

1 ex → Cellule de Colloca
de l'ONSSON à Bondy

P.3
1987

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : 2 585 020
À utiliser que pour les commandes de reproduction
(21) N° d'enregistrement national : 85 10997
(51) Int Cl¹ : C 07 D 233/88; A 61 K 31/415.

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** A1

(22) Date de dépôt : 18 juillet 1985.
(30) Priorité :
(13) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 4 du 23 janvier 1987.
(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : RHÔNE-POULENC SANTE, société anonyme. — FR.
(72) Inventeur(s) : Alain Ahond, Pierre Laboute, Dominique Laurent, Pierre Potier, Christiane Poupat, Jacques Pusset Michèle Pusset et Odile Thoison.
(73) Titulaire(s) :
(74) Mandataire(s) : Rhône-Poulenc Recherches.

(54) Nouvelle substance biologiquement active, appelée girolline, extraite de l'éponge *Pseudaxinyssa cantharella*, son procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques qui la contiennent.
(57) Nouvelle substance biologiquement active, appelée girolline, extraite de l'éponge *Pseudaxinyssa cantharella* et son procédé de préparation.
La girolline présente des propriétés antitumorales remarquables.

FR 2 585 020 - A1

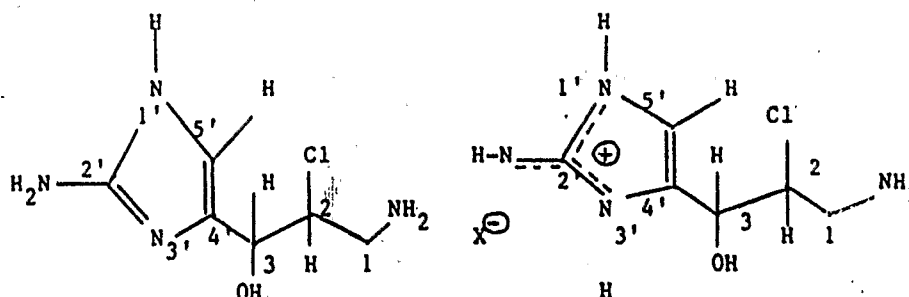
ORSTOM Fonds Documentaire
N° : 34 308, ex 1
Cote : B

La présente invention concerne une nouvelle substance biologiquement active, son procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques qui la contiennent.

La nouvelle substance, désignée sous le nom de girolline est extraite d'une éponge identifiée à *Pseudaxinyssa cantharella* dont les caractéristiques ont été décrites par C. Lévi, Bull. Mus. Natn. Hist. Nat. Paris, 4ème Série, 5, 719-722 (1983) et qui peut être pêchée dans le lagon de Nouméa (Nouvelle Calédonie).

La girolline se présente sous la forme d'une poudre blanche très hygroscopique.

La structure de la girolline, sous forme de base ou de sel, peut être présentée par la formule suivante :



dans laquelle X^{\ominus} représente un anion tel que l'anion chlorure (Cl^{-}).

La structure de la girolline est déterminée à partir de ses spectres de résonance magnétique nucléaire (1H , ^{13}C , ^{15}N) et de masse et des spectres de ses dérivés.

La structure de la chaîne hydrocarbonée est déterminée par les spectres de résonance magnétique nucléaire (1H et ^{13}C) de la girolline (400 et 100,1 MHz en solution dans D_2O avec, comme référence externe, le dioxane -TMS pour ^{13}C et D_2O à 4,83 ppm pour 1H) qui présentent les caractéristiques suivantes :

$-\overset{1}{C}(1)-H_2$ $\delta_C = 44,40$ ppm (t, J = 147 Hz)
 $\delta_H = 3,48$ ppm (dd, J = 13,7 et 9,4 Hz) et
 $3,64$ ppm (dd, J = 13,7 et 3,3 Hz)

- C (2)-H $\delta_c = 61,2$ ppm (dd, J = 154 et 4 Hz)
 $\delta_H = 4,62$ ppm (dt, J = 9,4 et 3,3 Hz)
 - C (3)-H $\delta_c = 67,3$ ppm (d, J = 146 Hz)
 $\delta_H = 5,19$ ppm (dd, J = 3,3 et 1 Hz)
 05 = C (5')-H $\delta_c = 113,25$ ppm (d, J = 202 Hz)
 $\delta_H = 6,80$ ppm (d, J = 1 Hz)
 = C (4') $\delta_c = 126,25$ ppm (d ép., J = 6 Hz)
 = C (2'') $\delta_c = 148,03$ ppm (d ép., J = 7 Hz)

10 Le spectre de résonance magnétique nucléaire de ^{15}N (40 MHz en solution dans D_2O) donne trois signaux à 47,6 ; 71,4 et 151,3 ppm.

Le spectre de masse de la girolline permet de confirmer la présence d'un atome de chlore lié au squelette :

- 15 D.C.I. (NH_3) \rightarrow 191 et 193 : présence d'un Cl(C)
 D.C.I. (ND_3) \rightarrow 198 : présence de 6H interchangeableables
 F.A.B. (Xe) \rightarrow 191 et dimère à 381.

Les dérivés ayant permis de confirmer la présence d'oxygène ont été préparés de la manière suivante :

1° Dérivés "adamantyles".

20 Une solution de 15 mg (0,08 m mole) de girolline dans 5 cm³ d'eau est amenée à pH de 8-9 par addition d'une solution de bicarbonate de sodium à 10 %. On ajoute alors, en 3 fois, 0,24 m mole de fluoroformiate d'adamantyle en solution dans le dioxanne (3 fois 0,3 cm³). Après 6 heures à une température voisine de 20-23°C,
 25 le mélange réactionnel est extrait à l'éther éthylique. Les extraits organiques sont purifiés par chromatographie sur couche épaisse (silice ; chlorure de méthylène/acétate d'éthyle 1-1 en volumes). On isole de cette manière deux produits :

30 a) un produit moins polaire (7,3 mg) dont les caractéristiques sont les suivantes :

R_f = 0,81

$[\alpha]_D = +12,6$ (C = 3,1 ; chloroforme)

spectre de masse : F.A.B. \rightarrow 725 et 727 (isotope Cl)

spectre de résonance magnétique nucléaire du proton

(200 MHz, en solution dans CDCl_3) :

adamantyle	$\delta_{\text{H}} = 1,70$ et $2,25$ ppm (2 m)
-C(1)-H ₂	$\delta_{\text{H}} = 3,48$ ppm (m)
-C(2)-H	$\delta_{\text{H}} = 4,47$ ppm (m)
-C(3)-H	$\delta_{\text{H}} = 5,67$ ppm (d, J = 6 Hz)
-C(5')-H	$\delta_{\text{H}} = 6,96$ ppm (s)
-N-H	$\delta_{\text{H}} = 5,30$ et $5,87$ ppm (m de 1H et 2H)

L'étude de ce spectre montre que le produit obtenu est trisubstitué.

b) un produit plus polaire (9mg) dont les caractéristiques sont les suivantes :

Rf = 0,27

spectre de masse : F.A.B. \rightarrow 547 et 549 (isotope Cl)

spectre de résonance magnétique nucléaire du proton (200 MHz, en solution dans CDCl_3) :

adamantyle	$\delta_{\text{H}} = 1,67$ et $2,18$ ppm (2m)
-C(1)-H ₂	$\delta_{\text{H}} = 3,40$ et $3,73$ ppm (2m)
-C(2)-H	$\delta_{\text{H}} = 4,37$ ppm (m)
-C(3)-H	$\delta_{\text{H}} = 4,77$ ppm (d, J = 2 Hz)
-C(5')-H	$\delta_{\text{H}} = 6,96$ ppm (s)
-N-H et -O-H	$\delta_{\text{H}} = 4,46$; $5,50$ et $5,90$ ppm (3m)

L'étude de ce spectre montre que le produit obtenu est disubstitué.

Entre les deux dérivés obtenus, il existe une différence $\Delta\delta_{\text{H}} = 1,10$ ppm pour -C(3)-H, ce qui permet de conclure à la présence d'un radical hydroxyle en -3.

2° Dérivés "acétylés"

Le dérivé "adamantyle" le plus polaire est acétylé de la manière suivante :

A 10 mg du produit le plus polaire (M \rightarrow 547-549) dans 0,6 cm³ de pyridine anhydre on ajoute 0,55 cm³ d'anhydride acétique. On agite pendant 2 heures à une température voisine de 20°C. Le mélange réactionnel est versé dans de l'eau glacée puis extrait par du chlorure de méthylène.

Après évaporation du solvant, le produit brut obtenu est purifié par chromatographie en couche épaisse (silice ; chlorure de méthylène/acétate d'éthyle : 1-1 en volumes). On isole ainsi deux produits :

05 a) dérivé di (O,N) acétylé dont les caractéristiques sont les suivantes :

Rf = 0,63

spectre de masse : i.c. → 631 et 633 (isotope Cl)

10 spectre de résonance magnétique nucléaire du proton (200 MHz, en solution dans CDCl_3) :

adamantyle $\delta_{\text{H}} = 1,65$ et $2,18$ ppm (2m)

-CO-CH₃ $\delta_{\text{H}} = 2,28$ et $2,47$ ppm (2s)

-C(1)-H₂ $\delta_{\text{H}} = 3,5$ ppm (m)

-C(2)-H $\delta_{\text{H}} = 4,55$ ppm (d ép., J = 6Hz)

15 -C(3)-H $\delta_{\text{H}} = 6,0$ ppm (d, J = 6Hz)

=C(5')-H $\delta_{\text{H}} = 7,10$ ppm (s)

-N-H $\delta_{\text{H}} = 5,20$ et $9,65$ ppm (m)

b) dérivé mono (O) acétylé dont les caractéristiques sont les suivantes :

20 Rf = 0,60

spectre de masse : i.c. → 589 et 591 (isotope Cl)

spectre de résonance magnétique nucléaire du proton (200 MHz, en solution dans CDCl_3) :

adamantyle $\delta_{\text{H}} = 1,60$ et $2,17$ ppm (2m)

25 CO-C-H₃ $\delta_{\text{H}} = 2,25$ ppm (s)

-C(1)-H₂ $\delta_{\text{H}} = 3,43$ ppm (m)

-C(2)-H $\delta_{\text{H}} = 4,47$ ppm (m)

-C(3)-H $\delta_{\text{H}} = 5,85$ ppm (d, J = 6 Hz)

= C(5')-H $\delta_{\text{H}} = 6,92$ ppm (s)

30 -N-H $\delta_{\text{H}} = 5,15$ et $5,77$ ppm.

Entre le dérivé monoacétylé et le dérivé diacétylé, il existe une différence $\Delta\delta_{\text{H}} = 1,08$ ppm pour le -C(3)-H, ce qui permet de confirmer la présence du radical hydroxyle en - 3.

3° Dérivé dinitrophénylé

35 a) dérivé bis(dinitro-2,4 phénylé) :

A 14 mg (0,07 mmole) de girolline, on ajoute 28 mg de

bicarbonate de sodium en solution dans 0,5 cm³ d'eau distillée. Après 30 minutes d'agitation à température ambiante, on ajoute une solution de 112 mg de dinitro-2,4 fluoro-1 benzène dans 2 cm³ d'éthanol.

05 On agite pendant 2 heures à une température voisine de 20°C. Après concentration à sec, le résidu est repris par 20 cm³ d'un mélange chlorure de méthylène/méthanol (8-2 en volumes). Après filtration sur verre fritté et évaporation à sec du filtrat, le résidu (102 mg) est purifié par flash-chromatographie (silice Merck
10 7734 ; hauteur de la colonne 150 mm ; diamètre : 20 mm ; pression 0,3 bar ; éluant : chlorure de méthylène/méthanol 8-2 en volumes).

On obtient ainsi le dérivé "bis (dinitro-2,4 phénylé)" (15 mg) dont les caractéristiques sont les suivantes :

Rf = 0,23

15 $[\alpha]_D = 0$ (méthanol)

spectre de masse : F.A.B. \rightarrow 523 et 525 (isotope Cl)

spectre de résonance magnétique nucléaire du proton (400

MHz, en solution dans CD₄O) :

20 -C(1)-H : $\delta_H = 3,86$ ppm (dd, J = 15 et 7 Hz)
 -C(1)-H : $\delta_H = 4,0$ ppm (dd, J = 15 et 5 Hz)
 -C(2)-H : $\delta_H = 4,55$ ppm (m)
 -C(3)-H : $\delta_H = 4,80$ ppm (d, J = 5 Hz)
 -C(5')-H : $\delta_H = 6,83$ ppm (s)

Les protons des noyaux phényles sont notés "ou"

25 -C(6'')-H $\delta_H = 7,23$ ppm (d, J = 9 Hz)
 -C(6'')-H $\delta_H = 7,97$ ppm (d, J = 9 Hz)
 -C(5''')-H $\delta_H = 8,35$ ppm (dd, J = 9 et 3 Hz)
 -C(5''')-H $\delta_H = 8,70$ ppm (dd, J = 9 et 2,5 Hz)
 -C(3''')-H $\delta_H = 8,98$ ppm (d, J = 3 Hz)
 30 -C(3''')-H $\delta_H = 9,08$ ppm (d, J = 2,5 Hz)

b) dérivé "bis(dinitro-2,4 phénylé)" acétylé

9 mg du produit "diphénylé" sont dissous dans 2 cm³ d'anhydride acétique et 2 cm³ de pyridine anhydre.

35 On agite pendant 4 jours à une température voisine de 20°C.

Après évaporation à sec, le résidu est chromatographié sur plaque de silice (Merck 60 F254 ; chlorure de méthylène/méthanol 95-5 en volumes). On isole un composé (8 mg) dont les caractéristiques sont les suivantes :

05 Rf = 0,60

spectre de résonance magnétique nucléaire du proton (200 MHz, en solution dans CD₄O)

CO-C-H₃ δ_H = 1,90 et 2,16 ppm (2s)

-C(3)-H δ_H = 6,14 ppm (d, J = 7,5 Hz)

10 -C(5')-H δ_H = 7,56 ppm (s)

Entre les dérivés "bis(dinitro-2,4 phénylés)" acétylé et non acétylé, il existe une différence Δδ_H = 1,34 ppm, ce qui confirme la présence d'un radical hydroxyle en -3.

15 Selon l'invention, la girolline est obtenue à partir d'extraits d'animaux congelés, broyés et lyophilisés solubles dans l'éthanol et le méthanol. Les extraits sont purifiés par chromatographies successives sur des supports appropriés en éluant avec des solvants ou des mélanges de solvants convenables.

20 La girolline selon l'invention peut se présenter également sous forme de sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques tel que l'acide chlorhydrique.

La girolline selon l'invention présente des propriétés antitumorales remarquables.

25 In vitro, elle s'est montrée active sur les cellules leucémiques P 388 à des concentrations comprises entre 0,001 et 1 µg/cm³.

L'activité in vitro a été confirmée in vivo chez la souris greffée avec des cellules leucémiques P 388 à des doses voisines de 1 mg/kg par voie intra-péritonéale.

30 La présente invention concerne également les compositions pharmaceutiques qui contiennent la girolline en association avec tout autre produit pharmaceutiquement acceptable, qu'il soit inerte ou physiologiquement actif.

35 Ces compositions peuvent être présentées sous toute forme appropriée à la voie d'administration prévue. La voie parentérale

est la voie d'administration préférentielle et notamment la voie intraveineuse.

Les compositions selon l'invention pour administration parentérale peuvent être des solutions stériles aqueuses ou non aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule, on peut employer le propylèneglycol, les huiles végétales, en particulier l'huile d'olive, et les esters organiques injectables, par exemple l'oléate d'éthyle. Ces compositions peuvent également comprendre des adjuvants en particulier des agents mouillants, émulsifiants et dispersants. La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple à l'aide d'un filtre bactériologique, en incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation ou par chauffage. Elles peuvent également être préparées sous forme de compositions solides stériles qui peuvent être dissoutes ou dispersées au moment de l'emploi dans de l'eau stérile ou tout autre milieu stérile injectable.

La girolline est particulièrement utile dans le traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides à des doses journalières généralement comprises entre 0,1 et 1 mg/kg par voie intraveineuse pour un adulte.

Les exemples suivants, donnés à titre non limitatif, montrent comment l'invention peut être mise en pratique.

EXEMPLE 1

25 25 kg d'éponges *Pseudaxinyssa cantharella* congelées sont broyées et lyophilisées. On obtient ainsi 5 kg d'extrait brut contenant 45 % de chlorure de sodium qui est extrait par 3 fois 6,5 litres d'éthanol. La phase éthanolique est concentrée à sec. On obtient ainsi 1 kg d'un produit qui est repris par 6 litres de méthanol. La fraction soluble dans le méthanol, après évaporation du solvant, est reprise par 10 litres d'eau. Le résidu sec, issu de la phase aqueuse est repris par 4 litres de méthanol. Après distillation du solvant, on obtient 477 g d'un extrait pâteux qui est adsorbé sur 439 g de silice.

On chromatographie 365 g de l'extrait adsorbé sur silice sur une colonne de 8 cm de diamètre contenant 800 g de gel de silice (60 Merck Type 7734) en éluant avec un mélange initial acétate d'éthyle-méthyléthylcétone-acide formique-eau (5-3-0,5-0,5 en volumes) dans lequel on fait croître les proportions d'acide formique et d'eau et en recueillant des fractions de 400 cm³. Chaque fraction est contrôlée par chromatographie en couche mince, les plaques étant révélées par pulvérisation d'eau de Javel puis, après séchage, par pulvérisation d'une solution saturée d'o-tolidine dans l'eau acidifiée par 2 % d'acide acétique. On recueille 70 fractions qui sont regroupées en 16 lots. Les huit premiers lots ne contiennent que des produits moins polaires que la girolline. Le dixième lot (25,1 g) correspondant aux fractions éluées par le mélange acétate d'éthyle-méthyléthylcétone-acide formique-eau (5-5-2-2 en volumes) est le plus riche en girolline.

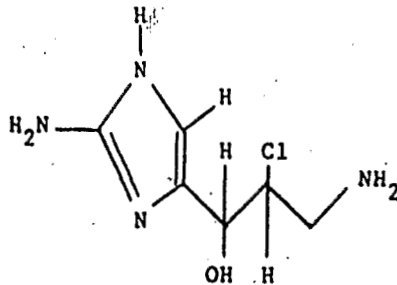
On filtre la girolline brute ainsi obtenue sur une colonne de 5 cm de diamètre contenant 800 g de gel de Sephadex LH 20 en éluant avec du méthanol. On obtient ainsi 5,05 g de girolline pure, avec un rendement de 0,5 g par kg d'organisme congelé.

EXEMPLE 2

On prépare une solution contenant 16 mg/cm³ de girolline en dissolvant 1,6 g de ce produit dans du soluté physiologique apyrogène en quantité suffisante pour obtenir 100 cm³. La solution obtenue est répartie aseptiquement en ampoules à raison de 5 cm³ par ampoule. Les ampoules sont scellées ; elles contiennent chacune 80 mg de girolline.

REVENDEICATIONS

1 - Nouvelle substance biologiquement active, désignée sous le nom de girolline, extraite de l'éponge identifiée à Pseudaxinyssa cantharella, caractérisée en ce qu'elle se présente sous
05 forme d'une poudre blanche très hygroscopique et qu'elle répond à la formule :



ainsi que ses sels d'addition avec les acides.

2 - Procédé de préparation de la girolline caractérisé en
10 ce que l'on purifie par chromatographies successives sur des supports appropriés des extraits solubles dans l'éthanol et le méthanol d'éponge Pseudaxinyssa cantharella congelée, broyée et lyophilisée, et isole le produit obtenu éventuellement sous forme
15 d'un sel d'addition avec un acide.

3 - Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle
contient la girolline en association avec un ou plusieurs produits
pharmaceutiquement acceptables inertes ou physiologiquement actifs.