0210407

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	US 5 385 936 A (MARY R. FLACK) 31 janvier 1995 (1995-01-31) * colonne 1 - colonne 8 * -----	1,14-17	C07D521/00 C07D409/06 C07C49/172 C07C47/56 A61K31/385 A61K31/343 A61K31/39 A61K31/12 A61K31/11 A61P35/00

DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)

C07D
A61K
A61P

1

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
14 juillet 2003	Francois, J

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

.....

& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0210407 FA 629563

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 14-07-2003
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5385936 A	31-01-1995	US 6114397 A	05-09-2000

EPO FORM P0465