



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 0714669-8 A2**

(22) Data de Depósito: 12/07/2007
(43) Data da Publicação: 24/04/2013
(RPI 2207)



(51) *Int.Cl.:*
C07D 491/20
A61K 31/4745
A61P 35/00

(54) **Título:** DERIVADOS DE CAMPTOTECINA COM ATIVIDADE ANTITUMOR

(30) **Prioridade Unionista:** 26/07/2006 IT MI2006A001475

(73) **Titular(es):** Indena S.P.A.

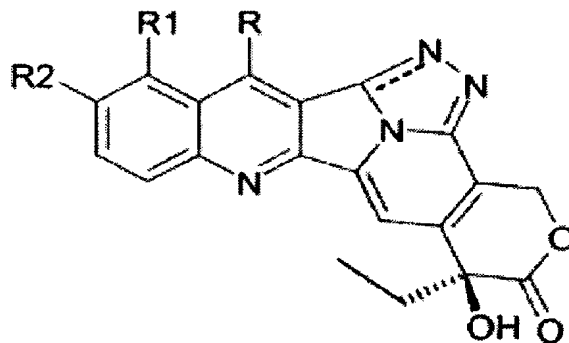
(72) **Inventor(es):** Arturo Battaglia, Carlo Manzotti, Cristian Samori, Ezio Bombardelli, Gabriele Fontana

(74) **Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2007006218 de 12/07/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/011992de 31/01/2008

(57) **Resumo:** DERIVADOS DE CAMPTOTECINA COM A ATIVIDADE ANTITUMOR. A presente invenção refere-se a derivados de camptotecina da fórmula (1) possuindo atividade antitumor, processo para preparação dos mesmos, uso dos mesmos como fármacos antitumor e composições farmacêuticas contendo os mesmos.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**DERIVADOS DE CAMPTOTECINA COM ATIVIDADE ANTITUMOR**".

A presente invenção refere-se aos novos derivados de camptotecina possuindo atividade antitumor, aos processos para preparação dos mesmos, ao em emprego como fármacos antitumor e às composições farmacêuticas contendo os mesmos.

Fundamentos da Invenção

A camptotecina é um alcalóide extraído da *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) descrita primeiramente por Wall e Wani em 1966 (J. Am. Chem. Soc. 1966, 88, 3888-3890). A camptotecina, embora possua atividade antitumor de amplo espectro, especialmente contra tumor do cólon e outros tumores sólidos e leucemias, não sendo empregada na terapia devido a sua alta toxicidade, que é especificamente manifestada na forma de cistite hemorrágica, toxicidade gastrointestinal e mielossupressão.

Vários análogos da camptotecina foram sintetizados, a fim de obter compostos possuindo baixa toxicidade e alta solubilidade. No presente, dois fármacos são empregados na prática clínica, a saber, CPT-11 e topotecano. Outros derivados, tais como, belotecano, rubitecano, exatecano, gimitecano, pegamotecano, lurtotecano, carenitecina, afeletecano, homocamptotecina, diflomotecano e muitos outros estão passando por experimentação clínica. O composto CPT-11 é um profármaco amplamente usado para 10-hidróxi-7-etilcamptotecina (geralmente conhecida como SN-38), aprovada para o tratamento de muitos tumores sólidos e ascites (linfoma colo retal, de pele, estômago, pulmão, cérvix, ovário e não-Hodgkin).

O topotecano é um composto solúvel na solução fisiológica, ativo contra tumores do pulmão, estômago, fígado, ovário, mama, próstata, esôfago, reto, sarcomas de tecidos moles, pescoço e cabeça, glioblastoma, leucemias mielocíticas crônicas e agudas. O topotecano mostra, contudo, efeitos colaterais importantes, tais como, neutropenia e trombocitopenia.

O Lurtotecano é um derivado mais solúvel, possuindo atividade nos tumores do pescoço, ovário, mama, colo-retal e microcitoma pulmonar. Contudo, o Lurtotecano também possui toxicidade hemática.

O rubitecano é um profármaco para uso oral, eficaz contra tumores do pâncreas, ovário e mama.

A camptotecina e seus análogos, sendo o caso com os inibidores da topoisomerase I, são eficazes contra tumores resistentes aos fármacos convencionais, incluindo inibidores de topoisomerase II; mantêm altos níveis de topoisomerase durante todo o ciclo celular; não induzem resistência a múltiplos fármacos (P-gp ou MRP) ou metabolismo desintoxicante mediado pela enzima.

As pesquisas estão focadas agora nos novos inibidores de topoisomerase I possuindo toxicidade inferior aquela dos fármacos usados presentemente.

Os derivados de camptotecina de anel aberto mostram alta ligação de proteína (especificamente com albumina) e baixa distribuição nos tecidos tumorais. Como uma consequência, o produto se acumula no corpo e os tumores são fracamente afetados.

De forma diferente, a alta lipofilicidade da forma lactona promove a adesão dos derivados de camptotecina às membranas celulares, especificamente eritrócitos, afetando a taxa de distribuição de tecido/plasma. Por essa razão, a pesquisa está focada em duas abordagens alternativas: a) projeto de produtos de ligação e proteína baixa ainda possuindo boa solubilidade; b) projeto de produtos altamente potentes possuindo efeito terapêutico mesmo em doses extremamente baixas.

Modificações nas posições 7-, 9-, 10- e 11- geralmente obtiveram boa tolerabilidade, enquanto não afetando a estabilidade do complexo ternário de DNA-topoisomerase I-camptotecina, a formação do mesmo sendo responsável pela atividade antitumor dos compostos.

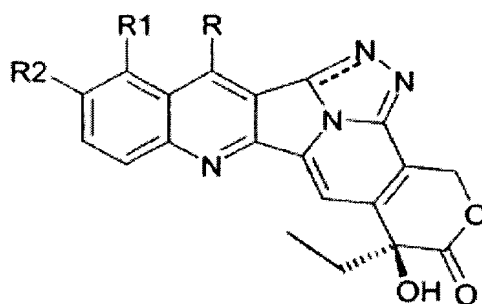
Os produtos com configuração 20R provaram ser inativos ou muito menos ativos que os produtos com configuração 20S, o que coincide com a configuração natural.

Como uma regra, as modificações na posição 5 são consideradas desfavoráveis para a formação do complexo ternário, considerando-se que as modificações nos anéis D e E da piridona foram reportadas como

sendo prejudiciais à atividade do produto.

Descrição da Invenção

Em um primeiro aspecto, a invenção se refere aos derivados de camptotecina da fórmula geral I:



(I)

5 em que:

R é alquila, aminoalquila, hidroxialquila, nitrila, alcoximino, ariloximino, sililalquila;

R1 é hidrogênio, hidróxi, alcóxi, aminoalquila;

10 R2 é hidrogênio, hidróxi, alcóxi, aminoalquila, hidroxila opcionalmente protegida;

em que os grupos alquila, alcóxi, aminoalquila ou alcoximino podem conter 1 a 8, preferivelmente 1 a 4 átomos de carbono em uma cadeia linear ou ramificada, considerando-se que o grupo ariloximino pode conter 5 a 10 átomos de carbono;

15 os sais farmacologicamente aceitáveis, isômeros, enantiômeros, diastereômeros dos mesmos e misturas correspondentes.

Os compostos da invenção mostram ligação de proteína baixa e possuem boa solubilidade e potência alta mesmo em doses muito baixas.

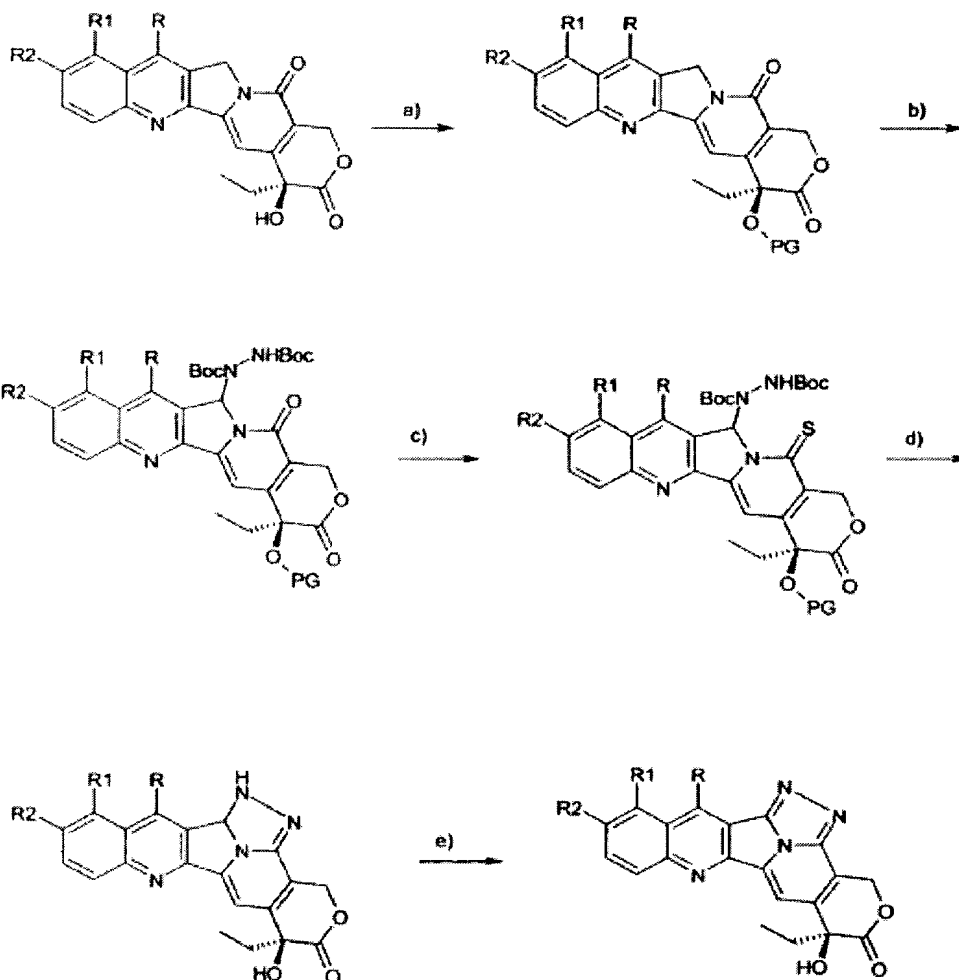
20 A via sintética preferida para a preparação dos compostos da invenção é ilustrada no esquema que se segue e envolve substancialmente as seguintes etapas:

a) proteção dos grupos hidróxi precursores;

b) derivatização em 5 com hidrazina N,N-di protegida;

c) conversão opcional do anel piridiona no anel tiopiridona

- d) remoção dos grupos protetores com ciclização concomitante,
e) aromatização opcional do anel pirazole



No esquema, R, R1 e R2 possuem os significados descritos acima e PG é um grupo de proteção hidróxi.

5

As hidroxilas são preferivelmente protegidas por meio de grupos acila facilmente cliváveis, preferivelmente tricloroacetato e Troc ou grupos silila, preferivelmente trietilssilila.

10

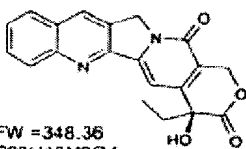
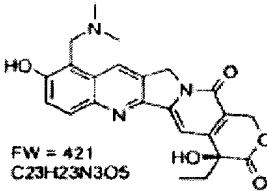
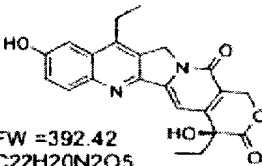
A derivatização em 5- com hidrazida protegida pode ser obtida por tratamento do precursor com uma base orgânica forte, tal como, LiHMDS e reação do carbânion resultante com um aza dicarboxilato, tal como, di-t-butóxi aza dicarboxilato ou dibenzoilóxi aza dicarboxilato. A conversão do anel de piridona em anel tiopiridina pode ser obtida por reação com dissulfeto de 2,4-bis(4-metoxifenil)-1,2,3,4-ditiofosfetano-2,4 (geralmente conhecido

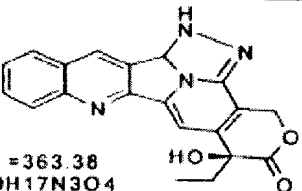
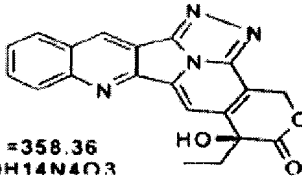
como reagente de Lawesson) (Cava P.M. e outros, Tetrahedron 1985, 41, 5061; Cherkasov RA e outros, Tetrahedron 1985, 41, 2567; Ghattas AAG e outros, Sulfur Lett. 1982, 1, 69; Yde B e outros, Tetrahedron 1984, 40. 2047) ou com um reagente equivalente. O reagente de Lawesson é o preferido.

5 A finalidade da conversão opcional na tiopiridona é promover o fechamento do anel, uma vez que a hidrazina tenha sido desprotegida. Contudo, foi observado que a dita reação de fechamento é espontânea e imediata, mesmo sem ativação da piridina carbonila, por exemplo, como tiocarbonila.

10 Quando os grupos de proteção hidróxi são sililas e aquelas no nitrogênio são carbamatos, eles são geralmente removidos com ácido trifluoracético. Em um procedimento alternativo, as etapas b) e c) podem ser revertidas.

15 Os compostos da invenção foram testados em um ensaio de citotoxicidade em um amplo espectro de células tumorais. Por meio de exemplo, os dados de citotoxicidade na linhagem de célula NCI-H460 (câncer NSCL) se referindo aos dois compostos da fórmula (I) são reportados, usando camptotecina e os fármacos Topotecano e SN-38 como referências:

Nome	fórmula	NCI-H460 IC50 (µg/mL) contagem celular
captotecina	 <p>FW = 348,36 C₂₀H₁₆N₂O₄</p>	0,115 ± 0,0174
topotecano	 <p>FW = 421 C₂₃H₂₃N₃O₅</p>	0,63 ± 0,44
SN38	 <p>FW = 392,42 C₂₂H₂₀N₂O₅</p>	0,0865 ± 0,0049

Nome	Fórmula	NCI-H460 IC50 (µg/mL) contagem celular
IDN 6132	 <p>FW = 363.38 C₂₀H₁₇N₃O₄</p>	17 ± 4,25
IDN 6137	 <p>FW = 358.36 C₂₀H₁₄N₄O₃</p>	3,8 ± 1,08

Os compostos mais ativos foram avaliados em um ensaio de clivagem de DNA medindo a concentração ativa e persistência da lesão (vide a seção "Exemplos"). Os derivados da fórmula (I) mostram persistência surpreendentemente maior no bloqueio da replicação do DNA em relação ao padrão de referência (especificamente topotecano e camptotecina), enquanto mantendo uma atividade citotóxica eficaz.

Em um aspecto adicional, a invenção se refere às composições farmacêuticas contendo um composto da fórmula (I) em conjunto com veículos e excipientes farmacêuticamente aceitáveis. As formas farmacêuticas apropriadas para a administração oral ou parenteral dos compostos (I) podem ser sólidas, preferivelmente cápsulas, comprimidos e grânulos ou líquida, preferivelmente soluções injetáveis ou infusões.

Os compostos adequadamente formulados da invenção podem ser empregados para tratamento dos tumores sólidos e leucemias, especificamente nos tumores do pulmão, ovário, mama, estômago, fígado, próstata, sarcomas de tecido mole, cabeça e pescoço, esôfago, pâncreas, cólon, reto, glioblastoma, leucemias mielocíticas crônicas e agudas.

Exemplos

Exemplo 1 – 20-OTES-camptotecina

Camptotecina (0,100 g, 0,278 mmol) foi suspensa em dimetilformamida anidra (3 mL), sob atmosfera inerte, e a suspensão resultante é

adicionada com imidazole (0,980 g, 1,44 mmol). A mistura é agitada por 10 minutos, subsequentemente cloreto de trietilssilila (TES-Cl) (0,193 mL, 1,15 mmol) é gotejado, seguido por adição de 4-dimetilamino piridina (DMAP) (0,040 g, 0,287 mmol). Após 46 horas, a mistura de reação é evaporada sob vácuo, (controle de TLC do desaparecimento completo do reagente, eluente CH₂Cl₂/MeOH = 30/1). O sólido é subsequentemente removido em CH₂Cl₂ e lavado com H₂O e NH₄Cl saturado. A fase aquosa é extraída com CH₂Cl₂ (2 x 10 mL). As fases orgânicas são combinadas e secas sobre Na₂SO₄, filtradas e concentradas sob vácuo, pelo que, obtendo o produto desejado (0,133 g, 0,287 mmol) como um sólido amarelo pálido.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.37 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.25 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.92 (d, 1 H, *J* = 8.0 Hz, Ar), 7.82 (t, 1 H, *J* = 8.0 Hz, Ar), 7.65 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.57 (s, 1 H, H-14), 5.67 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz, H-17), 5.29 (s, 2 H, H-5), 5.25 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz, H-17), 2.00-1.84 (m, 2 H, H-19), 1.03-0.93 (m, 12 H), 0.80-0.71 (m, 6 H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 171.7, 157.6, 152.5, 151.5, 149.0, 145.9, 130.9, 130.4, 130.0, 128.4, 128.1, 128.0, 127.9, 118.9, 94.4, 75.3, 66.0, 50.0, 33.2, 7.9, 7.2, 6.4.

Exemplo II – Preparação de 5-di-*t*-butoxicarbonilidrazino-20-OTES-camptotecina

Camptotecina 20-OTES (0,100 g, 0,216 mmol) é dissolvida em THF anidro (6 mL) com agitação sob atmosfera inerte, então resfriada a uma temperatura de -78°C e uma solução de LiHMDS a 1,0M em THF (0,281 mL, 0,281 mmol) é gotejada. Após 20 minutos, di-*t*-butilazo dicaboxilato (DTBAC) (0,075 g, 0,324 mmol) em THF anidro (2 mL) é adicionado. Após 4 horas a -78°C, o desaparecimento do reagente é monitorado por TLC (Hexano/AcOEt = 3/1). A formação de dois diastereômeros é observada. A reação é saturada por adição de NH₄Cl saturado. A fase aquosa é extraída com CH₂Cl₂ (3 x 15 mL) e as fases orgânicas são combinadas, secas sobre Na₂SO₄, filtradas e concentradas sob vácuo. O resíduo é purificado por cromatografia instantânea (SiO₂, Hexano/AcOEt = 3/1), pelo que obtendo uma mistura de dois isômeros (0,145 g, 0,210 mmol, 97%). Os dois isômeros são separados por

cromatografia adicional. Na ordem de eluição:

Primeiro diastereômero

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.80 (br s, 1 H, Ar),

8.23 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 8.01 (br d, 1 H, Ar), 7.90-7.71 (m, 2 H, Ar), 7.70-7.45 (m, 2 H, Ar + H-14), 6.52 (br s, 1 H, H-5), 5.61 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 5.23 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 2.03-1.81 (m, 2 H, H-19), 1.79-1.08 (br s, 18 H), 1.06-0.92 (m, 12 H), 0.80-0.70 (m, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100

Segundo diastereômero

5 ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.79 (br s, 1 H, Ar), 8.23

(d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 8.01 (br d, 1 H, Ar), 7.85-7.76 (m, 2 H, Ar), 7.65 (br t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.52 (s, 1 H, H-14), 6.54 (br s, 1 H, H-5), 5.61 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 5.22 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 2.03-1.82 (m, 2 H, H-19), 1.76-1.08 (br s, 18 H), 1.04-0.92 (m, 12 H), 0.80-0.70 (m, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171.5, 157.9, 155.5, 155.5, 152.3, 152.0, 151.2, 149.4, 145.1, 132.1, 130.6, 130.0, 128.7, 128.4, 127.9, 119.9, 98.2, 82.9, 81.5, 79.6, 75.2, 65.8, 33.3, 28.3, 27.4, 7.8, 7.2, 6.4.

Exemplo III - Preparação de 5-di-*t*-butoxicarbonilidrazino-20-OH-camptotecina – primeiro diastereômero

5-di-*t*-Butoxicarbonilidrazino-20-OTES-camptotecina (0,050 g, 0,072 mmol) primeiro diastereômero é dissolvida em THF anidro (4 mL) com
 10 agitação sob atmosfera inerte, subsequentemente $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (0,088 mL, 0,542 mmol) é gotejado. A mistura de reação é reagida por 35 horas à temperatura ambiente, monitorando por TLC o desaparecimento do reagente (Hexano/AcOEt = 3/2). O solvente é evaporado sob vácuo e o resíduo é purificado por cromatografia instantânea (SiO_2 , Hexano/AcOEt = 3/2), pelo que,
 15 obtendo o composto desejado (0,041 g, 0,071 mmol, 98%) como um sólido amarelo pálido.

O produto é adicionalmente purificado por cristalização a partir de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Pentano} = 1/50$.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.77 (br s, 1 H, Ar), 8.16 (br d, 1 H, $J = 8.0$ Hz, Ar), 7.97 (br s, 1 H, Ar), 7.86-7.50 (m, 4 H, Ar), 6.51 (br s, 1 H, H-5), 5.66 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 5.24 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 3.86 (br s, 1 H, OH), 2.00-1.80 (m, 2 H, H-19), 1.79-1.13 (br s, 18 H), 1.03 (t, 3 H, $J = 7.6$ Hz, Me). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 173.7, 157.9, 155.5, 155.5, 152.1, 151.3, 150.7, 149.6, 145.7, 132.3, 130.7, 129.9, 128.7, 127.9, 127.6, 120.0, 97.9, 82.8, 81.6, 79.7, 72.7, 66.1, 31.8, 28.3, 27.7, 7.7.

Exemplo IV - Preparação de 5-di-*t*-butoxicarbonilidrazino-20-OH-camptotecina – segundo diastereômero

5-di-*t*-Butoxicarbonilidrazino-20-OTES-camptotecina (0,072 g, 0,072 mmol) segundo diastereômero é dissolvida em THF anidro (4,5 mL) com agitação sob atmosfera inerte, subsequentemente $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ (0,088 mL, 0,542 mmol) é gotejado. A mistura de reação é reagida por 35 horas à temperatura ambiente, monitorando por TLC o desaparecimento do reagente (Hexano/AcOEt = 3/2). O solvente é evaporado sob vácuo e o resíduo é purificado por cromatografia instantânea (SiO_2 , Hexano/AcOEt = 3/2), pelo que, obtendo o composto desejado (0,040 g, 0,069 mmol, 96%) com um sólido amarelo pálido.

O produto é adicionalmente purificado por cristalização a partir de CH_2Cl_2 /Pentano = 1/50.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.79 (br s, 1 H, Ar), 8.22 (br d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.99 (br s, 1 H, Ar), 7.88-7.50 (m, 4 H, Ar), 6.53 (br s, 1 H, H-5), 5.65 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 5.26 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 3.80 (br s, 1 H, OH), 2.00-1.80 (m, 2 H, H-19), 1.79-1.13 (br s, 18 H), 1.03 (t, 3 H, $J = 7.2$ Hz, Me). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 173.6, 157.9, 155.4, 155.4, 152.1, 151.3, 150.8, 149.5, 145.6, 132.3, 130.8, 129.8, 128.7, 127.9, 127.8, 119.8, 98.0, 83.0, 81.5, 79.7, 72.7, 66.3, 31.8, 28.3, 27.7, 7.8.

15 Exemplo V – Preparação de 5-dibenziloxicarbonilidrazino-20-OTES-camptotecina

Camptotecina 20-OTES (0,100 g, 0,216 mmol) é dissolvida em THF anidro (6 mL) com agitação sob atmosfera inerte, então resfriada a uma temperatu-

ra de -78°C e uma solução de LiHMDS a 1,0M em THF (0,281 mL, 0,281 mmol) é gotejada. Após 20 minutos, dibenzil azodicaboxilato (0,097 g, 0,324 mmol) em THF anidro (2 mL) é adicionado. Após 3 horas a -78°C , a temperatura se eleva para 25°C e o desaparecimento do reagente é monitorado por TLC (Hexano/AcOEt = 3/1). A formação de dois diastereômeros é observada. Após 90 minutos à temperatura ambiente, a reação é saturada por adição de NH_4Cl saturado. A fase aquosa é extraída com CH_2Cl_2 (3 x 15 mL) e as fases orgânicas são combinadas, secas sobre Na_2SO_4 , filtradas e concentradas sob vácuo. O resíduo é purificado por cromatografia instantânea (SiO₂, Hexano/AcOEt = 4/1 então 7/2), pelo que obtendo um sólido amarelo pálido (0,161 g, 0,212 mmol, 98%). Os dois isômeros são separados por cromatografia adicional. Na ordem de eluição:

Primeiro diastereômero

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.70 (br s, 1 H, Ar),

8.39 (br s 1 H, Ar), 8.22 (br d, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.95 (br d, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.83 (br t, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.65 (br t, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.64-7.00 (m, 11 H, Ar + H-14), 6.49 (br s, 1 H, H-5), 5.57 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 5.47-4.44 (m, 5 H), 1.98-1.82 (m, 2 H, H-19), 1.02-0.89 (m, 12 H), 0.80-0.70 (m, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171.6, 158.0, 156.3, 156.3, 153.0, 152.2, 151.0, 149.6, 144.8, 135.3, 132.1, 130.6, 130.0, 128.6-127.8 (11 C), 119.9, 98.4, 79.5, 75.2, 68.4, 67.9, 65.6, 33.0, 7.9, 7.2, 6.4.

15 Segundo diastereômero

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.85 (br s, 1 H, Ar),

8.58 (br s 1 H, Ar), 8.20 (br s, 1 H, Ar), 7.93 (br s, Ar), 7.81 (br t, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.63 (br t, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.56-6.90 (m, 11 H, Ar + H-14), 6.52 (br s, 1 H, H-5), 5.55 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 5.44-4.71 (m, 5 H), 1.98-1.80 (m, 2 H, H-19), 1.05-0.90 (m, 12 H), 0.81-0.70 (m, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171.5, 157.9, 156.4, 156.4, 152.9, 152.4, 150.9, 149.4, 144.8, 135.3, 132.1, 130.6, 129.9, 128.6-127.8 (11 C), 119.9, 98.5, 79.3, 75.2, 68.4, 67.8, 65.6, 32.9, 7.8, 7.2, 6.4.

Exemplo VI - Preparação de 5-dibenziloxicarbonilidrazino-20-OH-camptotecina – primeiro diastereômero

5-Dibenziloxicarbonilidrazino-20-OTES-camptotecina primeiro diastereômero (0,140 g, 0,184 mmol) é dissolvida em THF anidro (6 mL) com agitação sob atmosfera inerte, subsequentemente Et₃N.3HF (0,225 mL, 1.380 mmoles) é gotejado. A mistura de reação é reagida por 52 horas à temperatura ambiente, monitorando por TLC o desaparecimento do reagente (Hexano/AcOEt = 1/3). O solvente é evaporado sob vácuo e o resíduo é purificado por cromatografia instantânea (SiO₂, Hexano/AcOEt = 1/1, então 2/3), pelo que, obtendo (0,113 g, 0,175 mmol, 95%) do composto desejado como um sólido amarelo pálido. O produto é adicionalmente purificado por cristalização a partir de CH₂Cl₂/Pentano = 1/50.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.67 (br s, 1 H, Ar), 8.39 (br s 1 H, Ar), 8.12 (br d, 1 H, J = 7.6 Hz, Ar), 7.95 (br s, 1 H, Ar), 7.74 (br t, 1 H, J = 7.6 Hz, Ar), 7.65-6.66 (m, 12 H, Ar + H-14), 6.48 (br s, 1 H, H-5), 5.55 (d, 1 H, J = 16.0 Hz, H-17), 5.42-4.44 (m, 5 H), 3.86 (br s, 1 H, OH), 1.92-1.72 (m, 2 H, H-19), 0.95 (t, 3 H, J = 7.6 Hz, Me). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 173.5, 158.0, 156.2, 156.0, 153.0, 150.9, 150.9, 149.5, 145.3, 135.4, 132.2, 130.7, 129.8, 128.7-127.8 (11 C), 119.9, 98.2, 79.6, 72.7, 68.5, 68.0, 65.9, 31.6, 7.8.

Exemplo VII - Preparação de 5-dibenziloxicarbonilidrazino-20-OH-camptotecina – segundo diastereômero

5-Dibenziloxicarbonilidrazino-20-OTES-camptotecina - segundo diastereômero (0,140 g, 0,184 mmol) é dissolvida em THF anidro (6 mL) com agitação sob atmosfera inerte, subsequentemente Et₃N.3HF (0,150 mL, 0,921 mmol) é gotejado. A mistura de reação é reagida por 55 horas à temperatura ambiente, monitorando por TLC o desaparecimento do reagente (Hexano/AcOEt = 3/2). O solvente é evaporado sob vácuo e o resíduo é purificado por cromatografia instantânea (SiO₂, Hexano/AcOEt = 1/1), pelo que, obtendo o composto desejado (0,113 g, 0,175 mmol, 95%) como um sólido amarelo pálido. O produto é adicionalmente purificado por cristalização a

partir de CH₂Cl₂/Pentano = 1/50.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.71 (br s, 1 H, Ar), 8.34 (br s 1 H, Ar), 8.18 (br s, 1 H, Ar), 7.94 (br s, 1 H, Ar), 7.79 (br t, 1 H, *J* = 7.6 Hz, Ar), 7.70-6.70 (m, 12 H, Ar + H-14), 6.52 (br s, 1 H, H-5), 5.53 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz, H-17), 5.44-4.48 (m, 5 H), 3.87 (br s, 1 H, OH), 1.90-1.70 (m, 2 H, H-19), 0.99 (t, 3 H, *J* = 7.6 Hz, Me). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 173.4, 158.0, 156.3, 156.1, 153.0, 151.0, 150.9, 149.6, 145.3, 135.5, 132.3, 130.8, 129.8, 128.7-127.8 (11 C), 119.8, 98.4, 79.5, 72.7, 68.5, 67.8, 66.0, 31.6, 7.7.

Exemplo VIII – Preparação do sal de TFA de 4,5-diidro-triazol[5,4-c]16a-desoxocamptotecina

5-di-t-Butoxicarbonilidrazino-20-OTES-camptotecina (0,225 g, 0,324 mmol, mistura diastereomérica 1:1) é dissolvida em 1,2-dicloroetano anidro (DCE) (8 mL) com agitação sob atmosfera inerte, subsequentemente ácido trifluoracético (TFA) (0,895 mL, 11,67 mmoles) é gotejado. A mistura de reação é reagida por 20 horas à temperatura ambiente, monitorando por TLC o desaparecimento do reagente (Hexano/AcOEt = 1/3), então refluxada por 4 horas. O solvente é evaporado sob vácuo e o resíduo é purificado por cromatografia instantânea (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH = 30/1), pelo que, obtendo o composto desejado (0,084 g, 0,178 mmol, 55%) como o sal trifluoracetato. A mistura de 1:1 dos dois diastereômeros é adicionalmente purificada por cromatografia instantânea (SiO₂, Tolueno/AcOEt = 1/1).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 10.61 (br s, 0.5 H, N5-NH=C16a), 10.39 (br s, 0.5 H, N5-NH=C16a), 8.67 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.22-8.15 (m, 1 H, Ar), 7.96-7.92 (m, 1 H, Ar), 7.88-7.78 (m, 1 H, Ar), 7.69-7.60 (m, 2 H, Ar), 6.38-6.36 (m, 1 H, Ar, H-5), 5.72-5.62 (m, 1 H, Ar, H-17), 5.32-5.20 (m, 2 H, Ar, H-17 + N5H), 4.08-3.86 (br s, 1 H, OH), 1.96-1.74 (m, 2 H, H-19),

1.05-0.98 (t, 3 H, $J = 7.6$ Hz, Me). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 173.8 (0.5 C), 173.4 (0.5 C), 159.1, 159.0, 156.7 (q CF_3COOH), 156.5 (q CF_3COOH) 151.5, 151.3, 150.7, 150.5, 150.1, 149.9, 144.8, 144.7, 134.0, 133.8, 131.6, 131.5, 129.9, 129.8, 128.7, 128.7, 128.4, 128.4, 128.2, 128.2, 127.1, 126.9, 120.5, 120.3, 99.1(2 C), 78.9, 78.6, 72.7, 72.7, 66.0 (2 C), 31.7 (2 C), 7.7, 7.7.

Exemplo IX – Preparação de triazol[5,4-c]16a-desoxocamptotecina

O sal de TFA de 4,5-triidro-triazol[5,4-c]16a-desoxocamptotecina (0,020 g, 0,042 mmol) é dissolvido em CH_2Cl_2 anidro (4 mL) com agitação sob atmosfera inerte, sendo adicionado ao mesmo, subsequentemente, a 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona (DDQ) (0,025 mg, 0,110 mmol). A mistura de reação é reagida por 31 horas à temperatura ambiente, monitorando por TLC o desaparecimento do reagente ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 30/1$). A reação é saturada por adição de H_2O . A fase aquosa é extraída com CH_2Cl_2 (3 x 15 mL) e as fases orgânicas são combinadas, secas sobre Na_2SO_4 , filtradas e concentradas sob vácuo. O resíduo é purificado por cromatografia instantânea (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 45/1$), pelo que, obtendo um sólido amarelo (0,014 g, 0,039 mmol, 94%).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.89 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.20 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 8.00 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.88 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.79 (s, 1 H, Ar H-14), 7.69 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 5.70 (d, 1 H, $J = 17.2$ Hz, H-17), 5.28 (d, 1 H, $J = 17.2$ Hz, H-17), 3.83 (br s, 1 H, OH), 2.00-1.74 (m, 2 H, H-19), 1.08 (t, 3 H, $J = 7.6$ Hz, Me). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 172.6, 157.4, 152.5, 150.8, 148.9, 143.7, 134.9, 132.5, 132.4, 130.0, 129.5, 128.7, 127.5, 122.6, 121.4, 101.2, 72.4, 66.0, 31.6, 7.7.

Exemplo X – Ensaio de inibição de crescimento celular

Células H460 de tumor pulmonar de célula grande humano foram cultivadas em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal de bezerro. A sensibilidade celular foi determinada por ensaio de inibição de crescimento celular após 1 ou 72 horas de exposição ao fármaco. As células no crescimento logarítmico foram coletadas e semeadas em duplicata em placas de 6

poços. Vinte e quatro horas após a semeadura, as células foram expostas aos fármacos e contadas com um contador Coulter, 72 horas após a exposição aos fármacos, para a determinação dos IC₅₀. O IC₅₀ é definido como a inibição de concentração em 50% de crescimento celular, quando comparado ao crescimento dos controles não tratados.

Exemplo XI – Ensaio de ruptura de DNA dependente de Topoisomerase-I

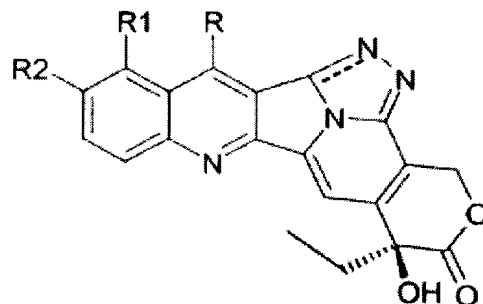
As rupturas de DNA foram determinadas usando um gel purificado de 751 pares de base BamHI-EcoRI DNA SV40 (Beretta GL, Binaschi M, Zagni AND, Capuani L, Capranico G. Tethering a type IB topoisomerase to a DNA site by enzyme fusion to a heterologous site-selective DNA-binding protein domain. *Cancer Res.* 1999; 59:3689-97). Os fragmentos de DNA foram marcados apenas em 3'. A reação de ruptura de DNA (20.000 cpm/amostra) foi realizada em 10 mL de Tris-HCl a 10 mM (pH 7,6), KCl a 150 mM, MgCl₂ a 5 mM, 15 µg/mL de BSA, tiotreitól a 0,1 mM e a enzima recombinante humana (comprimento pleno top1) por 30 minutos a 37°C. As reações foram bloqueadas usando SDS a 0,5% e 0,3 mg/mL de K proteinase por 45 minutos a 42°C. A persistência de lesão ao DNA foi testada em tempos diferentes adicionando-se NaCl a 0,6 M após 30 minutos de incubação com 10 µM do fármaco. Após precipitação, o DNA foi ressuspenso no tampão de desnaturação (80% formamida, NaOH a 10 mM, 0,01 M EDTA e 1 mg/mL de corante) antes da semeadura no gel desnaturante (poliacrilamida a 7% em tampão TBE). Todos os níveis de ruptura de DNA foram medidos por meio de um PhosphorImager modelo 425 (Molecular Dynamics) (Dallavalle S, Ferrari A, Biasotti B e outros, Novel 7-oxyiminomethyl camptothecin derivatives with potent *in vitro* and *in vivo* antitumor activity *J. Med. Chem.* 2001; 44:3264-74).

Persistência do DNA a lesão (%)

Compostos	tempo (minutos)			
	0	1	5	10
topotecano	100	65	20	10
camptotecina	100	58	23	20
SN38	100	60	33	28
IDN 6132	100	45	32	20

REIVINDICAÇÕES

1. Compostos da fórmula geral (I):



(I)

em que:

R é alquila, aminoalquila, hidroxialquila, nitrila, alcoximino, ariloximino, sililalquila;

R1 é hidrogênio, hidróxi, alcóxi, aminoalquila;

R2 é hidrogênio, hidróxi, alcóxi, aminoalquila, hidroxila opcionalmente protegida;

em que os grupos alquila, alcóxi, aminoalquila ou alcoximino podem conter 1 a 8, preferivelmente 1 a 4 átomos de carbono em uma cadeia linear ou ramificada, considerando-se que o grupo ariloximino pode conter 5 a 10 átomos de carbono;

os sais farmacologicamente aceitáveis, isômeros, enantiômeros, diastereômeros dos mesmos e misturas correspondentes.

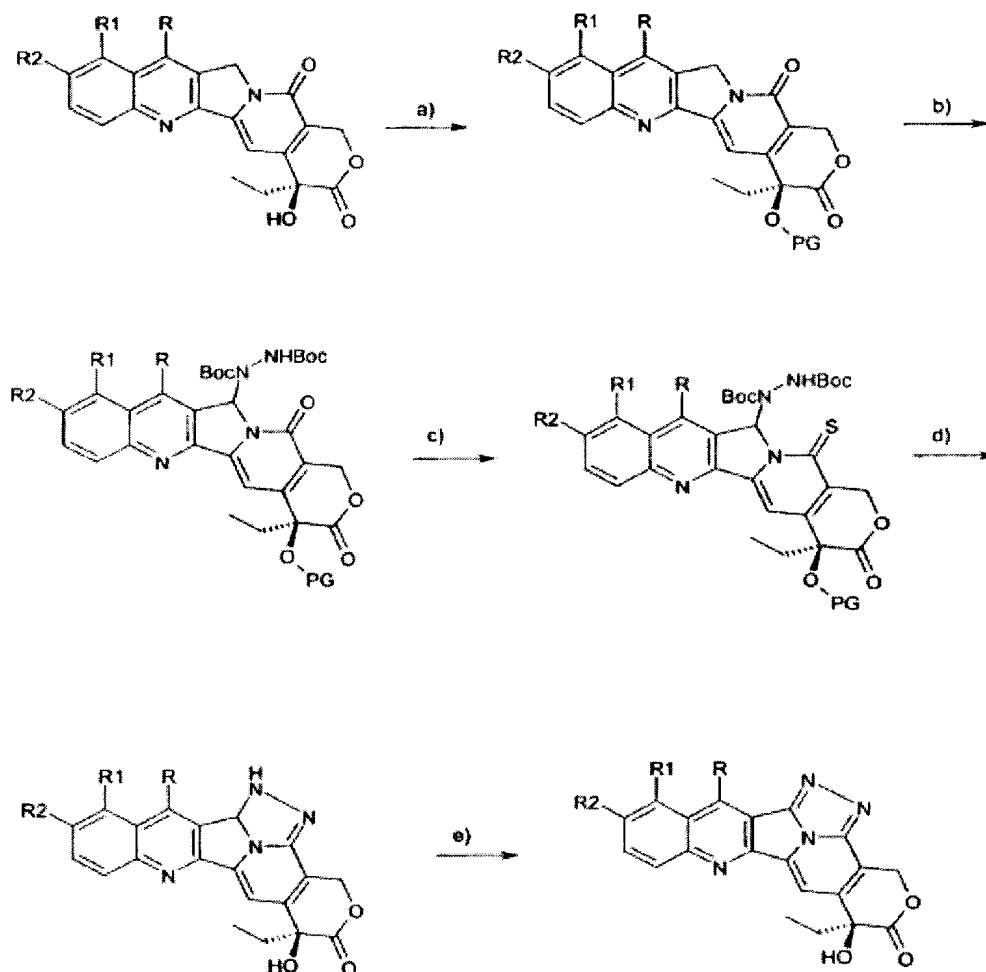
2. Composto da fórmula (I) de acordo com a reivindicação 1, que é selecionado do grupo consistindo em:

a) 4,5-diidro-triazol[5,4-c]16a-desoxocamptotecina,

b) triazol[5,4-c]16a-desoxocamptotecina.

3. Processo para preparação dos compostos da fórmula (I), o processo compreendendo substancialmente as etapas (a)-(e) mostradas no esquema que se segue:

2



em que:

- proteção dos grupos hidróxi precursores;
- derivatização em 5 com hidrazina N,N-diprotetida;
- conversão opcional do anel piridiona no anel tiopiridona
- remoção dos grupos protetores com ciclização concomitante,
- aromatização opcional do anel pirazole

5

e onde R, R1 e R2 possuem os significados descritos acima, enquanto PG é um grupo de proteção hidróxi.

10

4. Processo para preparação dos compostos da fórmula (I), de acordo com a reivindicação 3, em que a ordem das etapas (b) e (c) é invertida.

5. Composição farmacêutica contendo um composto da fórmula (I) em conjunto com os veículos e excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

6. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 5,

que está na forma apropriada para administração oral ou parenteral.

7. Uso de um composto como definido nas reivindicações 1-2 ou de uma composição como definido nas reivindicações 5-6 para preparação de um fármaco para tratamento de tumores.

5 8. Uso de acordo com a reivindicação 7, onde o dito fármaco é usado para tratamento de tumores sólidos e leucemias, especificamente tumores de pulmão, ovário, mama, estômago, fígado, próstata, sarcomas de tecidos moles, esôfago, pâncreas, cabeça e pescoço, glioblastoma, leucemias mielocíticas crônicas e agudas.

