CH 690 163 A5

(19) CONFÉDÉRATION SUISSE
INSTITUT FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

(11) CH 690 163 A5

(51) Int. Cl.[7]: A 61 K 031/66
C 07 F 009/40
A 61 P 035/00
A 61 P 035/04

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

(21) Numéro de la demande: 02213/95

(22) Date de dépôt: 28.07.1995

(24) Brevet délivré le: 31.05.2000

(45) Fascicule du brevet publiée le: 31.05.2000

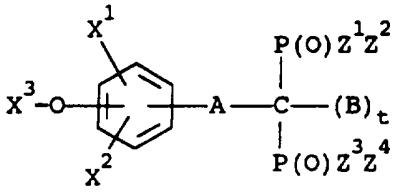
(73) Titulaire(s):
Symphar S.A., 243, route des Fayards,
1290 Versoix (CH)

(72) Inventeur(s):
Phan, Hieu Trung, Chemin de Bénuyer,
CH-1295 Tannay (CH)
Nguyen, Lân Mong, La Levratte 14,
CH-1260 Nyon (CH)
Bentzen, Craig Leigh, Ch. de la Chèvrerie 3,
Pré-Bonnet, CH-1261 Bogis-Bossey (CH)
Eric Niesor, Chemin de Bonmont 13C,
1260 Nyon (CH)
Jean-Luc Thuillard, Champ-de-Joux 660,
1264 St-Cergue (CH)
Jean Flach, 38, Avenue d'Echallens,
1004 Lausanne (CH)

(74) Mandataire:
Micheli & Cie ingénieurs-conseils,
122, rue de Genève, Case postale 61,
1226 Thônex (Genève) (CH)

(54) Dérivés gem-diphosphonates substitués utiles en tant qu'agents anti-cancers.

(57) On décrit une nouvelle activité thérapeutique des dérivés gem-diphosphonates de formule (I)



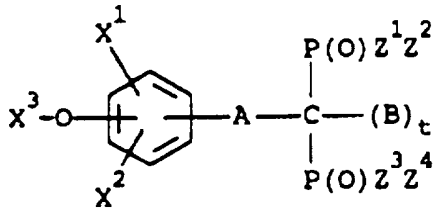
(I)

où X^1, X^2, X^3, A, B, t, Z^1, Z^2, Z^3 et Z^4 ont les significations données dans la revendication 1, pour la préparation de compositions pharmaceutiques utiles dans le traitement du cancer.

Description

La présente demande de brevet décrit une nouvelle utilisation des dérivés gem-diphosphonates substitués par des groupes phénols dans le traitement du cancer. Plus précisément, cette demande décrit une nouvelle utilisation des dérivés de formule (I), en particulier le composé 1, pour la préparation des compositions pharmaceutiques utiles dans le traitement de divers types de cancers tels que les carcinomes du colon ou du pancréas, les cancers du sein, etc. Le mécanisme d'action spécifique du Composé 1 fait que ce produit est particulièrement utile dans la prévention de la croissance des tumeurs où l'oncogène ras est impliqué et dans la prévention des invasions métastasiques.

La présente invention est basée sur la constatation que certains dérivés diphosphonates sont de manière inattendue actifs dans le traitement de cancers. En particulier, ces diphosphonates ont la formule (I) suivante:

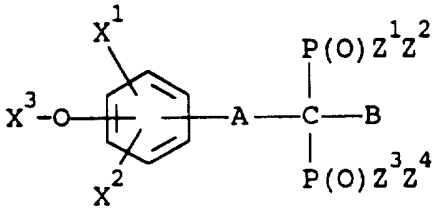


(I)

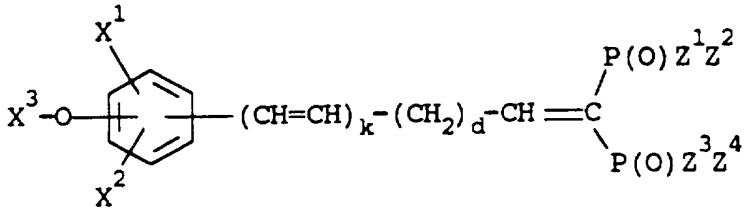
où:

- Z^1, Z^2, Z^3 et Z^4 identiques ou différents sont:
- OR où R est H, un groupe alkyle droit, ramifié ou cyclique ayant de 1 à 8 atomes de carbone,
- OM où M est un ion alcalin ou alcalino-terreux, un groupe ammonium NR_4 où R a la même définition que précédemment,
- NR_2 où R a la même définition que précédemment,
- Z^1, Z^2 et Z^3, Z^4 peuvent former un cycle alkylidènedioxy ayant de 2 à 8 atomes de carbone,
- X^1, X^2 identiques ou différents sont H, un atome halogène, un groupe alkyle ou alkoxy droit, ramifié ou cyclique ayant de 1 à 8 atomes de carbone,
- X^3 est H, un groupe alkyle R^1 de 1 à 4 atomes de carbone, un groupe acyle $C(O)R^1$, un groupe carbamyle $C(O)NHR^1$ où R^1 est comme décrit précédemment; X^3O et l'un des deux autres substituants X^1 ou X^2 peuvent former un cylcle alkylidènedioxy ayant de 1 à 4 atomes de carbone,
- A est $-CH=CH-CH_2-$, $-(CH_2)n-$, $-O(CH_2)n-$, $-S-$, $-SO_2-$. $-S(CH_2)n-$, $-SO_2(CH_2)n-$ où n est un nombre entier compris entre 1 et 7,
$-(CH=CH)_k-(CH_2)_d-CH=$ où k est zéro ou 1 et d est un nombre entier compris entre zéro et 4,
- B est H, un groupe alkyle ayant de 1 à 4 atomes de carbone,
- t est zéro ou 1, à condition que t soit zéro seulement quand A est $-(CH=CH)_k-(CH_2)d-CH=$ où k et d sont comme décrits précédemment.

Les composés de formule (1) incluent les alkylidènediphosphonates substitués par des groupes phénols (Ia) et les alkénylidènediphosphonates substitués par des groupes phénols (1b)



(Ia)



(Ib)

où X^1, X^2, X^3, A, B, t, k, d, Z^1, Z^2, Z^3 et Z^4 correspondent à la description précédente.

Les composés de structure (Ia) comprennent par exemple ceux où:
- X^1, X^2, identiques ou différents, sont des groupes alkyles de 1 à 8 atomes de carbone,
- X^3 est hydrogène,
- A est $CH=CH-CH_2$, $(CH_2)_n$, S, SO_2, $S-(CH_2)_n$, $SO_2-(CH_2)_n$ où n=1–7,
- B est hydrogène ou un groupe C_1–C_4,

Z^1, Z^2, Z^3, Z^4, identiques ou différents sont OH, des groupes alkoxy de 1 à 8 atomes de carbones, ou un ou tous les deux paires Z^1, Z^2 et Z^3, Z^4 sont un groupe alkylidène de 2 à 8 atomes de carbone.

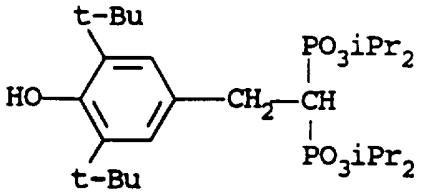
Les composés de structure (1b) comprennent par exemple ceux où:
- X^1, X^2, identiques ou différents sont des groupes alkyles de 1 à 8 atomes de carbone,
- X^3 est hydrogène,
- k est zéro ou 1 et d est de zéro à 4,
- Z^1, Z^2, Z^3, Z^4, identiques ou différents sont OH, des groupes alkoxy de 1 à 8 atomes de carbone, ou un ou tous les deux paires Z^1, Z^2 et Z^3, Z^4 sont un groupe alkylidène de 2 à 8 atomes de carbone.

Le brevet US N° 5 043 330 (1991) correspondant au brevet européen N° 0 339 237 décrit la synthèse des composés de formule (1) et leur utilisation comme agents hypolipidémiants, par exemple dans le traitement des maladies cardiovasculaires.

Cette invention se distingue clairement de l'art antérieur précité et se rapporte à l'observation que les diphosphonates de formule (1) sont efficaces de manière surprenante dans l'inhibition spécifique de la modification post traductionelle (processing) de l'oncogène ras (addition du groupement farnésyl) qui est exprimé d'une manière anormale ou qui mute dans un grand nombrel de cancers. Il a été bien établi que l'inhibition du processing de ras empêche la prolifération de cellules dépendante de ras, à la fois in vitro et in vivo. Nous fournissons les preuves dans cette demande que le composé 1 inhibe in vitro et in vivo le processing de ras et de ce fait possède des activités anticancers.

Ainsi, cette invention décrit une nouvelle utilisation des gem-diphosphonates de formules (I) pour le traitement de cancers, notamment ceux où ras est impliqué. Plus particulièrement, cette invention décrit une nouvelle utilisation du composé 1 de formule (I) où X^1 et X^2 sont tous deux tert-butyl, respectivement aux positions 3- et 5-, A est CH_2, B est H, t est 1 et Z^1, Z^2, Z^3, Z^4 sont tous iso-propyl, pour la préparation de compositions pharmaceutiques utiles dans le traitement de cancers.

Le composé 1 a la structure et la formule suivantes:



Ditertiobutyl P-3,5-hydroxy-4-phényl)-2 éthylidènediphosphonate-1,1 de tétraisopropyle

La majorité des médicaments anticancers sont des composés cytotoxiques qui manquent de spécificité pour les cellules tumorales et qui affectent également les cellules normales, il en résulte des effets secondaires toxiques. C'est pourquoi il est toujours nécessaire de développer des agents anticancers spécifiques qui agissent au niveau des oncogènes.

On a démontré la présence de l'oncogène ras dans un grand nombre de tumeurs humaines, y compris les tumeurs du pancréas, du colon, de la thyroïde et du poumon (J. L. Bos, Cancer Res. 1989; 49: 4682–4689). On a également établi que les formes mutées de la protéine ras sont présentes uniquement dans les tumeurs et non dans les tissus sains des patients atteints de cancer. Le bloquage de la faculté des protéines ras à transformer les cellules normales en cellules tumorales constitue ainsi une cible thérapeutique intéressante. Un certain nombre d'approches a été proposé, le plus intéressant à l'heure actuelle étant les modifications post traductionnelles des protéines ras engendrées par le processus de farnésylation. L'enzyme farnésyl transférase catalyse l'attachement du farnésyl, un groupement isoprénoïde de 15 atomes de carbone, à la cystéine proche du groupe carboxyl terminal de la protéine ras. La protéine ras non processée n'est pas capable de s'ancrer aux membranes plasmatiques et par conséquent ne peut pas exercer son activité oncogène.

Nous avons sélectionné comme modèle de test in vitro un clone des cellules NIH 3T3 transfecté avec l'oncogène T24 (H-ras) provenant du cancer humain de la vessie. Cette lignée de cellules dénommée PAP2 est caractérisée par un haut niveau d'expression de ras et a été sélectionnée sur la base de sa capacité métastasique (S.A. Hill et al, J. Nat. Cancer Inst. 1988; 80: 484–490). De ce fait, les cellules PAP2 possèdent des propriétés ras qui sont liées à la pathogénèse des cancers chez l'homme. Ces cellules ont été utilisées pour tester in vitro les effets des produits de formule (I) sur la prolifération des cellules. Lorsqu'elles sont injectées par voie sous-cutanée dans des souris immunodéficientes, ces cellules forment rapidement des tumeurs solides. L'activité anticancer des produits testés est mesurée in vivo après leur administration orale.

Les résultats d'une série de tests in vitro et in vivo ont mené à la découverte que le composé 1, un analogue représentatif des composés de formule (I):
- inhibe la synthèse du ADN dans les cellules NIH 3T3 transfectées par le H-ras (PAP2),
- inhibe la croissance des cellules PAP2 en culture de tissus et
- exerce une activité dans les souris nues porteuses de tumeurs solides produites par l'injection sous-cutanée de cellules PAP2.

Le mécanisme principal responsable de ces activités est l'inhibition du processing de l'oncogène ras obtenu en empêchant l'attachement du groupe farnésyl nécessaire pour les activités liés à cette protéine.

Les résultats expérimentaux présentés dans les tables 1–4b fournissent la preuve que les composés de formule (I), et en particulier le composé 1, sont potentiellement utiles dans le traitement des cancers où le gène ras est impliqué, tels que les tumeurs du pancréas, du colon, de la thyroïde et du poumon. Cette activité anticancer récemment découverte des composés de formule (1) est inattendue et est indépendante de leurs activités déjà publiées en tant qu'agents hypolipidémiants.

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne ± sem. L'analyse statistique des différences est estimée avec le test de t de Student pour les valeurs non appariées.

Résultats in vitro

Exemple 1
Inhibition de la prolifération cellulaire ras-dépendante

Culture de cellules

Les cellules NIH 3T3 transfectées par H-ras (PAP2) (S.A. Hill et al, J. Nat. Cancer Inst. 1988; 80: 484–490) sont cultivées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO_2 dans des flacons en plastique de 75 cm^2 dans du milieu Dubelcco's modified Eagle (DMEM) avec 25 mM HEPES et 10% de sérum de veau. Les cellules PAP2 sont trypsinisées deux fois par semaine avant confluence.

1. Inhibition de la synthèse de l'ADN

La synthèse de l'ADN est mesurée par l'incorporation de la Thymidine tritiée dans du matériel précipitable à l'acide trichloroacétique (TCA) par des cellules PAP2 cultivées. Puis, suite à l'incubation avec le Composé 1 dissous dans l'éthanol, 0,5 µCi de méthyl-[3H]-thymidine (activité spécifique 82 Ci/mmol) sont ajoutés et le marquage est effectué pendant 4h. Les cellules sont alors lavées avec 1 ml de solution saline tamponnée par du phosphate (PBS) froide et solubilisées avec 0,2 ml de dodécylsulfate de sodium à 4%. L'extrait cellulaire est précipité avec 1 ml de TCA à 30% et gardée sur la glace pendant 1 h. Le précipité est obtenu par filtration sur des filtres à fibres de verre et sont lavées avec 5 ml de TCA. La radioactivité sur les filtres est comptée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

Tableau 1
Inhibition de la synthèse de l'ADN par le composé 1 dans les cellules transfectées par ras
Incorporation de 3H-Thymidine dans de l'ADN (coups par min, cpm)

	concentration du composé 1					
	0	0,5 µM	2 µM	5 µM	10µM	25 µM
cpm	53021	45607	37130	30226	18772	14100
sem	7296	5354	2590	3945	1481	2766
% changement	0	–14	–30	–43	–65	–73
p		0,427	0,075	0,016	0,009	0,005

La valeur IC50 calculée du composé 1 pour l'inhibition de la synthèse de l'ADN dans les cellules PAP2 est 3,75 µM.

Les résultats indiqués dans le tableau 1 montrent que les composés de formule (I), en particulier le composé 1, inhibent la synthèse de l'ADN dans les cellules transfectées par ras.

2. Inhibition de la prolifération cellulaire

Les effets du composé 1 sur la prolifération cellulaire ont été étudiés par deux méthodes:
- comptage des cellules avec un hémacytomètre et détermination de l'ADN en parallèle,
- estimation du nombre de cellules par dosage colorimétrique MTT.

2.1. Comptage de cellules et contenu en ADN

En bref, les cellules PAP2 sont semées à une concentration de 3×10^4 par puits dans des plaques à 24 puits 4h avant l'addition de concentrations croissantes du composé à tester. Les cellules sont trypsinisées quotidiennement. Un aliquote de la suspension cellulaire est compté à l'aide d'un hémacytomètre. Les cellules restantes sont lysées dans du NaOH à 0,01 N et la concentration en ADN est déterminée par spectrofluorimétrie en utilisant le diamidino-4,6-phényl2-indole comme fluorochrome et l'ADN de thymus de veau comme standard.

Tableau 2a
Inhibition de la prolifération de cellules PAP2 par le composé 1
(nombre de cellules par puits)

	concentration de composé 1					
	0	0,1	0,5 µM	10 µM	5,0 µM	10µM
Nbre de cellules/puits	273750	256250	208750	186250	102500	71250
sem	9437	7465	4270	15861	5951	8260
% changement		–6	–24	–32	–63	–74
p		0,196	0,001	0,003	0,001	0,001

La valeur IC50 calculée du composé 1 pour l'inhibition de la croissance de cellules PAP2 est 1,02 µM.

Tableau 2b
Diminution de la concentration en ADN produite par le composé 1 dans les cellules PAP2 cultivées
ADN (mg/puits)

	concentration de composé 1					
	0	0,1 µM	0,5 µM	1,0 µM	5,0 µM	10 µM
ADN (mg/puits)	4,62	4,40	4,04	1,99	1,66	0,34
sem	0,14	0,18	0,42	0,14	0,07	0,04
changement		–5	–13	–57	–64	–93
p		0,375	0,240	0,001	0,001	0,001

La valeur IC50 calculée du composé 1 pour la diminution du contenu en ADN des cellules PAP2 est 2,77 µM.

Les résultats reportées dans les tableaux 2a et 2b indiquent que les composés de formule (I), en particulier le Composé 1, inhibent la croissance des cellules PAP2 en culture.

2.2. Dosage colorimétrique MTT

Le nombre de cellules est estimée par la méthode MTT effectuée essentiellement d'après T. Mosmann, J. Immunol Method 1983;65:55-63. En bref, les cellules PAP2 sont semées à une concentration de 1×10^4 par puits dans des plaques à 96 puits (Falcon). Après une période d'incubation de 24 h, 48 h ou 72 h, 10 µl de MTT [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliurn bromure] dissous dans du PBS à 5 mg/ml sont additionnés à chaque puits et incubés à 37°C pendant 4 h. On enlève le milieu et ajoute 100 µl de HCl 0,04 N dans l'isopropanol dans les puits. L'absorbance du colorant qui a réagi est mesurée à 570 nm à l'aide d' un lecteur à microplaques avec soustraction du bruit de fond à 620 nm.

La valeur IC50 calculée du composé 1 pour l'inhibition de la prolifération des cellules PAP2, mesurée par la méthode MTT (après 72 h d'incubation) est 8,05 µM.

Les résultats reportés aux tableaux 3a, 3b et 3c de la page suivante confirment par un autre dosage que les composés de formule (I), en particulier le composé 1, inhibent la croissance des cellules PAP2 en culture.

Effet du composé 1 sur la prolifération des cellules PAP2 mesuré par le dosage MTT

Tableau 3a
Incubation avec du composé 1 pendant 24 h
(densité optique OD à 570 nm)

	concentration de composé 1					
	0	1,0 µM	2,5 µM	5 µM	10 µM	25 µM
OD	39,9	39,5	37,6	35,9	28,9	21,4
sem	2,1	4,6	1,2	1,0	1,1	1,0
% changement	0	–1	–6	–10	–28	–46
p		0,942	0,370	0,109	0,001	0,001

Tableau 3b
incubation avec du composé 1 pendant 48 h
(densité optique OD à 570 nm)

	concentration de composé 1					
	0	1,0 µM	2,5 µM	5µM	10 µM	25 µM
OD	71,3	66,5	59,4	52,8	37,3	15,1
sem	5,2	4,9	2,5	3,1	1,9	0,7
% changement	0	–7	–17	–26	–48	–79
p		0,516	0,059	0,009	0,001	0,001

Tableau 3c
Incubation avec du composé 1 pendant 72 h
(densité optique OD à 570 nm)

	concentration de composé 1					
	0	1,0 µM	2,5 µM	5 µM	10 µM	25 µM
OD	366,0	336,8	334,4	287,4	136,6	29,0
sem	30,3	19,0	18,6	16,5	15,5	6,3
% changement		–8	–9	–21	–63	–92
p		0,427	0,388	0,039	0,001	0,001

Résultats in vivo

Exemple 2
Inhibition de la croissance des tumeurs

Des souris nues (Swiss nu/nu) âgées de sept à neuf semaines sont injectées par voie sous-cutanée avec 0,5 ml de cellules PAP2 (5×10^5 cellules par 0,5 ml de DMEM) au jour 0. Le traitement oral avec le composé 1 commence le même jour. Le groupe traité (n=18) reçoit le composé 1 mélangé dans de la nourriture (0,03% p/p) et le groupe contrôle (n=22) reçoit une nourriture sans adjonction de produit. Au jour 15, les souris sont pesées, sacrifiées et les tumeurs sont excisées et pesées.

Tableau 4a
effet du traitement oral avec le composé 1 (50 mg/kg) sur le poids des tumeurs produites par injection par voie sous-cutanée de cellules PAP2 dans des souris nues

groupe	poids du corps (g) (moyenne ± sem)	Poids des tumeurs (g) (moyenne ± sem)
contrôle (n = 21)	24,2 ± 0,5	0,228 ± 0,041
traité (n = 18)	24,6 ± 0,7	0,053 ± 0,016
% changement	+2	–77
p	0,6470	0,0006

Les résultats reportés au tableau 4a montrent que le poids moyen des tumeurs dans le groupe traité diminue d'une manière significative, indiquant par là que le composé 1 est un puissant inhibiteur de croissance des tumeurs. Les poids corporels des souris dans les groupes contrôle et traité sont identiques et indiquent ainsi l'absence de toxicité du composé 1.

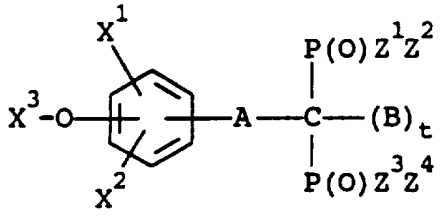
Dans une autre série d'expériences le composé 1 est testé à des doses de 12,5 mg/kg, 50 mg/kg et 100 mg/kg. Les résultats du tableau 4b indiquent que le composé 1 inhibe la croissance des tumeurs dans les souris nues à des doses aussi basses que 12,5 mg/kg et ce d'une manière dose dépendante. Ces résultats suggèrent que les composés de structure (I), en particulier le composé 1, sont de puissants anti-tumeurs actifs par voie orale qui n'ont pas d'effet toxique sur les cellules saines.

Tableau 4b
Diminution du poids des tumeurs des souris nues injectées par voie sous-cutanée avec des cellules PAP2 obtenue avec un traitement oral à des doses différentes de composé 1

groupe	poids du corps (g (moyenne ± sem)	poids des tumeurs (g) (moyenne ± sem)
contrôle (n=14)	24,7 ± 0,6	0,276 ± 0,056
traité, 12,5 mg/kg (n=5)	23,9 ± 0,8	0,053 ± 0,026
% changement	–3	–81
p	0,4562	0,0472
traité, 50 mg/kg (n=6)	27,2 ± 1,0	0,037 ± 0,020
% changement	+10	–87
p	0,0523	0,0211
traité, 100 mg/kg (n=6)	24,5 ± 0,3	0,025 ± 0,011
% changement	–1	–91
p	0,7619	0,0151

Revendications

1. Utilisation d'un gem-diphosphonate substitué choisi parmi les composés de formule (I):



(I)

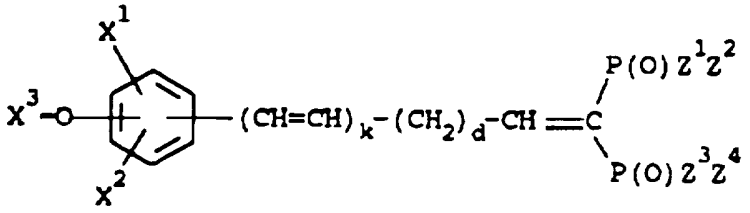
où
– Z^1, Z^2, Z^3 et Z^4 identiques ou différents sont:
– OR où R est H, un groupe alkyle droit, ramifié ou cyclique ayant de 1 à 8 atomes de carbone,
– OM où M est un ion alcalin ou alcalino-terreux, un groupe ammonium NR_4 où R a la même définition que précédemment,

– NR_2 où R a la même définition que précédemment,
– Z^1, Z^2 et Z^3, Z^4 peuvent former un cycle alkylidènedioxy ayant de 2 à 8 atomes de carbone,
– X^1, X^2, identiques ou différents sont H, un atome halogène, un groupe alkyle ou alkoxy droit, ramifié ou cyclique ayant de 1 à 8 atomes de carbone,
– X^3 est H, un groupe alkyle R^1 de 1 à 4 atomes de carbone, un groupe acyle $C(O)R^1$, un groupe carbamyle $C(O)NHR^1$ où R^1 est comme décrit précédemment; X^3O et l'un des deux autres substituants X^1 ou X^2 peuvent former un cycle alkylidènedioxy ayant de 1 à 4 atomes de carbone,
– A est $-CH=CH-CH_2-$, $-(CH_2)_n-$, $-O(CH_2)_n-$, $-S-$, $-SO_2-$, $S(CH_2)_n-$, $-SO_2(CH_2)_n-$, où n est un nombre entier compris entre 1 et 7, $-(CH=CH)_k-(CH_2)_d-CH=$ où k est zéro ou 1 et d est un nombre entier compris entre zéro et 4,
– B est H, un groupe alkyle ayant de 1 à 4 atomes de carbone, t est zéro ou 1, à condition que t soit zéro seulement quand A est $-(CH=CH)_k-(CH_2)_d-CH=$ où k et d sont comme décrits précédemment, pour la préparation d'une composition pharmaceutique utile pour le traitement de cancers.

2. Utilisation selon la revendication 1 d'un diphosphonate choisi parmi les composés de formule (I) pour la préparation d'une composition pharmaceutique utile pour traiter la croissance de tumeurs solides, par exemple les tumeurs du colon, du pancréas, de la thyroïde, du poumon et du sein.

3. Utilisation selon la revendication 1 d'un diphosphonate choisi parmi les composés de formule (I) pour la préparation d'une composition pharmaceutique utile pour la prévention des invasions métastasiques des tissus sains par les cellules cancéreuses.

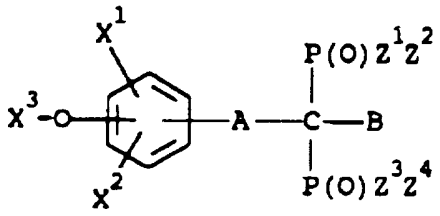
4. Utilisation selon la revendication 1 d'un alkylidènediphosphonate choisi parmi les composés de formule (Ia):



(Ib)

où X^1, X^2, X^3, A, B, Z^1, Z^2, Z^3 et Z^4 sont comme décrits précédemment.

5. Utilisation selon la revendication 1 d'un alkénylidène diphosphonate choisi parmi les composés de formule (1b):



(Ia)

où X^1, X^2, X^3, k, d, Z^1, Z^2, Z^3 et Z^4 sont comme décrits précédemment.

6. Utilisation du ditertiobutyl-3,5-hydroxy-4-phényl)-2 éthylidènediphosphonate-1,1 de tétraisopropyle selon la revendication 1.