

CYTOTOXICITE D'ALCALOIDES INDOLIQUES ASPIDOSPERMANE A CHAINE TRYPTAMINE MODIFIEE

GUY LEWIN,*

Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, boulevard Becquerel,
Hérouville Saint-Clair, 14032 Caen Cedex, France

GHANEM ATASSI, ALAIN PIERRÉ, YVES ROLLAND, CORINNE SCHAEFFER,

Institut de Recherches Servier, 11 rue des Moulineaux, 92150 Suresnes, France

and JACQUES POISSON

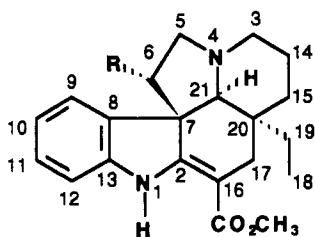
Laboratoire de Chimie des Substances Thérapeutiques Naturelles, Centre d'Etudes Pharmaceutiques, Châtenay-
Malabry 92296 Cedex, France

ABSTRACT.—Eight synthetic indole alkaloids with the aspidospermane structure have been evaluated for cytotoxicity in the L-1210 cell culture test system. Two of them (compounds **9** and **5**), bearing a modified tryptamine chain, were significantly active (IC₅₀ values of 0.7 and 3.1 μM, respectively).

La vincadifformine [**1**], alcaloïde de nombreuses Apocynacées, a été largement étudiée sur le plan chimique en raison notamment de son intérêt dans l'hémisynthèse biomimétique de la vincamine (1,2). Parmi les dérivés de la vincadifformine facilement accessibles, deux composés, la 16-chloro-1-déhydrovincadifformine [**2**] (**3**) et son dérivé de réduction (NaBH₃CN/AcOH) à cycle aziridine **4** (**4**), présentent sur C-16 un centre électrophile potentiel.

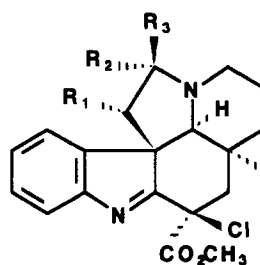
Dans une étude récente sur la fonctionnalisation de la chaîne tryptamine de **1** (**5**), nous avons décrit la synthèse de la 6-bromovincadifformine [**8**] à partir

de **2** via les intermédiaires isolés **3** et **5-7**. L'obtention de molécules à deux centres électrophiles (l'un en C-16 et l'autre en C-5 ou C-6) potentiellement bis-alkylantes nous a donc conduits à rechercher la cytotoxicité in vitro de tels composés par comparaison aux modèles **2-4** à chaîne tryptamine intacte. En plus des composés **2**, **3**, et **5** précédemment décrits (2,5,6), nous avons synthétisé la 6-bromo-16-chloro-1-déhydrovincadifformine [**9**] par action de l'hypochlorite de *tert* butyle sur **8** puis son N-4 oxyde [**10**]. La réduction du mélange d'épimères **6** et **7** (NaBH₃CN/CF₃COOH) conduit au dérivé dihydro-indole **11**. Ce composé

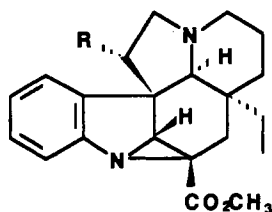


Numérotation biogénétique (7)

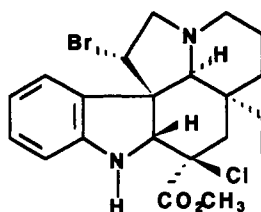
1 R=H
8 R=Br



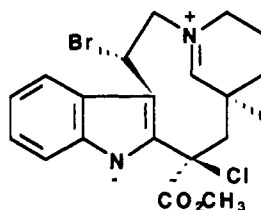
2 R₁=R₂=R₃=H
3 R₁=R₂=R₃=H; N-4 oxyde
5 R₁=R₃=H; R₂=OCH₃
6 R₁=Br; R₂=CN; R₃=H
7 R₁=Br; R₂=H; R₃=CN
9 R₁=Br; R₂=R₃=H
10 R₁=Br; R₂=R₃=H; N-4 oxyde



4 R=H
12 R=Br



11



13

se transforme partiellement lors de la purification chromatographique du milieu réactionnel en l'aziridine **12**. Le mélange (4/1) de ces deux composés **11** et **12** peut aussi être obtenu par réduction de **9** ($\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{AcOH}$) selon la méthode de Hugel et Lévy (4).

La cytotoxicité des composés **2-5** et **9-12** a été évaluée *in vitro* vis-à-vis de cultures de cellules L-1210 (voir Tableau 1). En série 16-chloro-indoléline, alors que le composé de référence **2** ne présente qu'une faible activité ($\text{IC}_{50} = 25,4 \mu\text{M}$), les analogues **5** et **9** manifestent une cytotoxicité plus importante (IC_{50} respectivement de 3,1 et 0,7 μM). De plus l'oxydation de l'azote N-4 conduit dans les deux exemples étudiés (composés **3** et **10**) à des produits inactifs. La forte cytotoxicité observée pour **9** pourrait

s'expliquer par la formation possible d'un intermédiaire ouvert **13**¹ présentant alors sur C-6 et C-16 deux centres électrophiles potentiels. Cette hypothèse ne peut être retenue dans le cas du N-oxyde **10**, très faiblement cytotoxique, le doublet de N-4 n'étant plus disponible. Malheureusement la poursuite de l'étude des deux dérivés les plus actifs **5** et **9** n'a pas montré de blocage spécifique du cycle cellulaire pour des concentrations de 0,5 à 25 μM . En série aziridine aucune cytotoxicité n'a été constatée, ni avec le produit de référence **4**, ni avec son analogue bromé **12**, ni enfin avec le précurseur de ce dernier **11**.

TABLEAU 1. Cytotoxicité des Composés 2-4 et 9-12.

Composé	IC_{50} (μM) ^a
2	25,4
3	27,4
4	155,7
5	3,1
9	0,7
10	14,1
11	46,8
12	141,4
Doxorubicine	0,030

^a IC_{50} , dose inhibant de 50% la prolifération des cellules L-1210 mesurée après 48 h d'exposition.

¹La formation d'un tel intermédiaire iminium-indole a toujours été postulée pour expliquer la réactivité des 16-chloro-indolélines en milieu protique.

PARTIE EXPERIMENTALE

GENERALITES.—Les spectres uv ont été enregistrés sur un appareil Unicam SP 1800, les spectres ir sur un appareil Perkin-Elmer 457 et les pouvoirs rotatoires sur un polarimètre Schmidt-Haensch. Les spectres de masse ont été déterminés sur des appareils Nermag R10-10C (smie et smic) et Finnigan-MAT 90 Q (smiehr). Les spectres de rnm ¹H ont été enregistrés dans CDCl_3 sur un appareil Bruker AM 400 (400 MHz).

OBTENTION DE **9** PAR ACTION DE *tert*-BuOCl SUR **8**.—A 0,084 g (0,2 mM) de **8** dans CH_2Cl_2 (10 ml) placé dans un bain de glace sont ajoutés 0,035 ml de triéthylamine puis 0,63 ml d'une solution d'hypochlorite de *tert*-butyle à 6,25% (v/v) dans CH_2Cl_2 . Après 0,5 h d'agitation dans le bain de

glace, le milieu réactionnel est lavé à l'eau glacée et fournit après traitement classique un résidu sec de 0,096 g. Après filtration sur silice (CH_2Cl_2) et cristallisation dans Et_2O , **9** (0,085 g, 94%) est obtenu. F 162–164° (Et_2O); $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -98,5^\circ$ ($c=0,9$, CHCl_3); $\text{uv } \lambda \text{ max (log } \epsilon) \text{ EtOH } 231 (4,22), 292 (3,84) \text{ nm}$; $\text{ir } \nu \text{ max (film) } 1730 \text{ cm}^{-1}$; $\text{rmn } ^1\text{H } \delta$ (signaux caractéristiques) 2,75 (1H, s, H-21), 2,90 et 3,25 (2H, 2d, $J=15$ Hz, H-17), 4,00 (3H, s, CO_2CH_3), 5,55 (1H, dd, $J=5, 6$, et 12 Hz, H-6), 7,35–7,60 (4H, m, aromatiques); $\text{smic } [\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 451–453–455 (85–100–24); analyse pour $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ClBrN}_2\text{O}_2$ calcd % C 55,83, H 5,35, N 6,20; tr. % C 55,61, H 5,29, N 6,31.

OBTENTION DE **10** PAR OXYDATION DE **9** PAR L'ACIDE *m*-CHLOROPERBENZOÏQUE.—0,014 g (0,03 mM) de **9** sont dissous dans (CH_2Cl_2) (10 ml) et additionnés d'acide *m*-chloroperbenzoïque (0,035 mM). Après 15 h à température ambiante, le milieu est lavé par une solution aqueuse à 5% de NaHCO_3 et fournit par traitement classique un résidu sec quantitatif purifié par ccm (silice, CH_2Cl_2 -MeOH, 92:8) pour donner 0,010 g du composé **10** pur (50%); **10**: Amorphe; $\text{uv } \lambda \text{ max (EtOH) } 232, 296 \text{ nm}$; $\text{smie } m/z$ 466–468–470 $[\text{M}]^+$ (3–4–1), 124 (100).

OBTENTION DE **11** ET **12** PAR RÉDUCTION DU MÉLANGE D'ÉPIMÈRES **6** ET **7** PAR NaBH_3CN .—A 0,144 g (0,3 mM) du mélange d'épimères **6** et **7** (5) en solution dans CF_3COOH (15 ml) NaBH_3CN (0,150 g) est ajouté prudemment par portions. Après 3 h à 25° le milieu est dilué à l'eau glacée, alcalinisé à pH 9 par NaOH 2 N puis extrait par CH_2Cl_2 fournissant un résidu sec de 0,135 g. Une partie de ce résidu (0,035 g) est purifiée par ccm (silice, CH_2Cl_2 -cyclohexane, 2:1) et fournit le composé **11** pur (0,016 g, 45%). L'autre partie (0,100 g), purifiée par chromatographie éclair (silice, cyclohexane-AcOEt, 9:1, dépôt par voie sèche), ne fournit que 0,018 g de **11**. Par élution avec CH_2Cl_2 -MeOH (95:5) on isole dans un second temps 0,030 g de **12** pur. Ce composé **12** détecté en ccm à l'état de traces dans le résidu sec initial s'est donc très vraisemblablement formé à partir de **11** au cours de la purification sur colonne; **11**: Amorphe; $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +34,2^\circ$ ($c=1$, CHCl_3); $\text{uv } \lambda \text{ max (log } \epsilon) \text{ EtOH } 240 (3,72), 298 (3,43) \text{ nm}$; $\text{ir } \nu \text{ max (film) } 3360, 1740 \text{ cm}^{-1}$; $\text{rmn } ^1\text{H } \delta$ ppm (signaux caractéristiques) 2,10 (1H, s, H-21), 3,80 (3H, s, CO_2CH_3), 4,30 (2H, 2d, $J=4,0$ Hz, H-1 et H-2), 4,60 (1H, dd,

$J=6,7$ et 10,5 Hz, H-6), 6,55–7,10 (4H, m, aromatiques); $\text{smiehr } m/z$ pour $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{ClBrN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}]^+$ calcd 452,0865, mes. 452,0858; **12**: Amorphe; $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -91^\circ$ ($c=0,9$, CHCl_3); $\text{uv } \lambda \text{ max (log } \epsilon) \text{ EtOH } 216 (4,16), 236 \text{ ép. } (3,95), 274 (3,28), 282 (3,16) \text{ nm}$; $\text{ir } \nu \text{ max (film) } 1730 \text{ cm}^{-1}$; $\text{rmn } ^1\text{H } \delta$ ppm (signaux caractéristiques) 0,25 et 2,30 (2H, 2d, $J=15,0$ Hz, H-17), 2,70 (1H, s, H-21), 3,45 (1H, s, H-2), 3,80 (3H, s, CO_2CH_3), 4,50 (1H, dd, $J=7,4$ et 11,1 Hz, H-6), 7,20 (4H, m, aromatiques); $\text{smic } [\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 417–419; $\text{smiehr } m/z$ pour $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}-\text{Br}]^+$ calcd 337, 1915, mes. 337,1908.

ESSAIS DE CYTOTOXICITE.—Les composés étudiés sont solubilisés extemporanément dans le DMSO (concentration finale maximale=0,5%). Les cellules L-1210 sont cultivés dans un milieu RPMI 1640 additionné de 10% de sérum de veau foétal (Gibco), 2 mM de L-glutamine, 100 unités/ml de pénicilline, 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine et 10 mM de tampon HEPES (pH=7,4). La viabilité cellulaire est mesurée selon la méthode MTT (microculture tetrazolium test) (8). Les cellules sont en contact avec les composés étudiés pendant 48 h et les expériences effectuées deux fois.

REMERCIEMENTS

Les spectres de masse et de rmn ont été enregistrés dans le service de M. Jean-Paul Volland, IdR Servier, que nous remercions.

LITTÉRATURE CITÉE

1. E. Wenkert et B. Wickberg, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1580 (1965).
2. G. Hugel, J. Lévy, et J. Le Men, *C.R. Acad. Sc. Paris*, **274**, 1350 (1972).
3. C. Pierron, J. Garnier, J. Lévy, et J. Le Men, *Tetrahedron Lett.*, 1007 (1971).
4. G. Hugel et J. Lévy, *J. Org. Chem.*, **49**, 3275 (1984).
5. G. Lewin et J. Poisson, *Tetrahedron Lett.*, **35**, 8153 (1994).
6. G. Lewin, J. Poisson, C. Schaeffer, et J.P. Volland, *Tetrahedron*, **46**, 7775 (1990).
7. J. Le Men et W.I. Taylor, *Experientia*, **21**, 508 (1965).
8. M.C. Alley, D.A. Scuderio, A. Monks, M.L. Hursey, M.J. Czerwinski, D.L. Fine, B.J. Abbott, J.G. Mayo, R.H. Shoemaker, et M.R. Boyd, *Cancer Res.*, **48**, 589 (1988).

Received 28 November 1994