

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :  
(A n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction).

**2 483 928**

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21) **N° 81 11336**

- 
- (54) Dérivés de la N-trifluoracétyladriamycine, leur préparation et leurs utilisations thérapeutiques.
- (51) Classification internationale (Int. Cl. 3). C 07 H 15/24; A 61 K 31/70.
- (22) Date de dépôt ..... 9 juin 1981.
- (33) (32) (31) Priorité revendiquée : EUA, 9 juin 1980, n° 157 861.

- (41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande ..... B.O.P.I. — « Listes » n° 50 du 11-12-1981.

- (71) Déposant : Société dite : SIDNEY FARBER CANCER INSTITUTE, INC., résidant aux EUA.

- (72) Invention de : Mervyn Israel et Gopalakrishnan Potti.

- (73) Titulaire : *Idem* (71)

- (74) Mandataire : Cabinet Plasseraud,  
84, rue d'Amsterdam, 75009 Paris.
-

Dérivés de la N-trifluoracétyladriamycine, leur préparation et leurs utilisations thérapeutiques.

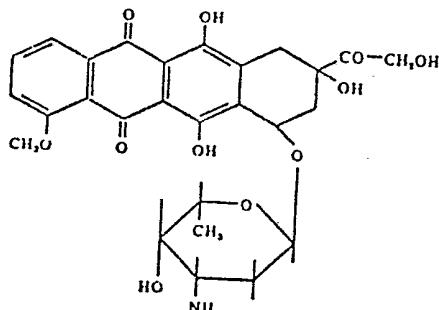
La présente invention a été faite dans le cours de travaux subventionnés par le Ministère de la Santé des 5 Etats-Unis (Department of Health, Education and Welfare) Elle concerne de nouveaux dérivés hydrosolubles de l'adriamycine, leur préparation et leurs utilisations thérapeutiques.

Les composés selon l'invention ont une activité 10 anti-tumeur sur les leucémies murines P 388 et L 1.210 et sont peu toxiques. L'invention comprend donc également des compositions thérapeutiques contenant ces composés avec un véhicule aqueux non toxique acceptable pour l'usage pharmaceutique et qu'on peut utiliser pour l'administration 15 à des souris souffrant de certaines tumeurs en vue d'accroître leur espérance de vie.

L'adriamycine, également connue sous le nom de doxorubicine et la daunomycine, également connue sous le nom de daunorubicine ont été décrites, avec des composés 20 apparentés tels que certains dérivés N-trifluoracétylés, dans les brevets US n° 3 590 028 et 3 803 124. Le second de ces brevets décrit également la préparation du 14-acétate de la N-trifluoracétyladriamycine (appelé 14-acétoxy-N-trifluoracétyldaunomycine) mais il n'indique pas que ce composé 25 possède une activité thérapeutique ou pharmacologique quelconque et il n'en suggère aucune utilisation, excepté pour la préparation de la N-trifluoracétyladriamycine à partir de laquelle on peut préparer par voie chimique l'adriamycine.

30 L'adriamycine diffère de la daunomycine en ce qu'elle comporte un groupe hydroxy en position 14 alors que la seconde porte, à la place, un atome d'hydrogène. La formule de la structure de l'adriamycine est la suivante :

5



10

Dans le brevet U.S. n° 4 035 566, on décrit des 14-alcanoates de la N-trifluoracétyladriamycine dans lesquels le radical d'alcanoate est en C 2 - C 10, et également des compositions thérapeutiques qui contiennent ces composés ; on indique que ces composés ont une activité 15 anti-tumeur.

Bien que la daunorubicine et l'adriamycine présentent de l'intérêt dans le traitement clinique d'un certain nombre de maladies néoplasiques, y compris des leucémies, des lymphomes et diverses tumeurs solides, 20 spécialement des sarcomes des tissus mous, leur utilisation est compromise par des effets secondaires de toxicité, spécialement une myélosuppression aiguë et une cardio-toxicité cumulative avec les doses, ces deux effets secondaires limitant les doses. Le 14-valérate de N-trifluoracétyl-adriamycine, l'un des composés décrits dans le brevet U.S. n° 4 035 566, a fait l'objet d'études approfondies et on a trouvé qu'il était supérieur par ses propriétés thérapeutiques à l'adriamycine et à la daunomycine. En outre, il est en général moins毒ique et en particulier nettement moins 30 cardiotoxique que le médicament apparenté, aussi bien dans des essais cliniques sur animaux d'expérience que dans des essais cliniques sur des humains.

Toutefois, ce composé est fortement lipophile et par conséquent essentiellement insoluble dans l'eau.

Pour l'utilisation clinique, le médicament doit être mis sous une forme convenant à l'administration intraveineuse dans un véhicule contenant un agent tensio-actif. La formulation couramment utilisée contient le composé en solution à 5 une concentration finale de 0,35 mg/ml dans un milieu à 0,5% d'Emulphor EL-620 (huile de ricin polyéthoxylée), 0,5% d'éthanol et 99% de serum physiologique. Ainsi, un patient dont la surface corporelle est de  $1,0 \text{ m}^2$  recevant une dose de  $600 \text{ mg/m}^2$  du médicament, à savoir la dose clinique 10 administrée habituellement en 24 heures une fois tous les 21 jours, doit absorber cette dose dans environ 1,7 litre d'infusat. Ces volumes importants conduisent à administrer le médicament sous forme de perfusion continue pendant 24 heures. Certains patients, à la dose de  $400 \text{ mg/m}^2$  ont 15 éprouvé, aux 2/3 environ de la perfusion, un syndrome de douleur dans la poitrine, apparemment dû au véhicule. L'administration d'un stéroïde (hémisuccinate d'hydrocortisone) a supprimé dans ces cas le complexe de symptômes, et la prophylaxie par les stéroïdes a été introduite dans la 20 pratique ; cette procédure a permis de prévenir la symptomologie de douleur de poitrine avec toutes les administrations subséquentes de médicament.

On a maintenant trouvé que le 14-O-hémiglutarate et le 14-O-hémiadipate de la N-trifluoracétyladriamycine 25 présentaient une cytotoxicité ou une activité anti-tumeur supérieure à celle de l'adriamycine et pratiquement égale à celle du 14-valérate de la N-trifluoracétyladriamycine mais étaient nettement moins toxiques que l'adriamycine ou la daunomycine, en termes de propriétés pharmacologiques, 30 pour les souris ; d'autre part, ils présentent dans l'eau, au pH physiologique dans l'intervalle de 7,2 à 7,5, une solubilité très supérieure à celle du 14-valérate de la N-trifluoracétyladriamycine dans les mêmes conditions et ils sont solubles même en l'absence d'agents dispersants 35 et d'alcools. En outre, malgré une solubilité très

supérieure dans l'eau, l'hémiglutarate et l'hémiadipate selon l'invention présentent une excellente résistance à l'hydrolyse et sont par conséquent suffisamment stables pour pouvoir être utilisés sous la forme de solutions aqueuses soumises à des transports et à des stockages pendant des durées substantielles.

5 Par suite, les composés selon l'invention peuvent être administrés dans le véhicule couramment utilisé en clinique pour le valérate correspondant mais à des concentrations 10 beaucoup plus fortes, de sorte qu'une simple dose individuelle de 10 à 20 ml peut remplacer la perfusion de 24 heures.

15 Les composés selon l'invention peuvent être préparés par des modes opératoires analogues à ceux servant à la préparation des 14-alcanoates de N-trifluoracétyl-adriamycine, tels que décrits dans le brevet U.S. 4 035 566, en remplaçant en général le sel de sodium d'acide alcanoïque par le sel monosodique de l'acide glutarique ou de l'acide adipique respectivement, et ils peuvent également être 20 préparés par d'autres procédés.

Les compositions thérapeutiques selon l'invention contenant les composés définis ci-dessus en tant que substances actives peuvent être préparées par dispersion ou dissolution de la substance active dans un véhicule 25 non toxique quelconque acceptable pour l'usage pharmaceutique et convenant pour le mode d'administration prévu, qui peut être parentéral, c'est-à-dire par injection intra-veineuse, intramulculaire, intrapéritonéale, ou un autre mode d'administration classique. De préférence, le véhicule 30 est un milieu aqueux tamponné à l'intervalle physiologique de 7,2 à 7,5. On peut utiliser des tampons classiques appropriés tels que le Tris, les phosphates, les bicarbonates ou les citrates. Si on le désire, on peut utiliser du 35 serum physiologique avec pH réglé et tamponné. On peut introduire des agents émulsionnants non-ioniques tels que

l'huile de ricin polyéthoxylée, le mono-oléate de sorbitanne polyéthoxylé ou une autre substance analogue en quantités allant jusqu'à 10% en poids, ainsi que de l'éthanol, pour améliorer la solubilité des composés

5 selon l'invention, comme dans le cas de l'administration clinique du valérate, mais en général cela est inutile car les composés sont solubles en proportions d'environ 60 mg/ml dans l'eau tamponnée à pH 7,2-7,5 sans adjonction d'agents émulsionnants ni d'alcool.

10 On a mis en évidence les propriétés de toxicité et l'efficacité thérapeutique des composés et substances actives selon l'invention dans des essais *in vitro* et *in vivo* sur des souris. Dans les essais *in vitro*, on a déterminé l'activité inhibitrice des substances sur la croissance 15 de la ligne de cellules CCRF-CEM en culture. La ligne de cellules a été obtenue à partir du sang périphérique d'un enfant souffrant de leucémie lymphoblastique comme décrit par Foley et collaborateurs, *Cancer*, volume 18, pages 522 et suivantes (1965), et les essais ont été réalisés selon 20 le mode opératoire de Foley et Lazarus, *Biochem. Pharmacol.*, volume 16, pages 659 et suivantes (1967), les résultats étant exprimés par la dose, en micromoles par litre, nécessaire pour inhiber de 50% la croissance des cultures par rapport à des cultures témoins auxquelles on n'ajoute 25 pas le médicament (DI<sub>50</sub>). Pour les essais *in vivo*, on a préparé une solution à une concentration de 0,2 à 0,7% en poids de l'agent actif dans un milieu consistant en 10% en volume d'huile de ricin polyéthoxylée et 10% en volume d'éthanol dans du sérum physiologique et on a administré 30 la dose voulue par injection intrapéritonéale. On a apprécié l'activité anti-tumeur sur les leucémies murine P 388 et murine L 1.210 des souris mâles BDF<sub>1</sub> selon les modes opératoires normalisés du National Cancer Institute, tels que décrits par Geran et collaborateurs, *Cancer* 35 *Chemotherap. Rep.* troisième partie, volume 3, pages 1 et

suivantes (1972), sauf que, pour conserver les produits, on a observé un programme qd 1-4 au lieu d'un programme qd 1-9.

On a déterminé la dose optimale en utilisant dans 5 les essais des doses représentant plusieurs multiples de 10 mg/mg de poids corporel. Selon le composé particulier utilisé, on a pu observer une certaine efficacité à des dosages allant de 30 à 70 mg/kg de poids corporel.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans 10 toutefois la limiter ; dans ces exemples, les indications de parties et de % s'entendent en poids sauf mention contraire.

Exemple 1

14-O-hémiglutarate de la N-trifluoracétyladriamycine.  
 15 Mode opératoire 1 : acétone au reflux. On introduit un mélange de 200 mg, 0,26 millimoles, de 14-iodo-N-trifluoracétyldaunomycine et 1,2 g de sel monosodique de l'acide glutarique dans 3 ml d'eau puis on dilue par 350 ml d'acétone. On chauffe le mélange de réaction au reflux 20 pendant 10 heures. Après refroidissement, on filtre le mélange de réaction et on lave le gâteau de filtration avec de l'acétone chaude jusqu'à ce que les lavages ne soient plus colorés. On évapore le filtrat et les lavages combinés à sec sous vide et on redissout le résidu dans 25 200 ml de chloroforme. On lave la solution chloroformique à trois reprises avec des portions de 150 ml d'eau, on sèche sur sulfate de sodium anhydre, on filtre et on évapore jusqu'à volume d'environ 2 à 3 ml. On chromatographie ce concentré sur une colonne d'acide silicique en utilisant 30 le chloroforme puis du chloroforme à 0,5% de méthanol comme éluants. On tritue une solution chloroformique concentrée du produit élué avec l'éther de pétrole ; on obtient 152 mg (rendement : 76%) de produit fondant à 141-144°C (déc.) ;  $[\alpha]_D + 228$  ( $c = 0,046$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) ; 35 UV/VIS  $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$  nm ( $\Sigma$ ) 233 (29.700), 240 (24.800), 277

(9.900), 478 (8.540), 495 (8.350), 531 (4.270) ; IR (KBr)  
 $\text{cm}^{-1}$  3450 large (OH, HO-C<sup>0</sup>-), 1715, 1705, 1620, 1580  
 (C = O et quinone).

Analyse élémentaire : C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>15</sub> :

5 calculé : C 54,20 ; H 4,56 ; F 7,56 ; N 1,86  
 trouvé : C 54,06 ; H 4,65 ; F 7,37 ; N 1,86

On obtient également ce produit avec un rendement de 60% en partant de la 14-bromo-N-trifluoracétyldaunomycine à la place du dérivé iodé.

10 Mode opératoire 2 : dans l'éthylène-glycol. On chauffe au bain d'huile à 65-70°C un mélange de 100 mg du sel monosodique de l'acide glutarique et 10 ml d'éthylène-glycol. A ce mélange, on ajoute 50 mg, 0,066 millimole, de 14-iodo-N-trifluoracétyldaunomycine et on maintient la 15 solution sous agitation vigoureuse à 65-70°C pendant 1 heure. On verse le mélange de réaction dans l'eau glacée et on extrait le produit par le chloroforme (3 x 50 ml). On lave la solution chloroformique à l'eau (3 x 100 ml), on sèche sur sulfate de sodium anhydre pendant 2 heures 20 et on concentre à petit volume sous vide. L'addition d'éther de pétrole provoque la précipitation d'une substance solide rouge qu'on sépare par filtration, qu'on lave à l'éther de pétrole et qu'on sèche. Le produit (45 mg, rendement : 90%) est purifié par cristallisation dans le 25 mélange chloroformé-éther éthylique-éther de pétrole ; on obtient une substance identique par toutes les propriétés spectrales et chromatographiques à celle obtenue par le mode opératoire 1 ci-dessus.

Mode opératoire 3 : dans le diméthylformamide. (DMF).

30 On dissout 40 mg du sel monosodique de l'acide glutarique dans 10 ml de DMF en chauffant 10 mn à 120°C. On refroidit la solution à 70°C et on ajoute sous agitation 25 mg, 0,033 millimole, de 14-iodo-N-trifluoracétyldaunomycine. On maintient le mélange de réaction à 65-70°C pendant 35 1 heure, on refroidit et on élimine le DMF sous vide.

L'isolement et la purification effectués comme dans le mode opératoire 2 ci-dessus donnent 23 mg de l'hémiglutarate recherché (rendement : 92 %).

EXEMPLE 2

- 5 14-O-hémiadipate de la N-trifluoracétyldaunomycine.  
Mode opératoire 1 : dans l'acétone au reflux. On introduit un mélange de 150 mg, 0,2 millimole, de 14-iodo-N-trifluoracétyldaunomycine et 1,0 g de sel monosodique de l'acide adipique dans 300 ml d'acétone contenant 2 ml d'eau.
- 10 On chauffe le mélange de réaction au reflux pendant 12 heures. En terminant comme pour l'hémiglutarate, mode opératoire 1, on obtient 133 mg (rendement : 85 %) d'une substance solide rouge fondant à 135-140°C (déc.) ;  $[\alpha]_D + 201$  ( $c = 0,016$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) ; IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  3460 large
- 15  $^0_{\text{O}}$   
 $(\text{OH}, \text{HO}-\text{C}-)$ , 1720, 1710, 1680, 1650, ( $\text{C}=\text{O}$  et quinone) ;  
 $\text{UV/VIS } \lambda_{\text{max}}^{\text{O}} \text{ nm } (\Sigma)$  223 (33,200), 241 (23,800),  
276 (9,020) 478 (9,780), 497 (9,590), 532 (4,990).  
Analyse élémentaire :  $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{F}_3\text{NO}_{15}$
- 20 Calculé : C 54,76 ; H 4,72 ; F 7,46 ; N 1,82  
Trouvé : C 54,59 ; H 4,49 ; F 7,22 ; N 1,77  
Lorsqu'on remplace le produit de départ iodé par la 14-bromo-N-trifluoracétyl-daunomycine, on obtient l'hémiadipate avec un rendement de 64 %.
- 25 Mode opératoire 2 : dans l'éthylène-glycol. Le traitement de 100 mg de sel monosodique de l'acide adipique et 40 mg, 0,053 millimole, de 14-iodo-N-trifluoracétyldaunomycine dans 15 ml d'éthylène-glycol dans les conditions de réaction et d'isolement décrites pour l'hémiglutarate,
- 30 mode opératoire 2, donne 38 mg (rendement : 93 %)  
d'hémiadipate identique au produit obtenu par le mode opératoire 1 ci-dessus par toutes ses caractéristiques chimiques et physiques.
- Mode opératoire 3 : dans le diméthylformamide. La réaction 35 de 200 mg de sel monosodique de l'acide adipique et 200 mg,

0,26 millimole, de 14-ido-N-trifluoracétyldaunomycine dans le DMF comme décrit pour l'hémiglutarate, mode opératoire 3, donne 182 mg de l'hémiadipate recherché (rendement : 89 %).

5 La solubilité dans l'eau (tamponnée à pH 7,40 par du phosphate de potassium monobasique et de l'hydroxyde de sodium certifiés Fisher) du 14-O-hémiglutarate de la N-trifluoracétyladriamycine est de 65 mg/ml à 22°C ; celle de l'hémiadipate est de 60 mg/ml alors que celle du 10 valérate représente quelques microgrammes. On a déterminé la stabilité de l'hémiglutarate et de l'hémiadipate en dissolvant des quantités connues de chacun d'eux dans des tampons aqueux à des pH déterminés. On a conservé des échantillons de chaque solution pendant 24 heures à 15 l'obscurité à 4°C et 27°C respectivement puis on a appliqué sur des plaques de gel de silice G pour chromatographie sur couche mince, sur support de verre (couche de 250 microns d'épaisseur) et on a développé les plaques dans un mélange solvant chloroforme/méthanol, 95:5 en volume en observant 20 les taches par fluorescence à la lumière de 350 nm de longueur d'onde. On a déterminé la quantité du produit d'hydrolyse, la N-trifluoracétyladriamycine ( $R_f$  : 0,58) par comparaison avec un échantillon authentique dans un essai simultané. Les résultats obtenus sont les suivants :

25

Tableau I

% hydrolysé

		$R_f$	4°C	27°C
14-O-hémiglutarate	pH 7,40	0,26	0	1
	pH 9,00		< 0,5	3
14-O-hémiadipate de N-trifluor- acétyladriamycine	pH 7,40	0,31	0	0,5
	pH 8,00		0,3	1
	pH 9,00		0,5	

On trouvera dans le tableau ci-après les activités inhibitrices des composés selon l'invention et d'autres substances sur les cellules CCRF-CEM dans des essais *in vitro* effectués comme décrit ci-dessus.

5

Tableau II

	<u>Composé</u>	<u>DI<sub>50</sub>, micromoles</u>
	adriamycine	0,05
	14-valérate,	0,24
	hémidiglutarate,	0,28
10	hémiadipate,	0,31
	de la N-trifluoracétyladriamycine.	

- On trouvera dans le tableau ci-après l'activité anti-tumeur *in vivo* des composés du tableau I sur la leucémie murine P 388, évaluée comme décrit ci-dessus.
- 15 Tous les composés ont été administrés par voie intraperitoneale, l'adriamycine à l'état de formulation clinique (une partie d'adriamycine plus 5 parties de lactose dans du serum physiologique à 0,9%), les autres composés dans un milieu à 10% d'Emulphor EL-620, 10% d'éthanol et
- 20 80% de serum physiologique.

(voir tableau III page suivante)

Tableau III

Composé	mg/kg de poids corporel pour chaque dose	Jour moyen de décès (intervalle)	Durée de survie		
			ADV % +	Nombre de survivants le 30ème jour	le 60ème jour
témoins non traités	-	11,0 (10-14)		0/22	
adriamycine	1,0	20,0 (18-27),	81	0/7	
	2,0	21,0 (20-32)	90	2/7	1/7
	3,0	31,0 (23-36)	181	4/7	2/7
	4,0	18,0 ( 7-28)	63	0/7	
	5,0	9,0 ( 7-27)	-19	0/7	
14-valérate	20,0	42,0 (21-42)	281	5/7	3/7
	30,0	(21-26)		4/7	4/7
	40,0	(30,71)		6/7	6/7
	50,0	95,0 (24-95)	763	5/7	5/7
	60,0	90,0 ( 9-90)	718	5/7	5/7
14-hémigluta- rate	30,0	20,0 (20-35)	81	2/7	0/7
	40,0	23,0 (20-35)	109	2/7	1/7
	50,0	30,0 (20-42)	172	3/7	2/7
	60,0	(20,29)		5/7	4/7
	70,0	(25-36)		5/7	4/7
14-hémiadipa- te	40,0	(25)		6/7	6/7
	50,0	(23,45)		6/7	5/7
	60,0	(24,93)		6/7	6/7
	70,0	(61-77)		7/7	7/7

de N-trifluoroacétyladriamycine.

+ Augmentation % de la durée de survie  
comparativement aux témoins non traités.

Par ailleurs, des essais effectués avec le 14-hémiadipate de la N-trifluoracétyladriamycine ont mis en évidence une haute efficacité dans le prolongement de la durée de survie des souris souffrant de leucémie L 1.210, 5 comme le montrent les résultats rapportés dans le tableau ci-après. Tous les composés ont été administrés par voie intrapéritonéale ; dans les essais 1 et 2, les composés ont été administrés dans le milieu à 10% d'Emulphor EL-620, 10% d'éthanol et 80% de sérum isotonique. 10 Dans l'essai 3, le composé a été administré dans un tampon aqueux contenant du phosphate de potassium monobasique et de l'hydroxyde de sodium (0,05 M), pH 7,40 :

Tableau IV

15	Composé	Dose optimale mg/kg/j x 4 <sup>1)</sup>	Durée de survie moyenne, jours	ADV % <sup>2)</sup>	Nombre de survivants le 50ème jour
	témoins non traités		9,0		0/15 <sup>(3)</sup>
20	(1) 14-valérate	50,0		> 456	5/7
		60,0		> 456	6/7
25	(2) 14-hémiadipate de N-trifluor-acétyladriamycine	50,0		> 456	7/7
	(3) idem	60,0		> 456	6/7
		50,0		> 456	5/7
		60,0		> 456	7/7

- 1) Traitement intrapéritonéal une fois par jour les jours 1, 2, 3 et 4
- 2) Augmentation moyenne % de la durée de survie comparativement aux témoins non traités, calculée au 50ème jour
- 3) Tous les animaux meurent entre le jour 8 et le jour 11.

## REVENDICATIONS

1. Nouveaux dérivés de la N-trifluoracétyladriamycine caractérisés en ce qu'il s'agit du 14-O-hémiglutarate et du 14-O-hémiadipate de la N-trifluoracétyladriamycine.

5 2. Médicament présentant notamment une activité anti-tumeur sur les leucémies murine P 388 et murine L 1.210 des souris, caractérisé en ce qu'il comprend une quantité efficace d'un composé selon la revendication 1 et un véhicule non toxique acceptable pour l'usage pharmaceutique.

10 3. Médicament selon la revendication 2, caractérisé en ce que le véhicule est l'eau tamponnée à pH 7,2-7,5.

15 4. Procédé de préparation des composés selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on fait réagir le dérivé mono-iodé ou mono-bromé en position 14 de la N-trifluoracétyldaunomycine avec le sel monosodique de l'acide glutarique ou de l'acide adipique respectivement.

20 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la réaction est effectuée dans l'acétone au reflux, dans l'éthylène-glycol ou dans le diméthylformamide.