



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 977**

51 Int. Cl.:

C07F 7/08 (2006.01)

C07D 491/22 (2006.01)

C07D 471/14 (2006.01)

C07D 491/044 (2006.01)

C07D 213/02 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 31/4738 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00921919 .7**

96 Fecha de presentación : **07.04.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1173180**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2002**

54 Título: **Análogos de camptotecina y métodos para su preparación.**

30 Prioridad: **09.04.1999 US 290019**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

73 Titular/es: **University of Pittsburgh - Of the
Commonwealth System of Higher Education
200 Gardner Steel Conference Center
Thackeray & O'Hara Streets
Pittsburgh, Pennsylvania 15260, US
University of Kentucky Research Foundation**

72 Inventor/es: **Curran, Dennis, P.;
Bom, David y
Burke, Thomas, G.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 308 977 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Análogos de camptotecina y métodos para su preparación.

5 Solicitudes relacionadas

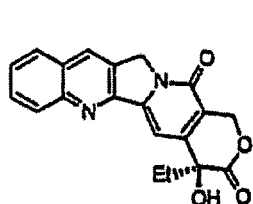
Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos compuestos y métodos para su preparación y, particularmente, a derivados o análogos de la camptotecina con anillo E expandido y a métodos de preparación de dichos análogos de la camptotecina.

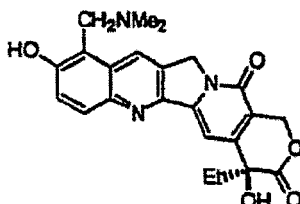
Antecedentes de la invención

Las camptotecinas son inhibidores de la ADN topoisomerasa I que se usan ahora como fármacos anticancerosos. El topotecano (tpt) y la CPT-11 son los primeros dos miembros de la familia de las camptotecinas que obtuvieron la categoría de aprobación total de la *Food and Drugs Administration* (el topotecano en 1966 como terapia de segunda línea contra el cáncer epitelial de ovario en estado avanzado, el topotecano de nuevo en 1998 para el tratamiento del cáncer pulmonar de células pequeñas, la CPT-11 en 1998 como terapia de primera línea contra el cáncer de colon). Otros varios análogos de la familia de la camptotecina, tales como el GI-147211C, DX8951f, la 9-aminocamptotecina (9-AC) y la 9-nitrocamptotecina, están en varias etapas de la evaluación pre-clínica y clínica. Cada una de las camptotecinas en uso clínico experimenta una hidrólisis relativamente rápida en la corriente sanguínea lo que produce una pérdida pronunciada de actividad anticancerosa. En las camptotecinas clínicamente importantes el farmacóforo clave α -hidroxilactona es el que se hidroliza a pH fisiológico para conducir a una forma hidroxicarboxilato biológicamente inactiva y potencialmente tóxica. Fassberg, J. y Stella, V. J., "A Kinetic and Mechanistic Study of the Hydrolysis of Camptothecin and Some Analogues", *J. Pharm. Sci.* 81: 676-684 (1992); Hertzberg, R. P., Caranfa, M. J. y Hecht, S. M. "On the Mechanism of Topoisomerase I Inhibition by Camptothecin: Evidence for Binding to an Enzyme-DNA Complex", *Biochemistry* 28: 4629-4638 (1989); Hsiang, Y.-H. y Liu, L. F., "Identification of Mammalian DNA Topoisomerase I as an Intracellular Target of the Anticancer Drug Camptothecin", *Cancer Res.* 48: 1722-1726 (1988); y Jaxel, C., Kohn, K. W., Wani, M. C., Wall, M. E. y Pommier, Y., "Structure-Activity Study of Camptothecin Derivatives on Mammalian Topoisomerase I: Evidence for a Specific Receptor Site and a Relation to Antitumor Activity", *Cancer Res.* 49: 5077-5082 (1989). Las referencias mencionadas en la presente memoria, incluyendo las mencionadas anteriormente, pueden facilitar la comprensión de la presente invención.

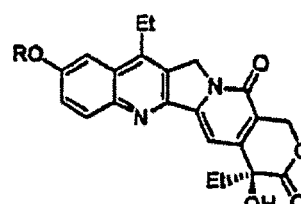
A continuación se muestran las estructuras de la camptotecina y algunos de sus análogos importantes:



camptotecina (cpt)

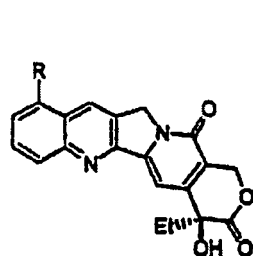
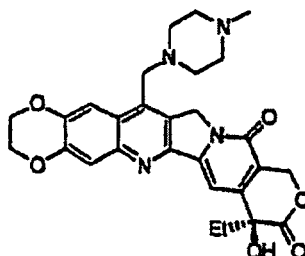


topotecano (tpt)

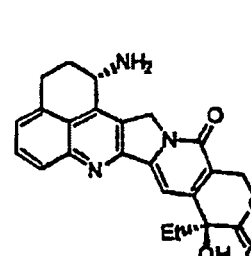


SN-38, R = H

CPT-11, R = carbamato de piperidinilpiperidina

9-amino-camptotecina (9-AC), R = NH₂
9-nitro-camptotecina, R = NO₂

GI-147211C

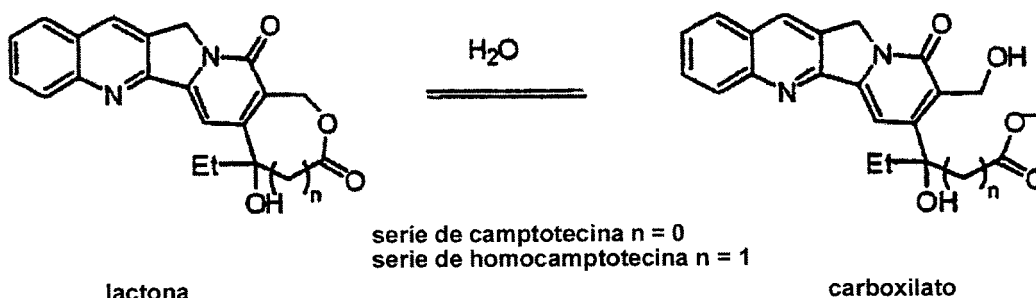


DX8951f

Recientes trabajos de investigación han mostrado que agentes tales como la 9-aminocamptotecina y la camptotecina (cpt) presentan estabilidades muy pequeñas en la sangre humana debido a interacciones de enlace de elevada afinidad entre sus formas carboxilato y la albúmina del suero humano (abreviada generalmente como HSA por sus iniciales en inglés: human serum albumin). Burke, T. G., Mi, Z., Jiang, Y. y Munshi, C. B. "The Important Role of Albumin in Determining the Relative Human Blood Stabilities of the Camptothecin Anticancer Drugs", *Journal of*

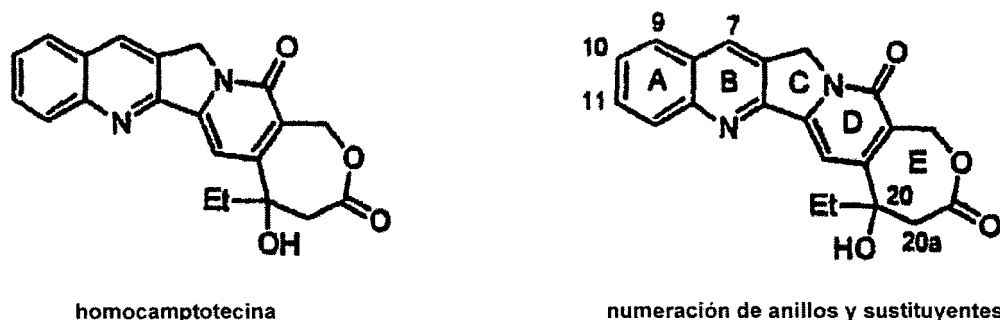
Pharmaceutical Sciences, 84: 518-519 (1995); Burke, T. G. y Mi, Z. "The Structural Basis of Camptothecin Interactions with Human Serum Albumin: Impact on Drug Stability", *Journal of Medicinal Chemistry*, 37: 40-46 (1994); Mi, Z. y Burke, T. G. "Differential Interactions of Camptothecin Lactone and Carboxylate Forms with Human Blood Components", *Biochemistry*, 33: 10325-10336 (1994); y Mi, Z., Malak, H. y Burke, T. G. "Reduced Albumin Binding Promotes the Stability and Activity of Topotecan in Human Blood", *Biochemistry*, 34:13722-13728 (1995). Experimentos de persistencia de la fluorescencia en el dominio de la frecuencia revelaron que la albúmina de suero humano (HSA) se enlaza preferentemente al carboxilato de la camptotecina con una afinidad más de 100 veces mayor en comparación con la lactona de la camptotecina. Mi, Z. y Burke, T. G. "Marked Interspecies Variations Concerning the Interactions of Camptothecin with Serum Albumins: A Frequency-Domain Fluorescence Spectroscopic Study", *Biochemistry*, 33: 12540-12545 (1994). Este enlace diferencial del carboxilato sobre la lactona hace que la camptotecina y la 9-AC se abran más rápida y completamente en presencia de HSA que en ausencia de la proteína. En el plasma humano, pH 7,4 y 37°C, tanto la camptotecina como la 9-AC se abren rápidamente y de forma esencialmente completa hasta niveles de lactona casi despreciables de 0,2% en el equilibrio. Mientras que la presencia de la HSA favorece la apertura del anillo lactona de la camptotecina y la 9-AC, los glóbulos rojos de la sangre y las capas dobles de lípidos se enlazan en general preferentemente a las formas lactona neutras de la camptotecina frente a sus formas respectivas lactona y carboxilato cargadas negativamente. Burke, T. G., Staubus, A. E., Mishra, A. K. y Malak, H., "Liposomal Stabilization of Camptothecin's Lactone Ring", *J. Am. Chem. Soc.* 114: 8318-8319 (1992); y Burke, T. G., Mishra, A. K., Wani, M. y Wall, M. "Lipid Bilayer Partitioning and Stability of Camptothecin Drugs", *Biochemistry*, 32: 5352-5364 (1993). Las interacciones del fármaco con los eritrocitos favorecen de este modo los niveles de lactona activa en la sangre.

Equilibrio lactona/carboxilato



Recientemente, Laverigne *et al.* han demostrado que la expansión del anillo E de la camptotecina para producir una "homocamptotecina" aumenta de estabilidad en disolución de la camptotecina manteniendo a la vez la actividad anticancerosa. Laverigne, O., Lesueur-Ginot, L., Rodas, F. P., Kasprzyk, P. G., Pomier, J., Demarquay, D., Prevost, G., Ulibarri, G., Rolland, A., Schiano-Liberatore, A.-M., Harnett, J., Pons, D., Camara, J., Bigg, D. "Homocamptothecins: Synthesis and Antitumor Activity of Novel E-Ring Modified Camptothecin Analogs", *J. Med. Chem.* 41, 5410-5419 (1998); y Laverigne, O., Lesueur-Ginot, L., Rodas, F. P. y Bigg, D., "An E-Ring Modified Camptothecin With Potent Antiproliferative and Topoisomerase I inhibitory Activities", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7: 2235-2238 (1997). La modificación del anillo E en los estudios de Laverigne *et al.* implicaron la inserción de un espaciador de metileno entre el grupo funcional OH en la posición 20 y el grupo carboxilo de la α -hidroxilactona de seis miembros natural de la camptotecina. Se encontró que la incorporación del nuevo anillo β -hidroxilactona de 7 miembros en la camptotecina mejoraba la estabilidad en disolución y en plasma del agente.

A continuación se muestra la estructura de la homocamptotecina de Laverigne *et al.* y el sistema de numeración usado para describir dichos compuestos:

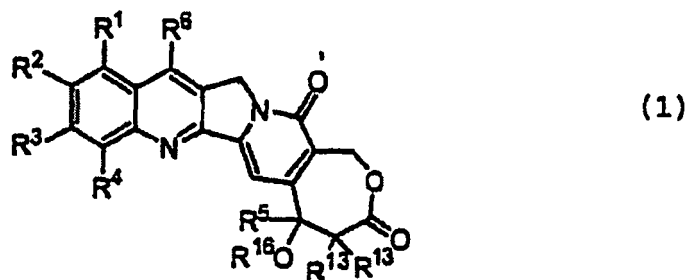


Aunque se han hecho avances esenciales en el desarrollo de la familia de fármacos de camptotecina, sigue siendo todavía muy conveniente desarrollar compuestos mejorados en esta familia de fármacos y desarrollar vías de síntesis mejoradas para producir dichos fármacos.

- 5 El trabajo de Josien *et al.* en *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 7, N° 24, páginas 3189-3194 (1997) describe camptotecinas sustituidas con sililo en la posición 7 para su utilización como agentes antitumorales.

Resumen de la invención

- 10 La presente invención proporciona de forma general un compuesto que tiene la siguiente fórmula (1):



- 25 en forma racémica, forma enantioméricamente enriquecida o forma enantioméricamente pura;

en la que R¹ es hidrógeno, -C(O)R^f, donde R^f es un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un grupo amino o un grupo hidroxilo, un grupo alquilo, un grupo alqueno, un grupo alquino, un grupo alquilo, un grupo arilo, un grupo acilo, -OC(O)R^d, donde R^d es un grupo alquilo, -OC(O)NR^aR^b, donde R^a y R^b son independientemente el mismo o diferente, H, -C(O)R^f, un grupo alquilo o un grupo arilo, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo nitrilo, un grupo ciano, un grupo azido, un grupo formilo, un grupo hidrazino, un grupo amino, -SR^c, donde R^c es hidrógeno, -C(O)R^f, un grupo alquilo o un grupo arilo; o R¹ y R² forman juntos una cadena de tres o cuatro miembros elegidos entre el grupo de CH, CH₂, O, S, NH o NR¹⁵, donde R¹⁵ es un grupo alquilo C₁-C₆;

- 35 R² es -C(O)R^f donde R^f es un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un grupo amino o un grupo hidroxilo, un grupo alquilo, un grupo alqueno, un grupo alquino, un grupo alquilo, un grupo arilo, un grupo acilo, -OC(O)OR^d, donde R^d es un grupo alquilo, -OC(O)NR^aR^b, donde R^a y R^b son independientemente el mismo o diferente, H, -C(O)R^f, un grupo alquilo o un grupo arilo, un grupo hidroxilo, un grupo nitrilo, un grupo ciano, un grupo azido, un grupo formilo, un grupo hidrazino, un grupo amino, -SR^c, donde R^c es hidrógeno, -C(O)R^f, un grupo alquilo o un grupo arilo; o R¹ y R² forman juntos una cadena de tres o cuatro miembros elegidos entre el grupo de CH, CH₂, O, S, NH o NR¹⁵, donde R¹⁵ es un grupo alquilo C₁-C₆;

- 40 R³ es H, un átomo de halógeno, un grupo nitrilo, un grupo amino, un grupo hidroxilo o un grupo ciano; o R² y R³ forman juntos una cadena de tres o cuatro miembros elegidos entre el grupo de CH, CH₂, O, S, NH o NR¹⁵, donde R¹⁵ es un grupo alquilo C₁-C₆;

- 45 R⁴ es H, F, un grupo amino, un grupo alquilo C₁₋₃, un grupo alqueno C₂₋₃, un grupo alquino C₂₋₃, un grupo alquilo o un grupo alquilo C₁₋₃;

- 50 R⁵ es un grupo alquilo C₁₋₁₀, un grupo alqueno, un grupo alquino o un grupo bencilo;

R⁶ es -Si(R⁸R⁹R¹⁰) o -(R⁷)Si(R⁸R⁹R¹⁰), donde R⁷ es un grupo alquilo, un grupo alqueno o un grupo alquino; y

- 55 R⁸, R⁹ y R¹⁰ son independientemente un grupo alquilo C₁₋₁₀, un grupo alqueno C₂₋₁₀, un grupo alquino C₂₋₁₀, un grupo arilo o un grupo -(CH₂)_NR¹¹, donde N es un número entero en el intervalo de 1 a 10 y R¹¹ es un grupo hidroxilo, un grupo alquilo, un grupo amino, un grupo alquilamino, un grupo dialquilamino, un átomo de halógeno, un grupo ciano, -SR^c o un grupo nitrilo;

- 60 R¹³ es H, F o -CH₃; y

R¹⁶ es -C(O)R^f o H;

o uno de los compuestos 7-trimetilsililhomocamptotecina o 7-ter-butildimetilsililhomocamptotecina;

- 65 y sus sales farmacéuticamente aceptables.

ES 2 308 977 T3

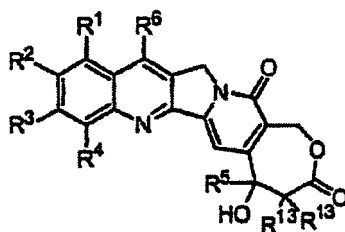
R^1 y R^2 juntos pueden formar, por ejemplo, un grupo de fórmula $-O(CH_2)_nO-$ en la que n es un número entero 1 ó 2. Similarmente, R^2 y R^3 juntos pueden formar, por ejemplo, un grupo de fórmula $-O(CH_2)_nO-$ en la que n es un número entero 1 ó 2.

R^5 es preferiblemente un grupo etilo, un grupo alilo, un grupo bencilo o un grupo propargilo. Más preferiblemente, R^5 es un grupo etilo. Preferiblemente, R^4 es H.

En un modo de realización, R^8 y R^9 son grupos metilo, R^{10} es un grupo ter-butilo o un grupo metilo, R^1 es H y R^3 es H. En este modo de realización, R^2 puede ser, por ejemplo, NH_2 u OH.

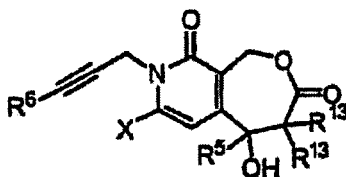
R^{13} es preferiblemente H. R^{16} es preferiblemente H o un grupo alquilo. Más preferiblemente, R^{16} es H o $-C(O)R^f$, donde R^f es un grupo alquilo. Más preferiblemente, R^{16} es H.

La presente invención también proporciona un método de síntesis de un compuesto que tiene la fórmula:

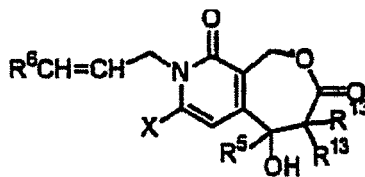


como se ha definido en la reivindicación 11,

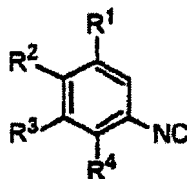
mediante una anulación 4+1 en cascada de radicales, en la que el precursor:



o el precursor:

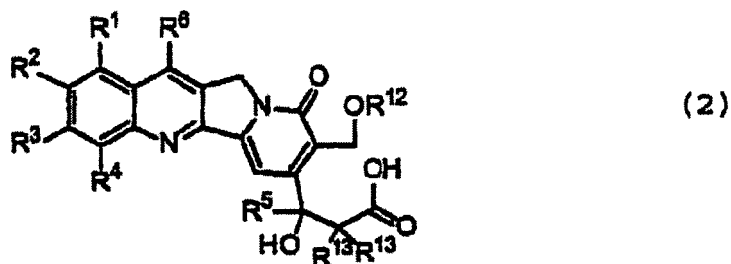


se hace reaccionar con un arilisonitrilo que tiene la fórmula:



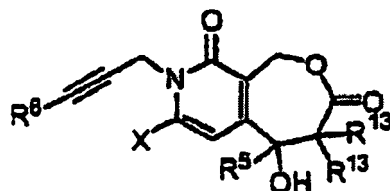
en la que X es un precursor de radicales. Preferiblemente, X es Cl, Br o I. Más preferiblemente, X es Br o I.

La presente invención también proporciona un compuesto que tiene la fórmula:

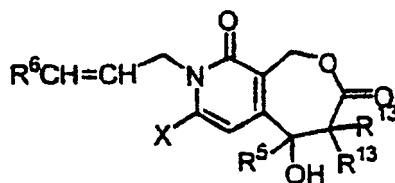


15 en forma racémica, forma enantioméricamente enriquecida o forma enantioméricamente pura, en la que R^{12} es preferiblemente H o $-C(O)R^f$, $-C(O)OR^d$ o $-C(O)NR^aR^b$.

La presente invención proporciona además compuestos que tienen las fórmulas:

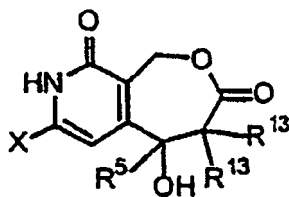


y



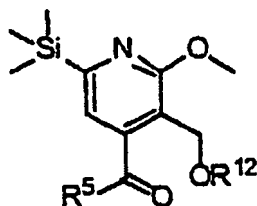
40 en forma racémica, forma enantioméricamente enriquecida o forma enantioméricamente pura.

Adicionalmente todavía, la presente invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula:

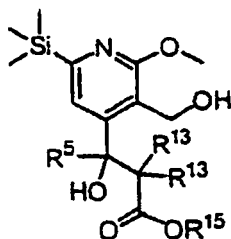


55 en forma racémica, forma enantioméricamente enriquecida o forma enantioméricamente pura.

La presente invención también proporciona un compuesto que tiene la fórmula:

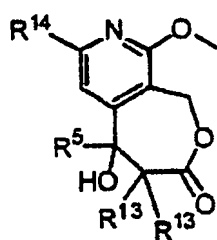


La presente invención también proporciona un compuesto que tiene la fórmula:



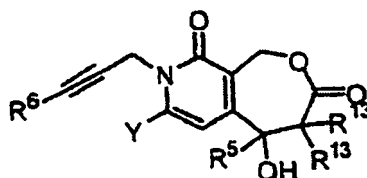
en la que R^{15} es un grupo alquilo C_1-C_6 .

La presente invención proporciona además un compuesto que tiene la fórmula:



en forma racémica, forma enantioméricamente enriquecida o forma enantioméricamente pura, en la que R^{14} es $SiMe_3$, I o Br.

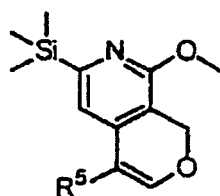
Adicionalmente además, la presente invención proporciona un método de síntesis de un compuesto que tiene la fórmula siguiente:



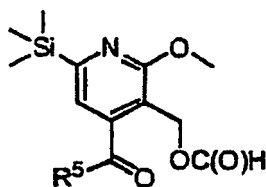
en la que Y es cloro, bromo o yodo;

que comprende las etapas de:

(a) tratar un enol éter de estructura:

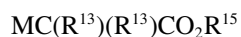


en condiciones de escisión oxidante adecuadas para formar un compuesto que tiene la estructura:

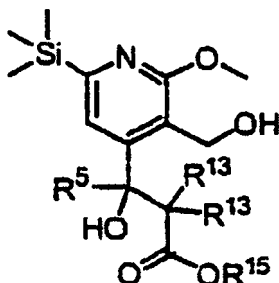


ES 2 308 977 T3

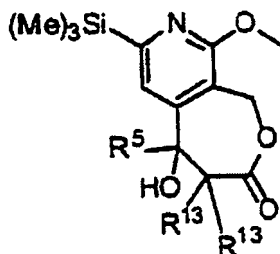
(b) tratar el compuesto formado en la etapa (a) con un reactivo organometálico que tiene la estructura:



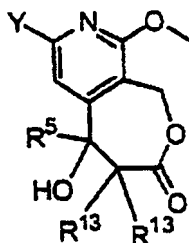
en la que M es Li, Na, K, MgY o ZnY, en condiciones adecuadas para formar un compuesto que tiene la estructura:



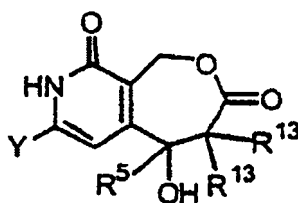
(c) tratar el compuesto formado en la etapa (b) en condiciones adecuadas con ácido para formar un compuesto que tiene la estructura:



(d) tratar el compuesto formado en la etapa (c) en condiciones adecuadas de desililación halogenante para formar un compuesto de la estructura:



(e) tratar el compuesto de la etapa (d) con ácido o con yodotrimetilsilano en condiciones adecuadas para la desmetilación, para proporcionar un compuesto de la estructura siguiente:

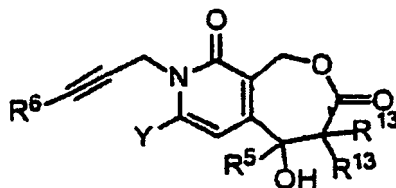


(f) tratar el compuesto de la etapa (e) con una base de litio o una base de sodio en presencia de una sal inorgánica de litio para desprotonar el átomo de nitrógeno;

(g) hacer reaccionar la especie desprotonada resultante de la etapa (f) con un compuesto de la estructura siguiente:



en la que Z es I, Br, Cl, un grupo mesilato o un grupo tosilato, y en condiciones adecuadas para producir la formación del compuesto de la estructura siguiente:



Como se ha indicado anteriormente, todos los compuestos de la presente invención que incluyen el grupo β -hidroxilactona pueden existir en forma racémica, en forma enantioméricamente enriquecida o en forma enantioméricamente pura. Las fórmulas de dichos compuestos, como se han expuesto en la presente memoria, cubren y/o incluyen cada una de dichas formas.

El término “precursor(es) de radicales”, como se usa en la presente memoria y como es bien conocido por los expertos en la técnica, se refiere generalmente a aquellos grupos funcionales que se escinden para generar radicales en condiciones estándar de reacciones de radicales en cadena o no. Los precursores de radicales habituales son los átomos de halógeno (excepto el flúor), los ácidos carboxílicos y sus derivados (tal como los tiohidroxamatos), los grupos selenofenilo y las sales de diazonio. Véase, por ejemplo, Giese, B. “Radicals in Organic Synthesis: Formation of Carbon-Carbon Bonds”; Pergamon, Oxford (1986).

Los términos “alquilo”, “arilo” y otros grupos se refieren generalmente tanto a grupos sustituidos como no sustituidos, a menos que se especifique lo contrario. A menos que se especifique de otra forma, los grupos alquilo son grupos hidrocarbonados y son preferiblemente grupos alquilo C_1 - C_{15} (es decir, que tienen de 1 a 15 átomos de carbono), y más preferiblemente grupos alquilo C_1 - C_{10} , y pueden ser ramificados o no ramificados, acíclicos o cíclicos. La definición anterior de un grupo alquilo y otras definiciones se aplican también cuando el grupo es un sustituyente de otro grupo (por ejemplo, un grupo alquilo como sustituyente de un grupo alquilamino o un grupo dialquilamino). El término “arilo” se refiere a fenilo o naftilo. Como se usa en la presente memoria, el término “halógeno” o “halo” se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

El término “alcoxi” se refiere a $-OR^d$, donde R^d es un grupo alquilo. El término “ariloxi” se refiere a $-OR^e$, donde R^e es un grupo arilo. El término acilo se refiere a $-C(O)R^f$. El término “alquenilo” se refiere a un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada con al menos un doble enlace, preferiblemente con 2-15 átomos de carbono y más preferiblemente 2-10 átomos de carbono (por ejemplo, $-CH=CHR^g$ o $-CH_2CH=CHR^g$). El término “alquinilo” se refiere a un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada con al menos un triple enlace, preferiblemente con 2-15 átomos de carbono y más preferiblemente 2-10 átomos de carbono (por ejemplo, $-C\equiv CR^h$ o $-CH_2-C\equiv CR^h$). Los términos “alquileno”, “alquenileno” y “alquinileno” se refieren a las formas bivalentes de los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, respectivamente.

Los grupos mencionados anteriormente pueden estar sustituidos con una gran variedad de sustituyentes para sintetizar análogos de la homocamptotecina conservando su actividad. Por ejemplo, los grupos alquilo pueden estar preferiblemente sustituidos con uno o varios grupos, incluyendo un grupo bencilo, un grupo fenilo, un grupo alcoxi, un grupo hidroxilo, un grupo amino (incluyendo, por ejemplo, grupos amino libre, grupos alquilamino, dialquilamino y grupos arilamino), un grupo alquenilo, un grupo alquinilo y un grupo aciloxi. En el caso de los grupos amino, ($-NR^aR^b$), R^a y R^b son preferible e independientemente hidrógeno, un grupo acilo, un grupo alquilo o un grupo arilo. Los grupos acilo pueden estar sustituidos preferiblemente con (es decir, R^f es) un grupo alquilo, un grupo haloalquilo (por ejemplo, un grupo perfluoroalquilo), un grupo alcoxi, un grupo amino y un grupo hidroxilo. Los grupos alquinilo y alquenilo pueden estar sustituidos preferiblemente con (es decir, R^g y R^h son preferiblemente) uno o varios grupos que incluyen un grupo alquilo, un grupo alcóxialquilo, un grupo aminoalquilo y un grupo bencilo.

El término “aciloxi” como se usa en la presente memoria se refiere al grupo $-OC(O)R^d$.

El término “alcoxicarboniloxi” como se usa en la presente memoria se refiere al grupo $-OC(O)OR^d$.

El término “carbamoiloxi” como se usa en la presente memoria se refiere al grupo $-OC(O)NR^aR^b$.

Los grupos amino e hidroxilo pueden incluir grupos protectores como se conoce en la técnica. Los grupos protectores preferidos para los grupos amino incluyen el ter-butoxicarbonilo, formilo, acetilo, bencilo, p-metoxibenciloxicarbonilo y tritilo. Otros grupos protectores adecuados, como es conocido por los expertos en la técnica, se describen en Greene, T. Wuts, P. G. M., “Protective Groups in Organic Synthesis”, Wiley (1991).

En general, R^1 , R^2 , R^3 , R^6 , R^7 y R^8 son preferiblemente no demasiado voluminosos para mantener la actividad del análogo de la camptotecina resultante. Preferiblemente por lo tanto R^1 , R^2 , R^3 , R^6 , R^7 y R^8 tienen independientemente un peso molecular de menos de aproximadamente 250. Más preferiblemente, R^1 , R^2 , R^3 , R^6 , R^7 y R^8 tienen independientemente un peso molecular de menos de aproximadamente 200.

Algunos de los análogos de la camptotecina de la presente invención se pueden preparar para uso farmacéutico como sales con ácidos inorgánicos, tales como hidrocloreto, hidrobromuro, sulfato, fosfato y nitrato. Los análogos de la camptotecina también se pueden preparar como sales con ácidos orgánicos, tales como acetato, tartrato, fumarato, succinato, citrato, metanosulfonato, p-toluensulfonato y estearato. Se pueden usar otros ácidos como intermedios en la preparación de los compuestos de la presente invención y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Para la purificación, el anillo E (el anillo lactona) se puede abrir con un metal alcalino, tal como hidróxido de sodio o hidróxido de calcio, para formar análogos de anillo E abierto de los compuestos de fórmula (1) como se ha mencionado para los compuestos de fórmula (2). Los intermedios obtenidos de esta forma son más solubles en agua y pueden ser purificados para producir, después de tratamiento con un ácido, una forma purificada de los análogos de la camptotecina de la presente invención.

El anillo E también puede modificarse para producir análogos de los compuestos de fórmula (1) con diferentes perfiles de solubilidad en agua o en otros disolventes. Los métodos para obtener este objetivo incluyen abrir el anillo E con un hidróxido o un grupo amino soluble en agua o funcionalizar el grupo hidroxilo en la posición 20 del anillo E con un grupo soluble en agua, tal como un grupo polietilenglicol o un grupo acilo. Dichos grupos pueden ser introducidos bien en el derivado de la homocamptotecina o bien en una etapa anterior de la síntesis. Los análogos preparados de esta forma actúan como pro-fármacos. En otras palabras, estos análogos regeneran los compuestos de fórmula (1) (con la estructura de anillo E cerrado) cuando se administran a un organismo vivo. Véase Greenwald, R. B. *et al.*, *J. Med. Chem.* 39: 1938 (1996). Los alquil ésteres resultantes de la acilación en el C20, por ejemplo, producirán pro-fármacos más lipófilos que no pueden hidrolizarse hasta que el grupo alquilo sea escindido enzimáticamente.

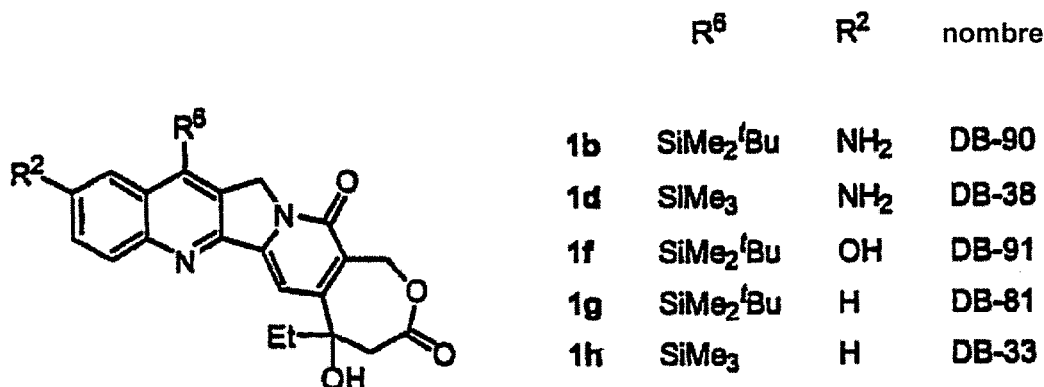
Los compuestos de fórmula (1) pueden usarse en un método de tratamiento de un paciente que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (1) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. El compuesto puede administrarse, por ejemplo, a un paciente que padece cáncer y/o leucemia. Los compuestos de la presente invención también pueden actuar como agentes antivirales (por ejemplo anti-VIH) y agentes antiparasitarios. Los compuestos de fórmula (1) pueden ser administrados por cualquier vía convencional de administración, incluyendo por vía intravenosa, intramuscular, oral, subcutánea, intratumoral, intradérmica y parenteral. La cantidad farmacéuticamente eficaz o dosis está preferiblemente entre 0,01 y 60 mg de uno de los compuestos de fórmula (1) por kg de peso corporal. Más preferiblemente, la cantidad farmacéuticamente eficaz o dosis está preferiblemente entre 0,1 mg y 40 mg de uno de los compuestos de fórmula (1) por kg de peso corporal. En general, una cantidad farmacéuticamente eficaz o dosis contiene una cantidad de uno de los compuestos de fórmula (1) eficaz para que presente un comportamiento antileucémico, antitumoral (anticanceroso), antiviral y/o antiparasitario. Las composiciones farmacéuticas que contienen como ingrediente activo uno de los compuestos de fórmula (1), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, asociado con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable también están dentro del alcance de la presente invención.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los compuestos de fórmula (1) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede contener, por ejemplo, entre 0,1 mg y 3 g, y preferiblemente entre aproximadamente 0,1 mg y 500 mg de los compuestos de fórmula (1) y puede estar constituido en cualquier forma adecuada para el modo de administración.

Las modificaciones estructurales de la presente invención se encontraron para evitar el enlace de alta afinidad entre la forma carboxilato de un análogo de la camptotecina y la HSA, favoreciendo al mismo tiempo las interacciones de la lactona con los eritrocitos. Una consideración adicional en el diseño de camptotecinas estables en el plasma y la sangre se refiere a la estructura del anillo E. Las camptotecinas modificadas en los anillos A, B, E o en B, E de la presente invención: 1) presentan una estabilidad aumentada en presencia de la HSA mediante la eliminación o minimización del enlace altamente preferente de la HSA con la forma carboxilato sobre la forma lactona; 2) presentan niveles elevados de lipofilia que favorecen asociaciones reversibles de las formas lactona de los fármacos con los glóbulos rojos sanguíneos, retardando y restringiendo de esta forma la extensión de la hidrólisis del fármaco; y 3) presentan una estabilidad mejorada en disolución acuosa.

Se ha descubierto además que los nuevos derivados de la homocamptotecina sustituidos con sililo y estables en sangre (denominados en la presente memoria silatecanos u homosilatecanos (hST) con β -hidroxilactona) de la presente invención se pueden preparar mediante una modificación significativa de un enfoque de síntesis total expuesto en la solicitud de patente estadounidense N° 09/212.178, titulada CAMPTOTHECIN ANALOGS AND METHODS OF PREPARATION THEREOF y presentada el 15 de diciembre de 1998 y en la solicitud de patente estadounidense N° 09/007.872, titulada NOVEL INTERMEDIATES IN THE SYNTHESIS OF CAMPTOTHECIN AND RELATED COMPOUNDS AND SYNTHESIS THEREOF y presentada el 15 de enero de 1998. Se sintetizaron nuevos intermedios para realizar la anulación en cascada de radicales de la presente invención.

Se estudiaron extensamente varios compuestos modelo de la presente invención, descritos en la fórmula siguiente:



Las homocamptotecinas de la presente invención contienen modificaciones en los anillos A,B o B que disminuyen el enlace preferencial con el carboxilato sobre la lactona de la albúmina humana. Estas modificaciones en los anillos A, B también aumentan de forma importante la lipofilia y favorecen asociaciones de la lactona con las capas dobles de lípidos presentes en la sangre. Los nuevos compuestos también contienen un anillo E de β -hidroxilactona expandido que mejora la estabilidad global de los agentes sin pérdida de potencia. En ensayos de citotoxicidad usando células de cáncer de mama MDA-MB-435, los silatecanos con β -hidroxilactona de anillo E expandido de la presente invención presentaron valores de IC_{50} en el intervalo de 2 a 115 nM. Los compuestos de la presente invención (varios de los cuales se describen en la fórmula anterior), como resultado de sus nuevas sustituciones estructurales, tienen estabilidades en plasma humano y en sangre humana superiores que los agentes descritos por Laverne *et al.*

La síntesis de las camptotecinas con anillos A,B,E modificados y con anillos B,E modificados de la presente invención ha llevado a la identificación de las camptotecinas más estables en sangre que presentan todavía una potencia intrínseca para ser identificadas. Un beneficio adicional de estos nuevos agentes es que no presentan ninguna variación significativa interespecies en las estabilidades en sangre, tales como las de la 9-AC y la camptotecina descritas en el documento Mi, Z. y Burke, T. G. "Marked Interspecies Variations Concerning the Interactions of Camptothecin with Serum Albumins: A Frequency-Domain Fluorescence Spectroscopic Study", *Biochemistry*, 33: 12540-12545 (1994). Esta característica muy interesante debería facilitar de forma importante el proceso de desarrollo de fármacos y la traducción de las observaciones experimentales y patrones de dosificación desarrollados en los modelos animales a los ensayos clínicos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la síntesis de los precursores para las reacciones en cascada de radicales.

Las figuras 2a y 2b muestran la síntesis de nuevos derivados de homocamptotecina/homosilatecano con anillo AB modificado.

La figura 3 muestra los espectros de emisión de fluorescencia típicos para un homosilatecano (7-trimetilsilil-10-aminohomocamptotecina (DB-38) 1 μM) en presencia y en ausencia de membranas de capas dobles de lípidos.

La figura 4 muestra una comparación del enlace de equilibrio de cuatro nuevos homosilatecanos con SUVs (del inglés: *small unilamellar vesicles*: vesículas unilamelares pequeñas) compuestas por dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) neutra en PBS, así como con los datos obtenidos para la camptotecina (CPT) y el topotecano (TPT).

La figura 5 presenta la considerable dependencia de los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-t-butildimetilsilil-10-hidroxi homocamptotecina (DB-91) 1 μM en presencia de agua.

La figura 6 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-t-butildimetilsilil-10-hidroxicamptotecina (DB-91) 1 μM en disoluciones de suero salino tamponado con fosfato (PBS) a pH 7,4 y en PBS a pH 7,4 que contenía glóbulos rojos sanguíneos sin albúmina a una concentración de $(10 \pm 1) \times 10^6$ células/ μL .

La figura 7 muestra los espectros de emisión de fluorescencia del compuesto de la técnica anterior 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN-38) en disoluciones de suero salino tamponado con fosfato (PBS) a pH 7,4 y en PBS a pH 7,4 que contenía glóbulos rojos sanguíneos sin albúmina a una concentración de $(10 \pm 1) \times 10^6$ células/ μL .

La figura 8 muestra la dependencia con el pH de la estabilidad de la 7-dimetilsilil-homocamptotecina (DB-38) 1 μM en disoluciones de suero salino tamponado con fosfato (PBS) a valores de pH de 5,0, 7,4, 8,0 y 9,0 determinada usando métodos de HPLC.

La figura 9 muestra la dependencia con el pH de la estabilidad de la 7-t-butil-dimetilsililhomocamptotecina (DB-81) 1 μ M en disoluciones de suero salino tamponado con fosfato (PBS) a valores de pH de 5,0, 7,4, 8,0 y 9,0 determinada usando métodos de HPLC.

La figura 10 muestra la dependencia con el pH de la estabilidad de la 7-t-butildimetilsilil-10-aminohomocamptotecina (DB90) 1 μ M en disoluciones de suero salino tamponado con fosfato (PBS) a valores de pH de 5,0, 7,4, 8,0 y 9,0 determinada usando métodos de HPLC.

La figura 11 muestra la dependencia con el pH de la estabilidad de la 7-t-butildimetilsilil-10-hidroxihomocamptotecina (DB91) 1 μ M en disoluciones de suero salino tamponado con fosfato (PBS) a valores de pH de 5,0, 7,4, 8,0 y 9,0 determinada usando métodos de HPLC.

La figura 12 muestra las estabilidades mejoradas de cuatro nuevos homosilatecanos de la presente invención en disolución de PBS, determinadas usando métodos de HPLC.

La figura 13 muestra las estabilidades mejoradas de cuatro nuevos homosilatecanos de la presente invención en PBS/HSA, determinadas por métodos de HPLC.

La figura 14 muestra las estabilidades en plasma humano de cuatro nuevos homosilatecanos de la presente invención, determinadas usando métodos de HPLC.

La figura 15 muestra las estabilidades de cuatro nuevos homosilatecanos de la presente invención en suspensiones de PBS que contenían concentraciones fisiológicamente importantes $[(5 \pm 1) \times 10^6 \text{ células}/\mu\text{L}]$ de glóbulos rojos sanguíneos sin albúmina.

La figura 16 muestra las estabilidades mejoradas en sangre humana de cuatro nuevos homosilatecanos de la presente invención, determinadas usando métodos de HPLC.

La figura 17 muestra las estabilidades mejoradas en sangre humana de cuatro nuevos homosilatecanos de esta invención con respecto a agentes clínicamente importantes de la técnica anterior que incluyen la 9-aminocamptotecina (9AC), la camptotecina (CPT), el topotecano (TPT) y el SN-38.

Descripción detallada de la invención

Método de preparación

Los compuestos de la fórmula 1 de la presente invención se pueden preparar según los esquemas de síntesis esquematizados en las figuras 1 y 2. La figura 1 muestra la síntesis de una yodopiridona 9 clave que se puede usar para elaborar los compuestos de la fórmula 1. La síntesis de 9 comienza a partir del enol éter 3, un intermedio en la síntesis de la camptotecina y sus análogos. Véase la solicitud de patente estadounidense N° 09/007.872. La dihidroxilación seguida por escisión oxidante proporciona el cetoformato 5 que se extiende a continuación mediante una reacción de Reformatsky para dar 6. De forma conveniente, el grupo formilo se escinde en esta reacción, una escisión favorecida por un ácido del t-butil éster produce directamente la β -hidroxilactona 7. Este compuesto se convierte a continuación en la yodopiridona 9 mediante una secuencia de 1) desililación yodante y 2) desmetilación.

La figura 2a muestra la conversión de la yodopiridona 9 en varios derivados modelo de homocamptotecina modificados en AB. La N-propargilación de 9 en condiciones optimizadas proporciona los precursores radicalicos 10a,b. Las anulaciones de radicales en cascada de estos precursores con los isonitrilos indicados dan los productos 1a, c, e, g, h. Los productos 1a, c, e se desprotegen a continuación por medios convencionales para proporcionar los candidatos a fármacos diana 1b, d, f con los rendimientos totales indicados. Los compuestos 1g y 1h no necesitan desprotección. La síntesis de nuevos compuestos adicionales de la presente invención se describe en la sección de Ejemplos de la presente solicitud.

Lavergne y colaboradores describen dos vías para elaborar derivados del homosilatecano, pero ambas tienen limitaciones importantes. La primera implica la conversión de un derivado de camptotecina estándar en un derivado de la homocamptotecina mediante una serie de etapas que implican el desmontaje de la lactona normal y el nuevo ensamblaje de la lactona homologada. Esta vía está limitada porque requiere que exista una camptotecina para empezar. Además, muchos de los derivados de la camptotecina existentes llevan sustituyentes de los que no se esperaría que sobrevivan en las severas condiciones de la formación de la lactona. Este procedimiento necesita las etapas de reducción, oxidación, ácido fuerte y base fuerte. La segunda vía implica una síntesis total usando una ciclación catalizada con paladio para formar el anillo C. Esta vía está limitada por la disponibilidad de precursores del anillo A y por la capacidad de sus sustituyentes para sobrevivir durante las varias etapas subsiguientes de la síntesis. Además, la síntesis no parece ofrecer la posibilidad de introducir muchos sustituyentes en el anillo B, incluyendo los sustituyentes descritos en la presente memoria.

Por el contrario, los esquemas de síntesis en cascada de radicales de la presente invención son mucho más tolerantes y flexibles y se pueden usar para obtener derivados de la homocamptotecina con muchos perfiles de sustitución en A, B o A/B, como se muestra, por ejemplo, en la figura 2b. Generalmente, se pueden usar varios reactivos en la cascada

de radicales incluyendo hexametil-diastaño, hexametildisilano o tetrakis(trimetilsilil)silano. La fuente de energía para esta reacción puede ser una lámpara solar o una lámpara de ultravioleta. La temperatura se ajusta preferiblemente entre aproximadamente 25 y 150°C. Más preferiblemente, la temperatura se ajusta a aproximadamente 70°C. Generalmente no hay limitaciones sobre la elección del disolvente usado, aparte de que sea inerte frente a la cascada de radicales.

Los disolventes preferidos incluyen benceno, tolueno, benzonitrilo, acetronitrilo, THF y ter-butanol. Además, hay una gran libertad en la elección de los sustituyentes del alquino (R^6) y el isonitrilo (R^1 - R^4) en los esquemas de síntesis de la presente invención debido a la suavidad de las condiciones de reacción. Además, en los casos raros en los que los derivados del propargilo no se preparen fácilmente, se pueden sustituir por derivados de alilo en su lugar y se forman los mismos productos finales, aunque con un menor rendimiento.

El sustituyente en C20 (R^5) también se puede variar ampliamente ya que se obtiene a partir de alcoholes alílicos fácilmente disponibles. También se pueden usar ésteres sustituidos en la reacción de Reformatsky para proporcionar compuestos con sustituyentes en C20a (R^{13}). Aunque los compuestos de esta invención pueden usarse en forma racémica para quimioterapia, es más preferible usar muestras que sean exclusivamente o predominantemente el enantiómero biológicamente activo en C20. Debido a un cambio de prioridades en las Reglas de Cahn-Ingold-Prelogs para la asignación de la configuración absoluta, el enantiómero S en C20 de una camptotecina estándar generalmente tiene la misma configuración relativa que el enantiómero R en C20 de la homocamptotecina correspondiente. Las muestras racémicas o enantioméricamente enriquecidas de los derivados de la homocamptotecina se pueden separar en sus componentes individuales por métodos convencionales de cromatografía líquida, usando columnas quirales disponibles comercialmente. Véase Lavergne, O. *et al.* "Homocamptothecins: Synthesis and Antitumor Activity of Novel E-Ring Modified Camptothecin Analogs", *J. Med. Chem.* 41, 5410-5419 (1998).

Estabilidades en sangre humana de las camptotecinas y bases para el diseño racional de homosilatanos estables en sangre con elevada potencia

Recientemente, las emisiones fluorescentes intrínsecas de las formas lactona y carboxilato de la camptotecina y sus análogos relacionados han sido estudiadas con el fin de aclarar sus interacciones considerablemente diferentes con los componentes de la sangre humana. Burke, T. G. y Mi, Z. "Ethyl substitution at the 7 position extended the half-life of 10-hydroxycamptothecin in the presence of human serum albumin", *J. Med. Chem.* 36: 2580-2582 (1993); Burke, T. G., Mishra, A. K., Wani, M. y Wall, M. "Lipid Bilayer Partitioning and Stability of Camptothecin Drugs", *Biochemistry*, 32: 5352-5364 (1993); Burke, T. G. y Mi, Z. "Preferential Binding of the Carboxylate Form of Camptothecin by Human Serum Albumin", (1993a) *Anal. Biochem.* 212, 285-287; Burke, T. G. y Mi, Z. "The Structural Basis of Camptothecin Interactions with Human Serum Albumin: Impact on Drug Stability" (1994), *J. Med. Chem.* 37: 40-46; Burke, T. G., Munshi, C. B., Mi, Z. y Jiang, Y. "The Important Role of Albumin in Determining the Relative Human Blood Stabilities of the Camptothecin Anticancer Drugs", (1995) *J. Pharma. Sci.* 84: 518-519; Mi, Z. y Burke, T. G. "Differential Interactions of Camptothecin Lactone and Carboxylate Forms with Human Blood Components", (1994a), *Biochemistry* 33: 10325-10336; Mi, Z. y Burke, T. G. "Marked Interspecies Variations Concerning the Interactions of Camptothecin with Serum Albumins: A Frequency-Domain Fluorescence Spectroscopic Study", (1994b) *Biochemistry* 33: 12540-12545; y Mi, Z., Malak, H. y Burke, T. G. "Reduced Albumin Binding Promotes the Stability and Activity of Topotecan in Human Blood", (1995) *Biochemistry* 34:13722-13728.

En suero salino tamponado con fosfato (PBS) a pH 7,4, la espectroscopia de la persistencia de la fluorescencia en el dominio de la frecuencia revela que la albúmina de suero humano (HSA) se enlaza preferentemente con la forma carboxilato de la camptotecina con una afinidad 200 veces mayor que la de la forma lactona. Estas interacciones hacen que la camptotecina se abra más rápida y completamente en presencia de la HSA que en ausencia de la proteína. En el plasma humano, pH 7,4 y 37°C, la lactona de la camptotecina se abre rápida y totalmente a la forma carboxilato con un valor del $t_{1/2}$ de 11 minutos y un porcentaje casi despreciable de lactona con un valor de equilibrio de 0,2%. En la sangre total frente al plasma, la camptotecina presentó una estabilidad aumentada (valor de $t_{1/2}$ de 22 minutos y un porcentaje de lactona con un valor de equilibrio de 5,3%). Se encontró que la estabilidad aumentada de la lactona de la camptotecina en la sangre humana es un resultado de las asociaciones del fármaco con las capas dobles de lípidos de los glóbulos rojos sanguíneos. La camptotecina se enlaza con las membranas de eritrocito, el fármaco se localiza en la región de la cadena acilo y, consecuentemente, permanece protegida de la hidrólisis.

También se han comparado las estabilidades en la sangre humana de los distintos análogos de la camptotecina de interés clínico. Como se observó en el caso de la camptotecina, se observó que la 9-aminocamptotecina (9-AC) se hidroliza casi completamente (>99%) en disolución de PBS que contiene HSA. Aunque no se intentó cuantificar espectroscópicamente las afinidades de enlace relativas de las formas lactona y carboxilato del análogo 9-amino (debido a los rendimientos cuánticos de fluorescencia significativamente reducido de las especies lactona y carboxilato de la 9-AC con respecto a la camptotecina), los datos de HPLC fueron consistentes con el enlace preferencial de la HSA con la forma carboxilato de este agente frente a su forma lactona. En el plasma se observó que >99,5% del análogo 9-amino de la camptotecina se convirtió en carboxilato, un descubrimiento que de nuevo es muy semejante a los datos de estabilidad obtenidos usando la camptotecina. En sangre total, <0,5% y 5,3% son las fracciones de 9-aminocamptotecina y camptotecina, respectivamente, que permanecieron en la forma lactona en equilibrio. El nivel aproximadamente 10 veces mayor de lactona que queda en equilibrio para la camptotecina con respecto a la 9-aminocamptotecina puede ser en parte explicado por la lipofilia aumentada y la mayor capacidad de la camptotecina para la transición desde el medio acuoso y dentro de las membranas de eritrocito presentes en la sangre total.

En contraste con los bajos niveles de lactona que permanecen en equilibrio en la sangre humana total para la camptotecina y la 9-aminocamptotecina (< 0,5% y 5,3%, respectivamente), el topotecano (11,9%), la CPT-11 (21,0%) y el SN-38 (19,5%) presentan todas estabildades en sangre aumentadas. Mientras que los niveles de lactona en el equilibrio para el topotecano son 20 veces mayores que los de la 9-aminocamptotecina, los niveles de lactona correspondientes para la CPT-11 y el SN-38 son aproximadamente 40 veces mayores que en el caso de la 9-aminocamptotecina. Los aumentos significativos en las estabildades relativas del topotecano, la CPT-11 y el SN-38 se pueden correlacionar con sus interacciones favorables con la HSA. Se cree que los sustituyentes estructurales en las posiciones 7 y 9 dificultan y evitan el enlace preferencial de las formas carboxilato del fármaco con la HSA. Recientemente se ha usado la técnica de anisotropía de fluorescencia resuelta temporalmente para demostrar que, en condiciones experimentales en las que el carboxilato de la camptotecina se asocia con la HSA y pasa a la disolución estrechamente asociado con la proteína, las formas carboxilato del topotecano y la CPT-11 no se asocian con la HSA. En el caso del SN-38, se han obtenido evidencias espectroscópicas directas que indican que la HSA se enlaza preferentemente con la forma lactona de este agente, desplazando de este modo el equilibrio lactona-carboxilato hacia la lactona.

Estas observaciones indican que la HSA tiene un papel importante en la determinación de las estabildades relativas en la sangre humana de las camptotecinas. En los casos de la camptotecina y la 9-aminocamptotecina, la proteína actúa como un sumidero para la forma carboxilato del fármaco, enlazándose con la especie de anillo abierto y desplazando de este modo el equilibrio lactona-carboxilato hacia la derecha. Sin embargo, en los casos del topotecano, la CPT-11 y el SN-38, no se ha observado dicho enlace preferencial de la forma carboxilato del fármaco con la HSA. En oposición a la situación de la camptotecina y su análogo 9-amino, la HSA se enlaza preferentemente a la forma lactona del SN-38 que favorece de este modo mayores niveles circulatorios de esta especie biológicamente activa.

La rápida y extensa pérdida de fármaco activo que se produce con las camptotecinas clínicamente importantes indica que sería muy ventajoso identificar camptotecinas con estabildades aumentadas en sangre humana.

En los estudios presentes, se modificó la camptotecina en los anillos A y B con el efecto de: 1) reducir el enlace a la proteína; 2) aumentar la lipofilia; y 3) producir tanto una reducción concomitante del enlace del carboxilato a la albúmina humana como también aumentar la lipofilia. También se incluyó un anillo E expandido en el diseño de los compuestos presentes. Estos estudios han llevado al diseño de nuevas camptotecinas con anillos A, B, E modificados que son los análogos de la camptotecina más estables en sangre e intrínsecamente potentes que han sido identificados hasta ahora, con parámetros de estabilidad en sangre que superan al compuesto homocamptotecina de la técnica anterior, así como de los análogos de la camptotecina con anillos A,B modificados que contienen un grupo funcional α -hidroxilactona convencional. Los nuevos análogos de la camptotecina de la presente invención presentan propiedades únicas, tales como estabildades en sangre humana superiores en combinación con actividades anticancerosas elevadas.

La valoración por anisotropía de fluorescencia demuestra que los nuevos homosilatecanos de la presente invención presentan un amplio intervalo de constantes de equilibrio de asociación para las vesículas lipídicas y que la expansión del anillo E aumenta la lipofilia de los silatecanos

La figura 3 muestra los espectros de emisión de fluorescencia del DB-38 1 μ M en suero salino tamponado con fosfato (PBS) y capas dobles de lípidos. Los datos indican que después de la introducción de las capas dobles de lípidos en la muestra hay un aumento en la emisión de fluorescencia del compuesto, indicativo de una interacción entre el fármaco y la membrana. Al cambiar el disolvente a etanol, la fluorescencia también cambia. En cada caso, con las membranas hay un considerable aumento en la intensidad de la fluorescencia a medida que el fármaco se distribuye en el medio microscópico de capas dobles de lípidos. En cada caso, hay también un importante desplazamiento hacia el azul, o un desplazamiento en el espectro de emisión hacia longitudes de onda menores después de la interacción del fármaco con la membrana (véase la tabla 1). Los datos espectrales presentados en la figura 3 indican que los homosilatecanos son fluorescentes y que los parámetros espectrales de los fármacos cambian después de la adición de membranas de doble capa de lípidos a las muestras. La tabla 1 mostrada a continuación compara las longitudes de onda de máxima excitación y emisión de los nuevos análogos del homosilatecano. También se examinaron las interacciones de membrana de las formas de anillo abierto del DB-90 y DB-91 y los resultados indican un desplazamiento espectral similar para las especies de anillo abierto.

TABLA 1

Parámetros espectrales de fluorescencia para los homosilatecanos (DB-38, DB-81, DB-90, DB-91) en disolución y enlazados a las SUVs de DMPC y DMPG

Compuesto (S)	Excitación (nm)	Emisión (nm)		
		PBS	DMPC	DMPG
DB-38	410	531	515	517
DB-81	380	452	443	442
DB-90	402	535	513	512
DB-91	394	554	441	426

ES 2 308 977 T3

La naturaleza fluorescente intrínseca de las formas lactona y carboxilato de los homosilatecanos permite emplear el método sensible de valoración de la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario para determinar la fuerza de las interacciones del enlace de los distintos análogos con las capas dobles de lípidos.

- 5 Una medida de la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario (a) está relacionada con la velocidad rotacional de la molécula fluorescente mediante la ecuación de Perrin:

$$a_0/a = 1 + (\tau/\phi)$$

10

donde a_0 es la anisotropía de fluorescencia limitante en ausencia de rotaciones despolarizantes, τ es la vida media del estado excitado y ϕ es el tiempo de correlación rotacional del fluoróforo. La ecuación anterior indica que cambios en los valores bien de τ o bien de ϕ de un compuesto fluorescente pueden modular su anisotropía en estado estacionario.

- 15 Se examinaron los valores de la vida media del estado excitado de la camptotecina en PBS, glicerol y metanol a 37°C. Se determinó que los valores de la vida media eran 4,7 ns, 3,8 ns y 3,5 ns, respectivamente. De forma similar, se midió el valor de la vida media de la camptotecina cuando se asocia con capas dobles de lípidos DMPC a 37°C y se encontró que el valor medio para el fármaco enlazado a la membrana era de 3,7 ns.

- 20 Por lo tanto, las medidas de la vida media descritas anteriormente indican que la vida media de la camptotecina es relativamente insensible frente a las alteraciones en el medio microscópico (por ejemplo, un cambio en el disolvente o en la reubicación del fluoróforo de un medio acuoso a una membrana fosfolipídica). Para un fluoróforo que tiene un valor de τ que permanece relativamente constante durante una transición que impacta fuertemente sobre su movimiento rotacional (tal como un cambio en la viscosidad del disolvente o el enlace del fluoróforo a conjuntos macromoleculares grandes tales como partículas liposómicas), la ecuación de Perrin indica que existirá una relación directa entre a y los valores de ϕ (es decir, cuando el valor de ϕ del compuesto fluorescente aumenta entonces ocurre lo mismo con su valor de la anisotropía en estado estacionario).

- Se ha demostrado que los valores de la anisotropía de la fluorescencia en estado estacionario de los análogos de la camptotecina y de los nuevos homosilatecanos son muy sensibles a la viscosidad del disolvente y a las asociaciones con vesículas lipídicas unilamelares pequeñas. Por ejemplo, el topotecano tiene un valor de a de 0,008 en PBS, pero su valor aumenta 9 veces y 40 veces en los disolventes viscosos octanol y glicerol, respectivamente. Se observa un aumento en 21 veces en el valor de a de la camptotecina después del enlace del fármaco a las vesículas compuestas bien por DMPC o bien por DMPG. Debido a la sensibilidad del valor de a frente a las asociaciones de los fármacos de camptotecina con la membrana, se empleó el método de valoración de la anisotropía de fluorescencia para estudiar el enlace de equilibrio de los análogos de la camptotecina con las capas dobles de lípidos. El experimento incluye la determinación de los valores de a para una serie de muestras en las que la concentración del fármaco en cada uno se mantuvo constante (típicamente 1 ó 2 μM), mientras que la concentración de lípido entre los miembros de una serie se varió de 0 a 0,29M.

40

- Como consecuencia de las brillantes emisiones de fluorescencia de los homosilatecanos nuevamente sintetizados (puede encontrarse un resumen de sus parámetros espectrales en la tabla 1), las isothermas de adsorción de las capas dobles de lípidos resumidas en la figura 4 estaban relativamente libres de cualquier señal de ruido de fondo. Se usó el método de valoración de la anisotropía de la fluorescencia para obtener las isothermas de adsorción. Los experimentos se realizaron con concentraciones de fármaco de 1 μM en disolución tampón de PBS (37°C). Los valores de la anisotropía del DB-38, DB-90 y DB-91 se valoraron mucho más rápidamente que los de la camptotecina o el topotecano, lo que indica que los nuevos homosilatecanos tienen interacciones mucho más fuertes con estas membranas que la camptotecina y el topotecano. Debido al potencial del anillo lactona de los homosilatecanos y camptotecinas para hidrolizarse en PBS, los valores de la anisotropía para cada concentración de lípido se determinaron inmediatamente (aproximadamente 1 minuto) después de la adición de la forma lactona de cada agente a la suspensión de liposomas, para minimizar cualquier posibilidad de conversión a la forma carboxilato. Usando concentraciones de fármaco de 1 μM y filtros de paso largo para aislar la luz emitida de la señal del ruido de fondo (es decir, luz de excitación dispersa señal de fluorescencia residual resultante de la posible presencia de impurezas), los niveles de señal de los fármacos disueltos en disolución tampón de PBS fueron típicamente de 99,97% en ausencia de membrana y mayores de 98% en presencia de membrana. Las isothermas de adsorción se usaron para determinar las constantes de asociación totales para los fármacos de homosilatecano, silatecano y camptotecina. Las constantes de asociación totales se definen como:

$$K = [A_B] / [A_F] [L]$$

60

- donde $[A_B]$ representa la concentración del fármaco enlazado, $[A_F]$ representa la concentración del fármaco libre y $[L]$ representa la concentración de lípido total en la suspensión de vesículas. Esta ecuación es válida cuando la concentración de lípido libre es aproximadamente igual a la concentración total de lípido (es decir, la concentración de lípido libre está en un exceso significativo sobre la concentración de fármaco enlazado). Con tal de que se satisfaga esta condición, la K se puede determinar a partir de la inversa de la pendiente de una gráfica doblemente recíproca. En dicha gráfica doblemente recíproca, se representa $1/(\text{fracción del fármaco enlazado total})$ frente a $1/(\text{concentración de lípido})$, con un valor de la ordenada en el origen de 1 (para un sistema que presente homogeneidad de sitio de enlace). Dichas gráficas doblemente recíprocas para las asociaciones de los nuevos análogos de los homosilatecanos (tanto en

forma lactona como en forma carboxilato) con preparaciones de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) de DMPC y DMPG fueron lineales con buenos coeficientes de correlación. La linealidad de dichas gráficas, así como las gráficas correspondientes a asociaciones de los fármacos con otros tipos de preparaciones de membrana, indican que el enlace del fluoróforo para estas concentraciones de lípido se describe adecuadamente con la ecuación anterior.

Los estudios resumidos en la tabla 2 examinan las bases estructurales de las asociaciones del homosilatecano con las capas dobles de lípidos. Se incluyeron dos tipos de membranas en estos estudios que se realizaron en condiciones de pH y temperatura próximas a las fisiológicas; estas membranas incluyeron L- α -dimiristoilfosfatidil-colina (DMPC) en fase fluida y neutra; y L- α -dimiristoilfosfatidil-glicerol (DMPG) en fase fluida y cargado negativamente. La DMPC y el DMPG tienen la misma longitud de cadena pero las cargas de sus grupos principales difieren.

TABLA 2

Constantes de asociación totales para los homosilatecanos y análogos de la camptotecina que interaccionan con vesículas unilamelares de DMPC neutra y de DMPG cargado negativamente en PBS a pH 7,4 y 37°C

Compuesto	$K_{DMPC} (M^{-1})$	$K_{DMPG} (M^{-1})$
DB-38	1400	800
DB-81	14400	18500
DB-90	8600	9300
DB-91	8000	4300
Forma carboxilato del DB-90	770	80
Forma carboxilato del DB-91	700	100
Topotecano	10	50
Camptotecina	100	100

En los estudios de la tabla 2, se obtuvieron las isotermas de enlace usando el método de valoración de la anisotropía de fluorescencia descrito anteriormente y los valores de K se determinaron a partir de las pendientes de las gráficas doblemente recíprocas. Los valores de K tienen un 10% de incertidumbre. Una de las características más sorprendentes de los datos presentados en la tabla 2 es la fuerte modulación que se puede obtener mediante la creación de camptotecinas modificadas en los anillos A, B, E (por ejemplo, los homosilatecanos denominados DB-38, DB-90 y DB-91) o las camptotecinas modificadas en los anillos B, E (por ejemplo, el homosilatecano denominado DB-81). Se han obtenido homosilatecanos que contienen bien una única sustitución en la posición 7 o bien una sustitución doble en las posiciones 7 y 10 y se ha encontrado que presentan una lipofilia muy elevada. En la tabla 2 se incluyen compuestos de camptotecina (topotecano y camptotecina). Para el DB-81, la lipofilia por las membranas de DMPC aumenta aproximadamente 1.400 veces con respecto al valor correspondiente para el topotecano. Se incluyeron los datos para estos agentes para mostrar la naturaleza altamente lipófila de las nuevas homocamptotecinas con respecto a compuestos tales como el topotecano y la camptotecina. A partir de la tabla 2 es evidente que los compuestos de la presente invención son mucho más lipófilos tanto que la camptotecina como que el topotecano.

Otros descubrimientos interesantes e inesperados son evidentes después de examinar los datos contenidos en la tabla 2. La comparación de los valores de la K_{DMPC} para los dos homosilatecanos con sus correspondientes análogos de silatecano (en los que los sistemas de anillo E son restos β -hidroxilactona frente a restos α -hidroxilactona, respectivamente) indican que las homocamptotecinas presentan una lipofilia mayor. Por ejemplo, los valores de la K_{DMPC} para los silatecanos homólogos del DM-38 (CHJ-792, $K_{DMPC} = 820 M^{-1}$) y del DB-91 (DB-67, $K_{DMPC} = 2.500 M^{-1}$) son aproximadamente de 2 a 3 veces menores que los de los homosilatecanos correspondientes. Por lo tanto, para el DB-38 y el DB-91, el anillo E expandido es una consideración favorable para el enlace con la membrana que, a su vez, favorece la estabilidad del fármaco en la sangre humana.

Se observó otra tendencia sorprendente de los homosilatecanos cuando se estudiaron las formas carboxilato de los fármacos. Previamente se había observado una disminución de 3 veces en la afinidad por la DMPC después de la apertura del anillo lactona de la camptotecina. Burke, T. G., Mishra, A. K., Wani, M. y Wall, M. "Lipid Bilayer Partitioning and Stability of Camptothecin Drugs", *Biochemistry*, 32: 5352-5364 (1993). Para las homocamptotecinas DB-90 y DB-91 se ha observado una disminución de 10 veces en el enlace a la DMPC después de la apertura del anillo. Por lo tanto, los homosilatecanos no solo presentan una lipofilia considerablemente aumentada, sino que los niveles de enlace diferencial entre las formas lactona y carboxilato son significativamente mayores (10 veces frente a 3 veces) con respecto a las camptotecinas que contienen sistemas de anillo α -hidroxilactona. Las dos consideraciones descritas anteriormente (elevada lipofilia y mayor enlace diferencial de la forma lactona sobre la forma carboxilato) son factores que contribuyen a las estabilidades en sangre optimizadas que presentan los homosilatecanos sobre la camptotecina y la homocamptotecina.

Evaluación espectral por fluorescencia directa de las extensas interacciones de membrana del homosilatecano DB-91 con los glóbulos rojos de la sangre

La figura 5 presenta los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-t-butildimetilsilil-10-hidroxi-homocamptotecina (DB-91) 1 μM en disoluciones de suero salino tamponado con fosfato (PBS) a pH 7,4, etanol y sus mezclas. Todos los espectros se registraron usando luz de excitación de 394 nm a 37°C. El máximo de emisión para el DB-91 en PBS es 554 nm, pero este valor se desplaza significativamente hacia una λ_{max} de aproximadamente 410 nm en etanol anhidro. Debido a que el DB-91 contiene un grupo funcional hidroxilo en la posición 10, existe la posibilidad de que la fluorescencia se produzca a partir de dos especies distintas. En un disolvente aprótico o en un medio microscópico no acuoso, predomina una especie protonada (con respecto al grupo funcional hidroxilo en la posición 10), mientras que en disolventes próticos, tales como el agua, predomina un complejo de estado excitado desprotonado. El pico a 554 nm se corresponde con el complejo de estado excitado desprotonado, mientras que la λ_{max} de aproximadamente 410 nm se corresponde con el complejo de estado excitado protonado. La formación del complejo de estado excitado desprotonado se facilita de forma importante por la presencia de agua; incluso para cantidades de agua pequeñas, tales como 1%, se observó un pico a aproximadamente 550 nm que se corresponde con la formación facilitada por el agua del complejo de estado excitado desprotonado. La sensibilidad espectral del DB-91 y otros miembros de la familia de las camptotecinas que contienen un grupo funcional hidroxilo en la posición 10, proporciona un enfoque útil para estudiar la distribución del fármaco desde un medio acuoso a un medio hidrófobo, tal como en la superficie de los glóbulos rojos de la sangre.

La figura 6 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-t-butildimetilsilil-10-hidroxi-homocamptotecina (DB-91) 1 μM en disoluciones de suero salino tamponado con fosfato (PBS) a pH 7,4 y en PBS a pH 7,4 que contenía glóbulos rojos sanguíneos sin albúmina a una concentración de $(10 \pm 1) \times 10^6$ células/ μL y proporciona una evidencia directa de las extensas interacciones de un homosilatecano con los glóbulos rojos de la sangre. Los espectros se recogieron en cubetas de cara frontal (para optimizar la fluorescencia frente a los niveles de dispersión) a 37°C usando una concentración de DB-91 de 10 μM y una luz de excitación de 370 nm.

El máximo de emisión para el DB-91 en PBS es 554 nm. En presencia de glóbulos rojos sanguíneos, se observa un pico con un valor de λ_{max} significativamente inferior, lo que indica que el agente es capaz de distribuirse en las membranas de los glóbulos rojos sanguíneos. Las membranas de los glóbulos rojos sanguíneos proporcionan un medio microscópico hidrófobo en el que los complejos de estado excitado protonados se pueden formar y emitir fluorescencia. La comparación de los espectros de emisión del DB-91 en presencia de eritrocitos humanos con el de la 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN-38) clínicamente importante, como se muestra en la figura 7, indica que hay una formación más extensa de complejo de estado excitado protonado en el caso del DB-91. De forma similar a los estudios de la figura 6, los espectros de la figura 7 se registraron en cubetas de cara frontal a 37°C usando una concentración de SN-38 de 10 μM y una luz de excitación de 370 nm. Estos descubrimientos corroboran los estudios de membrana modelo que indican que el enlace a la membrana de la SN-38 es significativamente menor que las extensas interacciones encontradas para la DB-91 (la SN-38 presenta un valor de K_{DMPC} de 300 M^{-1} , mientras que la DB-91 presenta un valor de K_{DMPC} de 8.000 M^{-1}). De estos estudios espectroscópicos se concluye que el nuevo homosilatecano DB-91 es un agente de interacción con los eritrocitos más lipófilo que el SN-38 aprobado por la FDA.

Los homosilatecanos presentan estabilidades aumentadas en disolución acuosa con respecto a las camptotecinas que contienen farmacóforos de α -hidroxilactona

Las figuras 8 a 11 muestran la dependencia con el pH de la estabilidad de disoluciones 1 μM del DB-38, DB-81, DB-90 y DB-91 en disoluciones de suero salino tamponado con fosfato (PBS) para valores de pH de 5,0, 7,4, 8,0 y 9,0. Los parámetros de estabilidad de cada fármaco se determinaron usando métodos de HPLC. Todos los experimentos se realizaron a 37°C. Se observó hidrólisis a los valores de pH de 7,4, 8,0 y 9,0, observándose una hidrólisis más extensa a mayores valores de pH.

Aunque se observó hidrólisis a valores de pH de 7,4, 8,0 y 9,0, los datos indican que el anillo lactona de los homosilatecanos es menos lábil (es decir, se produce la hidrólisis significativamente más despacio), con respecto tanto a los silatecanos como a las camptotecinas que contienen el resto de anillo α -hidroxilactona convencional.

La figura 12 compara las estabilidades aumentadas de cuatro nuevos homosilatecanos de la presente invención con las correspondientes estructuras de silatecano que contienen el grupo funcional α -hidroxilactona. Todos los experimentos de la figura 12 se realizaron en PBS a 37°C. Las divisiones A a D contienen cada una los perfiles de estabilidad de un nuevo homosilatecano (círculos vacíos) y su correspondiente silatecano (círculos sólidos) que contiene el resto de anillo α -hidroxilactona convencional encontrado en la camptotecina y otros análogos de la camptotecina clínicamente importantes, tales como el topotecano, el SN-38, la CPT-11 y la 9-aminocamptotecina.

En todos los casos, los agentes que contienen el anillo E expandido o las estructuras de homosilatecano presentan una estabilidad considerablemente aumentada. Los parámetros de estabilidad para los homosilatecanos se resumen en la tabla 3. Los datos indican que el anillo lactona de los homosilatecanos es menos lábil (es decir, se produce la hidrólisis significativamente más despacio), con respecto al resto de anillo α -hidroxilactona contenido tanto en los silatecanos como en las camptotecinas. Para los silatecanos y las camptotecinas, tales como el topotecano y la camptotecina, aproximadamente 12% de la lactona permanece en el equilibrio después de 3 horas, mientras que más del 80% de la lactona permanece para cada uno de los homosilatecanos en idénticas condiciones de incubación.

Determinación de las estabilidades superiores de los homosilatecanos en presencia de albúmina de suero humano

La figura 13 muestra las estabilidades mejoradas de cuatro nuevos homosilatecanos de la presente invención después de incubación en PBS que contenía 30 mg/mL de albúmina de suero humano a 37°C. Las divisiones A a D contienen cada una los perfiles de estabilidad de un nuevo homosilatecano y su correspondiente silatecano que contiene el resto de anillo α -hidroxilactona convencional encontrado en la camptotecina y otros análogos de la camptotecina clínicamente importantes, tales como el topotecano, el SN-38, la CPT-11 y la 9-aminocamptotecina. En todos los casos, los agentes que contienen estructuras de anillo E expandido presentaron estabilidades considerablemente aumentadas en presencia de la HSA. Los parámetros de estabilidad para los homosilatecanos se resumen en la tabla 3. Como se muestra en la figura 14, los homosilatecanos de la presente invención también presentan estabilidades superiores en plasma humano que las camptotecinas, tales como el topotecano, el SN-38 y la CPT-11. De los homosilatecanos, el DB-81 presenta la mayor estabilidad en plasma humano, seguido por el DB-90 y el DB-91, presentando el DB-38 (el menos lipófilo de los homosilatecanos estudiados) la menos estabilidad en plasma humano. Todos los experimentos de la figura 14 se realizaron en plasma humano a 37°C. Las muestras de plasma se airearon continuamente mediante una corriente de gases sanguíneos que produjeron el mantenimiento del pH a valores de $7,5 \pm 0,1$. En todos los casos, los agentes que contienen el anillo E expandido o las estructuras de homosilatecano presentaron una estabilidad considerablemente aumentada con respecto a los fármacos de camptotecina precursores que contienen el resto de anillo α -hidroxilactona convencional. Los parámetros de estabilidad para los homosilatecanos se resumen en la tabla 3.

Estos estudios demuestran que tanto los homosilatecanos lipófilos como los más solubles en agua presentan estabilidades aumentadas con respecto a la homocamptotecina que no contiene sustituciones en los anillos A y B. Véase Laverigne *et al.* "Homocamptothecins: Synthesis and Antitumor Activity of Novel E-Ring Modified Camptothecin Analogs", *J. Med. Chem.* 41, 5410-5419 (1998). Por lo tanto, la presente invención indica que la sustitución de los anillos A y B de la homocamptotecina es un factor favorable con respecto a las estabilidades en sangre. La explicación probable es que el carboxilato de la homocamptotecina no sustituida, como el carboxilato de la camptotecina, se enlaza con la HSA preferentemente en forma carboxilato y desplaza efectivamente el equilibrio lactona-carboxilato hacia la derecha.

Estos resultados indican que se puede obtener una estabilidad en plasma humano aumentada de forma importante combinando el farmacóforo β -hidroxilactona con los siguientes cambios estructurales concomitantes: 1) modificación del anillo B, tal como con un grupo funcional sililo o sililalquilo en la posición 7 (por ejemplo, DB-81); modificación del anillo A, tal como las modificaciones estructurales contenidas en el topotecano (cambios que aumentan la solubilidad en agua como la inclusión de grupos funcionales dimetilaminometilo en posición 9 e hidroxilo en posición 10 desfavorecen el enlace del carboxilato a la HSA); y 3) sustitución combinada en ambos anillos A y B, que incluye, por ejemplo un sustituyente sililo o sililalquilo en la posición 7 (por ejemplo, DB-90 y DB-91). Véase también Mi, Z., Malak, H. y Burke, T. G. "Reduced Albumin Binding Promotes the Stability and Activity of Topotecan in Human Blood", *Biochemistry*, 34:13722-13728 (1995). Los compuestos del último ejemplo presentan una lipofilia elevada e interacciones específicas pequeñas entre la forma carboxilato del fármaco y la HSA, contribuyendo ambos factores a una estabilidad en plasma aumentada.

Estabilidades considerablemente aumentadas de los nuevos homosilatecanos en la sangre humana

La figura 15 muestra las estabilidades de cuatro nuevos homosilatecanos de la presente invención en suspensiones de PBS que contenían concentraciones fisiológicamente importantes [$(5 \pm 1) \times 10^6$ células/ μ L] de glóbulos rojos sanguíneos sin albúmina. Las características de estabilidad se determinaron a 37°C usando métodos de HPLC. En todos los casos, los agentes que contienen el anillo E expandido o estructuras de homosilatecano presentan estabilidades considerablemente aumentadas en presencia de glóbulos rojos sanguíneos con respecto a los valores publicados en la bibliografía para los análogos de la camptotecina que contienen el resto de anillo α -hidroxilactona convencional (tales como los agentes clínicamente importantes SN-38, 9-aminocamptotecina, 9-nitrocamptotecina, GI-147211C, topotecano, etc.). Los parámetros de estabilidad para los homosilatecanos se resumen en la tabla 3.

La figura 16 y la figura 17 muestran las estabilidades mejoradas en sangre humana de cuatro nuevos homosilatecanos de la presente invención. Todos los experimentos se realizaron a pH 7,4 y 37°C. En la figura 16, las divisiones A a D contienen cada una los perfiles de estabilidad de un nuevo homosilatecano (círculos vacíos) y su correspondiente silatecano (círculos sólidos) que contiene el resto de anillo α -hidroxilactona convencional encontrado en la camptotecina y otros análogos de la camptotecina clínicamente importantes, tales como el topotecano, el SN-38, la CPT-11 y la 9-aminocamptotecina y también agentes experimentales. En todos los casos, los agentes que contienen el anillo E expandido o estructuras de homosilatecano presentan estabilidades en sangre humana considerablemente aumentadas con respecto a los análogos de la camptotecina, tales como el topotecano y el SN-38. La figura 17 muestra las estabilidades mejoradas en sangre humana de los nuevos homosilatecanos de la presente invención en comparación con agentes clínicamente importantes actuales, incluyendo la 9-aminocamptotecina (9AC), la camptotecina (CPT), el topotecano (TPT) y el SN-38 (SN38). Los parámetros de estabilidad de las figuras 16 y 17 se resumen en la tabla 3.

Los valores de estabilidad en sangre humana observados para el DB-81, DB-90 y DB-91 son los mayores medidos hasta ahora para un análogo de la camptotecina intrínsecamente potente. Los valores de lactona mayores que 80% después de 3 horas de incubación se comparan muy favorablemente con respecto a los correspondientes niveles de porcentaje de lactona en sangre humana total para la 9-aminocamptotecina (aproximadamente 0,3%), la camptotecina (aproximadamente 6%), el topotecano (aproximadamente 15%), la CPT-11 (aproximadamente 21,0%) y el SN-38 (aproximadamente 30%).

ES 2 308 977 T3

TABLA 3

Resumen de los parámetros de estabilidad en sangre humana para los homosilatecanos

NOMBRE DEL FÁRMACO Y FLUIDO	TIEMPO DE INCUBACIÓN (horas)	% DE LACTONA
DB-38		
Sangre total	3	56,4 ± 0,6
HSA	3	81,4 ± 0,3
	24	34,1 ± 2,2
PBS	3	82,8 ± 0,7
	24	26,8 ± 2,3
Plasma	3	40,3 ± 2,1
RBC	3	84,8 ± 1,5
	24	39,4 ± 1,2
DB-81		
Sangre total	3	86,6 ± 0,5
	24	27,0 ± 2,3
HAS	3	88,1 ± 0,2
	24	42,5 ± 1,6
PBS	3	84,9 ± 0,3
	24	30,9 ± 2,0
Plasma	3	85,0 ± 4,3
RBC	3	92,0 ± 0,0
	24	55,8 ± 1,7
DB-90		
Sangre total	3	85,2 ± 0,7
	24	24,6 ± 1,3
HSA	3	86,8 ± 0,2
	24	42,0 ± 2,7
PBS	3	83,7 ± 0,5
	24	26,1 ± 1,0
Plasma	3	71,1 ± 3,5
RBC	3	85,5 ± 0,4
	24	38,5 ± 1,4
DB-91		
Sangre total	3	84,9 ± 0,3
	24	37,1 ± 1,8
HAS	3	82,9 ± 0,3
	24	33,2 ± 3,0
PBS	3	83,1 ± 0,3
	24	32,2 ± 1,0
Plasma	3	61,5 ± 3,9
RBC	3	88,5 ± 0,2
	24	42,6 ± 2,6

Los nuevos homosilatecanos de la presente invención superan las considerables variaciones interespecies con respecto a las estabilidades en sangre que se han observado en el pasado para las camptotecinas clínicamente importantes, tales como la 9-aminocamptotecina, la 9-nitrocamptotecina y la camptotecina

La camptotecina y la 9-aminocamptotecina, reconocidos agentes anticancerosos por su nuevo mecanismo de acción y sobresaliente actividad *in vivo* en muridos, solo han demostrado hasta el momento una utilidad terapéutica moderada frente a cánceres humanos. Los fármacos contienen el resto de anillo lactona que, a pH 7,4, se hidroliza para producir formas carboxilato biológicamente inactivas. La comparación de las estabilidades del fármaco para la 9-aminocamptotecina revela que la apertura del anillo se produjo en una extensión mucho mayor en sangre humana que en sangre de

ratón (véase la tabla 4). La camptotecina ha mostrado previamente un comportamiento similar. Burke, T. G., Munshi, C. B., Mi, Z. y Jiang, Y. "The Important Role of Albumin in Determining the Relative Human Blood Stabilities of the Camptothecin Anticancer Drugs", *J. Pharma. Sci.* 84: 518-519 (1995); y Mi, Z. y Burke, T. G. "Marked Interspecies Variations Concerning the Interactions of Camptothecin with Serum Albumins: A Frequency-Domain Fluorescence Spectroscopic Study", *Biochemistry*, 33: 12540-12545 (1994). Se ha utilizado la técnica de análisis espectroscópico en multifrecuencia con modulación de fase de las emisiones intrínsecas de fluorescencia de la lactona y el carboxilato de la camptotecina para proporcionar una explicación física de la extensa apertura del anillo observada para la camptotecina y la 9-aminocamptotecina en presencia de albúmina de suero humano (HSA). LA HSA presenta una preferencia de enlace 200 veces mayor para el carboxilato ($K = 1,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) con respecto a la lactona ($K = 5,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$). Se encontró que las albúminas de suero de otras especies no se enlazan al carboxilato de la camptotecina tan fuertemente como la HSA. Debido a que la capacidad única de la albúmina humana para enlazarse al carboxilato de la camptotecina y al carboxilato de la 9-aminocamptotecina produce una extensa conversión del fármaco a su forma biológicamente inactiva, evidencia que el éxito de estos agentes en la erradicación del cáncer en modelos animales puede ser inherentemente más difícil de duplicar en humanos.

Los datos para los nuevos homosilatecanos de la presente invención muestran esencialmente solo pequeñas variaciones entre los niveles de lactona en la sangre de ratón frente a la sangre humana. Los cambios observados en la sangre de ratón frente a la humana son muy pequeños en comparación con la diferencia de 100 veces en los niveles de lactona observados para la 9-aminocamptotecina. En los experimentos con sangre de ratón para la DB-81 y DB-91, los niveles de lactona realmente observados en la sangre humana eran moderadamente subestimados en valores de 6% y 20%, respectivamente. Sin embargo, para la 9-aminocamptotecina en sangre de ratón se sobreestiman en 100 veces los niveles de lactona observados realmente en la sangre humana. Estos resultados indican que hay razones fisiológicas fundamentales para pensar que el éxito de estos nuevos homosilatecanos en modelos animales puede ser trasladado más fácilmente a humanos en comparación con agentes tales como la camptotecina y la 9-aminocamptotecina.

TABLA 4

Comparación de las considerables variaciones interespecies en las estabildades en sangre para la camptotecina y la 9-camptotecina frente a las diferencias relativamente menores observadas para los nuevos análogos de camptotecina altamente lipófilos

Compuesto	Porcentaje de lactona en sangre de ratón después de 3 horas de incubación	Porcentaje de lactona en sangre humana después de 3 horas de incubación	Relación del nivel de lactona Ratón/Humano
9-aminocamptotecina	38	0,4	100
Camptotecina	20	7	3
DB-38	72	56	1,3
DB-81	80	87	0,9
DB-90	61	85	0,7
DB-91	70	85	0,8

* Los experimentos se realizaron a pH 7,4 y 37°C y los niveles de lactona se determinaron usando métodos de HPLC. Se extrajeron las muestras sanguíneas y se mantuvieron a 5°C antes de la iniciación del experimento.

Las camptotecinas altamente lipófilas presentan una potencia anticancerosa elevada incluso en presencia de albúmina de suero humano

En la tabla 5 se recogen las citotoxicidades de varias camptotecinas frente a células de cáncer de mama humano tumorigénicas metastáticas MDA-MB-435. Los valores de la citotoxicidad son para tiempos de exposición de 72 horas. En conjunto, se encontró que el DB-38 es el más potente de los cuatro nuevos homosilatecanos que se han estudiado, con un valor de IC_{50} de 20 nM, mientras que los valores de la IC_{50} para los otros homosilatecanos variaban de 20 nM a 115 nM. Estos resultados indican claramente que a lo largo del desarrollo del nuevo homosilatecano, la estabilidad de los agentes en la sangre humana y animal puede aumentarse y equipararse notablemente sin comprometer las elevadas potencia y citotoxicidad intrínsecas de esta clase importante de fármacos anticancerosos.

TABLA 5

Valores de la IC_{50} de los homosilatecanos y análogos de la camptotecina frente a células de cáncer de mama humano tumorigénicas metastáticas MDA-MB-435 en ausencia y en presencia de albúmina de suero humano

Compuesto	IC_{50} (nM) (w/o HAS)
Camptothecin	12 ± 4
DB-38	20 ± 3
DB-81	77 ± 13
DB-90	73 ± 8
DB-91	115 ± 5

Ejemplos

Métodos experimentales para la determinación cualitativa y cuantitativa de la distribución en las capas dobles de lípidos (es decir, lipofilia) y estabilidad del anillo lactona de los nuevos homosilatecanos de la presente invención

Productos químicos. La camptotecina y el topotecano estaban en su configuración 20 (S) y eran de alta pureza (>98) como se determinó mediante análisis por HPLC con detección de fluorescencia. La preparación de los homosilatecanos se describe en otra parte de esta solicitud. Todos los otros agentes eran de grado de reactivo y se usaron sin purificación adicional. El agua de alta pureza fue proporcionada mediante un sistema de purificación Milli-Q UV PLUS (Badford, MA) y se usó en todos los experimentos.

Preparación de la disolución madre de fármaco. Las disoluciones madre de los fármacos se prepararon en dime-tilsulfóxido (grado espectroscópico de la A. C. S.), Aldrich, Milwaukee, WI) con una concentración de 2×10^{-3} M y se almacenaron en la oscuridad a 4°C. La L- α -dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y el L- α -dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPC) se obtuvieron de Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, y se usaron sin purificación adicional. Todos los demás productos químicos fueron de grado de reactivo y se usaron sin purificación adicional.

Preparación de las vesículas. El día del experimento se prepararon suspensiones de las vesículas unilamelares pequeñas (SUV) mediante una metodología descrita anteriormente en Burke y Tritton, *Biochemistry* 24: 5972-5980 (1985); y en Burke, T. G., Mishra, A. K., Wani, M. y Wall, M. "Lipid Bilayer Partitioning and Stability of Camptothecin Drugs", *Biochemistry*, 32: 5352-5364 (1993). En resumen, las suspensiones madres de lípido que contenían una cantidad conocida de lípido (200 mg/mL de lípido o menos) en suero salino tamponado con fosfato (PBS, pH 7,4) se prepararon por agitación durante 5-10 minutos por encima de la T_m del lípido. A continuación las dispersiones de lípido se sonicaron usando un baño de ultrasonidos (Laboratory Supplies Co., Hicksville, NY) durante 3-4 horas hasta que se hicieron ópticamente claras. Se observó una disminución del pH de 7,4 a 6,8 para las preparaciones de SUV de DMPG; por lo tanto, el pH de estas suspensiones de SUV se ajustó a 7,4 usando pequeñas cantidades de NaOH 2,5M en PBS, seguido por sonicación adicional. Cada tipo de suspensión de vesículas se templó durante 30 minutos a 37°C y a continuación se usaron en los experimentos.

Instrumentación de fluorescencia. Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se obtuvieron con un espectrofluorómetro SLM Modelo 9850 con un compartimento de cubeta termostatzado. Este instrumento estaba unido mediante una interfaz con un ordenador IBM PS/2 Modelo 55 SX. Los espectros de excitación y de emisión se registraron con una resolución en excitación de 8 nm y una resolución en emisión de 4 nm. En todos los casos, se corrigieron la fluorescencia residual y la dispersión de fondo de los espectros procedentes de lípidos no marcados o de los disolventes mediante la sustracción de un blanco al espectro. Las medidas de la intensidad de fluorescencia en estado estacionario se realizaron en ausencia de polarizadores. Las medidas de la anisotropía en estado estacionario (a) se determinaron con el instrumento en "formato T" para la medida simultánea de dos intensidades polarizadas. El alineamiento de los polarizadores se comprobó de forma rutinaria usando una suspensión diluida de microesferas de poliestireno de 0,25 μ m (Polysciences Inc., Warrington, PA) en agua y se obtuvieron valores de anisotropía de >0,99. Alternativamente, se comprobó la orientación del polarizador usando una disolución diluida de glicógeno en agua. Se calculó la anisotropía a partir de $a = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + GI_{VH})$, donde $G = I_{VH} / I_{HH}$ y los subíndices se refieren a las orientaciones vertical y horizontal de los polarizadores de la excitación y la emisión, respectivamente.

Las medidas de anisotropía para los homosilatecanos y camptotecinas se realizaron usando luz de excitación de 370 a 400 nm y filtros de paso largo sobre cada canal de emisión para aislar la señal de fluorescencia del fármaco de la dispersión de fondo y/o la fluorescencia residual. Todos los filtros de emisión se obtuvieron de Oriel Corp. (Stamford, CT). La combinación de luz de excitación y filtros de emisión permitió la adecuada separación de la fluorescencia y la señal de fondo. La contribución de la fluorescencia residual, junto con la luz dispersada, fue típicamente menor que 1% de la intensidad total. Como los anillos lactona de la camptotecina y sus análogos relacionados experimentan una hidrólisis en medio acuoso con vidas medias de aproximadamente 20 minutos, todas las medidas se completaron en el tiempo más corto posible (aproximadamente 0,5 a 1 minuto) después de mezclar la disolución madre con disoluciones previamente equilibradas térmicamente, de forma que todos los experimentos estuvieran libres de productos de

hidrólisis. En los experimentos espectroscópicos de fluorescencia diseñados para proporcionar información sobre las interacciones de los homosilatecanos y las camptotecinas con los glóbulos rojos sanguíneos, se usaron concentraciones de fármaco de 10 μM . Los experimentos con glóbulos rojos sanguíneos se realizaron en cubetas con la cara frontal de cuarzo para optimizar la señal de fluorescencia y minimizar la luz dispersa.

Determinación de las constantes de enlace de equilibrio. Se empleó el método de valoración de la anisotropía de fluorescencia, como se describe en Burke, T. G., Mishra, A. K., Wani, M. y Wall, M. "Lipid Bilayer Partitioning and Stability of Camptothecin Drugs", *Biochemistry* 32: 5352-5364 (1993), para determinar las concentraciones de especies de fármaco libres y enlazadas en suspensiones de liposomas que contenían una concentración total de fármaco de $1 \times 10^6 \text{M}$ y variando las concentraciones de lípidos. Todos los experimentos se realizaron en tubos de vidrio. Las constantes de asociación totales se definen como $K = [A_B]/[A_F][L]$, donde $[A_B]$ representa la concentración de fármaco enlazado, $[A_F]$ representa la concentración de fármaco libre y $[L]$ representa la concentración total de lípido de la muestra. Las gráficas doblemente recíprocas de las isotermas de enlace $\{1/(\text{fracción de fármaco enlazado}) \text{ vs. } 1/[\text{lípido}]\}$ fueron lineales y los valores de K se determinaron a partir de las pendientes usando el método de análisis lineal por mínimos cuadrados. Se escribió un programa informático basado en la relación $K = [A_B]/[A_F][L]$ para predecir los niveles de fármaco enlazado para valores específicos de K y de fármaco total.

Cinética de la apertura del anillo lactona de los homosilatecanos, silatecanos y camptotecinas. Se determinó la cinética de la hidrólisis de las camptotecinas en presencia de distintos componentes de la sangre mediante análisis cuantitativos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase inversa C18, modificados de las metodologías descritas previamente en la bibliografía citada anteriormente. La preparación de las muestras de sangre total y sangre fraccionada se realizó como se ha descrito anteriormente. Se usó HSA cristalizada de alta pureza (>97%) de Sigma Chemical (St. Louis, MO). Se prepararon disoluciones madre de HSA en disolución tampón de PBS con un pH final de 7.40 ± 0.05 . Las concentraciones de HSA se determinaron por absorbancia de UV a 278 nm usando un coeficiente de extinción de $39.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Porter, 1992). Todos los agentes fueron de grado de reactivo y se usaron sin purificación adicional. En todos los experimentos se usó agua de alta pureza proporcionada por un sistema de purificación Milli-Q UV PLUS. Los disolventes para HPLC fueron de Fisher Scientific. El plasma y los glóbulos rojos sanguíneos humanos se obtuvieron a partir de un donante varón en tubos heparinizados, se almacenaron a $5-10^\circ\text{C}$ y se usaron tan pronto como fue posible (generalmente en 1 semana). La sangre de ratones se recogió en tubos heparinizados y se almacenó a $5-10^\circ\text{C}$ hasta su utilización.

Los análisis por HPLC se realizaron con un sistema de HPLC Waters Alliance 2690 equipado con un automuestreador controlado térmicamente y un detector de fluorescencia de barrido Waters 474. Un segundo sistema de HPLC era un sistema de HPLC Waters compuesto por bombas de HPLC 501, automuestreador controlado térmicamente 717 Plus y un detector de fluorescencia de barrido 470. Los procedimientos de análisis por HPLC usados para los homosilatecanos se resumen a continuación. El disolvente A consistía en acetonitrilo y el disolvente B fue acetato de trietilamonio al 2%, pH 5,5, con un caudal de 1 mL/minuto. Para el DB-38 se usó elución isocrática: 33% de disolvente A, 67% de disolvente B; $\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$. Para el DB-81 se usó elución isocrática: 56% de disolvente A, 44% de disolvente B; $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 444 \text{ nm}$. Para el DB-90 se usó elución isocrática: 41% de disolvente A, 59% de disolvente B; $\lambda_{\text{ex}} = 412 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 526 \text{ nm}$. Para el DB-91 se usó una elución isocrática de 42% de disolvente A, 58% de disolvente B, y $\lambda_{\text{ex}} = 392 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 562 \text{ nm}$.

Para determinar las estabildades de los homosilatecanos en PBS, se añadió una alícuota de cada uno de los homosilatecanos en DMSO a suero salino tamponado con fosfato (PBS), pH 7,4 en un frasco del automuestreador de HPLC mantenido a 37°C en un baño de agua para obtener una concentración final de fármaco de 1 μM . El frasco que contenía el fármaco se transfirió rápidamente al automuestreador mantenido a 37°C y se analizaron las alícuotas a varios tiempos. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. Los datos se recogieron y se analizaron usando un programa informático de Waters Millenium. La fracción de lactona se calculó usando el área de pico de los picos de la lactona y del carboxilato y usando la relación lactona/carboxilato.

Para determinar la estabilidad del fármaco en la sangre total, se incubó la sangre total a 37°C durante 30 minutos a pH determinado. El pH de la sangre se ajustó a 7.4 ± 0.5 usando bien KOH 0,1M o bien HCl 0,1M. Se incubaron las muestras de sangre a 37°C durante 30 minutos y se volvió a medir el pH para asegurar que estaba en el intervalo anterior y se inició el ensayo individual. Se tomaron alícuotas de sangre (2 mL cada una) y se colocaron en tres tubos de ensayo de vidrio desechables y los tubos se incubaron a 37°C . A continuación se añadió a la sangre una alícuota de fármaco en DMSO para obtener una concentración final de fármaco de 1 μM . Se prosiguió la incubación a 37°C y se tomaron alícuotas de 150 μL a diferentes tiempos y se añadieron a 600 μL de metanol frío (-20°C) en un tubo de Eppendorf. A continuación el tubo se agitó durante 10 segundos y se centrifugó en una microcentrifugadora de sobremesa a 8.000 rpm durante 45 segundos. Se eliminó el sobrenadante y se colocó en un frasco de automuestreador y el frasco se introdujo rápidamente en el automuestreador mantenido a 4°C . La muestra se analizó inmediatamente en el sistema de HPLC. El análisis de los datos fue como se ha descrito para las muestras de fármaco y PBS solos.

Para estudiar la estabilidad de los homosilatecanos en PBS que contenía albúmina de suero humano (HSA), se disolvió en HSA en PBS, pH 7,4, a la concentración de 30 mg/mL y se incubó a 37°C . Se midió el pH y se ajustó a 7.4 ± 0.5 usando KOH 0,1M o HCl 0,1M. La incubación prosiguió hasta que el pH se estabilizó en el intervalo deseado. Se tomó una alícuota de PBS/HSA y se colocó en un frasco del automuestreador y se mantuvo a 37°C durante 10 minutos. Se añadió a la muestra una alícuota del fármaco en DMSO resultando una concentración final del fármaco de 1 μM . Se introdujo rápidamente el frasco en el automuestreador del HPLC mantenido a 37°C y se inyectaron y

analizaron por HPLC alícuotas a diferentes tiempos. El análisis de los datos fue como se ha descrito anteriormente para las muestras de fármaco y PBS solos.

Para caracterizar las estabilidades de los nuevos silatecanos de interés en plasma humano se incubó plasma helado a 37°C para descongelarlo. Se burbujeó gas sanguíneo a través del plasma para ajustar el pH a aproximadamente 7,5. Se incubaron alícuotas de plasma (5 mL) a 37°C en tubos de ensayo de cristal desechables y se añadió disolución madre de fármaco en DMSO hasta obtener una concentración final de fármaco de 1 μ M. A continuación se dejó que las muestras se incubaran adicionalmente a 37°C. Se tomaron alícuotas (150 μ L) a diferentes tiempos y se añadieron a 600 μ L de metanol frío (-20°C) en un tubo de Eppendorf. Los tubos se agitaron durante 10 segundos y se centrifugaron en una microcentrifugadora de sobremesa a 8.000 rpm durante 45 segundos. Se eliminó el sobrenadante y se colocó en un frasco de automuestreador y el frasco se introdujo rápidamente en el automuestreador mantenido a 4°C. La muestra se analizó por HPLC tan pronto como fue posible. El análisis de los datos fue como el descrito para las muestras de fármaco y PBS solos como se ha indicado anteriormente. Se burbujeó continuamente gas sanguíneo a través de las muestras de plasma para mantener el pH a 7,5 \pm 1,0.

Para estudiar las estabilidades de los nuevos homosilatecanos en presencia de concentraciones fisiológicamente importantes de glóbulos rojos sanguíneos (abreviados generalmente como RBC por sus iniciales en inglés: red blood cells), se realizaron los siguientes experimentos. Los glóbulos rojos sanguíneos envasados se obtuvieron de Central Kentucky Red Cross y se contaron usando un contador de células Counter. El número de células se ajustó a 5×10^{12} células/L usando PBS, pH 7,4, y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Se midió el pH de las muestras y se ajustó a 7,4 \pm 0,5 usando bien KOH 0,1M o bien HCl 0,1M. Los RBCs se incubaron a 37°C durante 30 minutos y se volvió a medir el pH para asegurar que estaba en el mismo intervalo que anteriormente antes de empezar los análisis. Se tomaron alícuotas de RBCs (2 mL cada una) y se colocaron en tres tubos de ensayo de vidrio desechables y los tubos se incubaron a 37°C. Se añadieron a las suspensiones de RBCs en PBS alícuotas del fármaco en DMSO para obtener una concentración final de fármaco de 1 μ M. Se prosiguió la incubación a 37°C y se tomaron alícuotas de 150 μ L a diferentes tiempos y se añadieron a 600 μ L de metanol frío (-20°C) presente en un tubo de Eppendorf. Los tubos se agitaron durante 10 segundos y se centrifugaron en una microcentrifugadora de sobremesa a 8.000 rpm durante 45 segundos. Se eliminó el sobrenadante y se colocó en un frasco de automuestreador y el frasco se introdujo rápidamente en el automuestreador mantenido a 4°C. La muestra se analizó por HPLC tan pronto como fue posible. El análisis de los datos fue como el descrito para las muestras de fármaco y PBS solos como se ha indicado anteriormente.

Cambios espectrales en la fluorescencia debidos a las interacciones de los homosilatecanos con las membranas de doble capa de lípidos. Se recogieron los datos de emisión de fluorescencia para los homosilatecanos en disoluciones de suero salino tamponado con fosfato (PBS) a pH 7,4 y etanol. También se adquirieron datos para los nuevos agentes en presencia de suspensiones de vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) compuestas bien por dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) neutra en PBS o bien por dimiristoilfosfatidilglicerol cargado negativamente (DMPG) en PBS. Se usaron concentraciones de lípido de 5mM. Para el DB-38 todos los espectros se registraron usando luz de excitación de 410 nm a 37°C. El máximo de emisión para el DB-38 en PBS es 531 nm y este valor se desplaza a valores inferiores en presencia de las membranas (λ_{\max} de 515 nm en presencia de vesículas de DMPC y λ_{\max} de 517 nm en presencia de vesículas de DMPG). Los desplazamientos espectrales del DB-38 que se producen en presencia de las membranas indican que el agente es capaz de enlazarse tanto a membranas neutras como a membranas cargadas negativamente. Los registros espectrales se iniciaron y completaron poco tiempo después de la adición de la forma lactona del agente a la disolución o suspensión, asegurando de esta forma que la señal detectada proviene predominantemente de la forma lactona del agente (y no de la forma de anillo abierto).

También se examinaron los espectros de emisión de fluorescencia de la 7-t-butil-dimetilsililhomocamptotecina (DB-81) 1 μ M. Se usaron concentraciones de lípido de 10mM. Todos los espectros se registraron usando luz de excitación de 380 nm a 37°C. El máximo de emisión para el DB-81 en disolución tampón de PBS es 452 nm y este valor se desplaza a valores inferiores en presencia de las membranas (λ_{\max} de 443 nm en presencia de vesículas de DMPC y λ_{\max} de 442 nm en presencia de vesículas de DMPG). Los desplazamientos espectrales del DB-81 que se producen en presencia de las membranas indican que el agente es capaz de enlazarse tanto a membranas neutras como a membranas cargadas negativamente.

También se examinó el espectro de emisión de fluorescencia de la 7-t-butil-dimetilsilil-10-aminohomocamptotecina (DB-90) 1 μ M. Todos los espectros se registraron usando luz de excitación de 430 nm a 37°C. El máximo de emisión para el DB-90 en PBS es 535 nm y este valor se desplaza a valores inferiores en presencia de las membranas (λ_{\max} de 513 nm en presencia de vesículas de DMPC y λ_{\max} de 512 nm en presencia de vesículas de DMPG).

También se estudió el espectro de emisión de fluorescencia de la 7-t-butil-dimetilsilil-10-hidroxi-homocamptotecina (DB-91) 1 μ M. Se usaron concentraciones de lípido de 10mM. Todos los espectros se registraron usando luz de excitación de 394 nm a 37°C. El máximo de emisión para el DB-91 en PBS es 554 nm y este valor se desplaza a valores inferiores en presencia de las membranas (λ_{\max} de 441 nm en presencia de vesículas de DMPC y λ_{\max} de 434 nm en presencia de vesículas de DMPG).

También se estudió el espectro de emisión de fluorescencia de 1 μ M de la forma carboxilato de la 7-t-butil-dimetilsilil-10-aminohomocamptotecina (carboxilato de DB-90). Se usaron concentraciones de lípido de 0,15 mM. La concentración de lípido usada en estos experimentos fue mayor que en los experimentos realizados usando la forma lactona correspondiente del DB-90; se usaron concentraciones mayores de lípido debido a las pequeñas asociaciones

con la membrana de la forma de anillo abierto del fármaco con respecto a la forma lactona de anillo cerrado del fármaco. Todos los espectros se registraron usando luz de excitación de 430 nm a 37°C. El máximo de emisión para el carboxilato de DB-90 en PBS es 529 nm y este valor se desplaza a valores inferiores en presencia de las membranas (λ_{max} de 512 nm en presencia de vesículas de DMPC y λ_{max} de 512 nm en presencia de vesículas de DMPG).

También se obtuvo el espectro de emisión de fluorescencia de 1 μM de la forma de anillo abierto o carboxilato de la 7-t-butildimetilsilil-10-hidroxi homocamptotecina (carboxilato de DB-91). Se usaron concentraciones de lípido de 0,15 M (la mayor concentración de lípido necesaria en estos experimentos para favorecer el enlace fue necesaria debido a las pequeñas asociaciones con la membrana de la forma de anillo abierto del agente con respecto a la forma lactona de anillo cerrado del agente). El máximo de emisión para el carboxilato de DB-91 en PBS es 549 nm y este valor se desplaza a valores inferiores (λ_{max} de 450 nm en presencia de vesículas de DMPC y λ_{max} de 446 nm en presencia de vesículas de DMPG).

Se estudiaron los espectros de emisión de fluorescencia normalizados de 1 μM de la forma lactona frente a la forma carboxilato de la 7-t-butildimetilsilil-10-aminohomocamptotecina (DB-90 y carboxilato de DB-90 respectivamente) en PBS a 37°C. Los datos espectrales de la emisión de fluorescencia indican que después de la apertura del anillo, hay un ligero desplazamiento del espectro hacia la región de las longitudes de onda más cortas (o desplazamiento del espectro más hacia la región azul de la luz). Los dos espectros se registraron usando luz de excitación de 402 nm.

Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia normalizados de 1 μM de la forma lactona frente a la forma carboxilato de la 7-t-butildimetilsilil-10-hidroxi homocamptotecina (DB-91 y carboxilato de DB-91 respectivamente) en PBS a 37°C. Los datos espectrales de la emisión de fluorescencia indican que, después de la apertura del anillo, hay un ligero desplazamiento del espectro hacia la región de las longitudes de onda más cortas (o desplazamiento del espectro más hacia la región azul de la luz). Los dos espectros se registraron a 394 nm.

Observación directa de los cambios espectrales de la fluorescencia después de la distribución del homosilatecano en los glóbulos rojos sanguíneos. Los registros espectrales se iniciaron y se completaron poco tiempo después de la adición de la forma lactona del agente a la disolución, asegurando de esta forma que la señal detectada proviene predominantemente de la forma lactona del agente (y no de la forma de anillo abierto). El máximo de emisión para el DB-91 en PBS es 554 nm pero este valor se desplaza significativamente a λ_{max} de aproximadamente 410 nm en etanol anhidro. Debido a que el DB-91 contiene un grupo funcional hidroxilo en la posición 10, existe la posibilidad de que la fluorescencia pueda producirse en dos especies distintas. En un disolvente aprótico o un medio microscópico no acuoso, predomina una especie protonada (con respecto al grupo funcional hidroxilo en la posición 10), mientras que en disolventes próticos, tales como el agua, predomina un complejo de estado excitado desprotonado. El pico a 554 nm se corresponde con el complejo de estado excitado desprotonado, mientras que la λ_{max} de aproximadamente 410 nm se corresponde con el complejo de estado excitado protonado. La formación del complejo de estado excitado desprotonado se facilita de forma importante por la presencia de agua; incluso para cantidades de agua pequeñas, tales como 1%, aparece un pico a aproximadamente 550 nm que se corresponde con la formación facilitada por el agua del complejo de estado excitado desprotonado. En las figuras 6 y 7 se estudia la extensión de la formación del complejo de estado excitado protonado y se usa este parámetro como una medida relativa de la lipofilia de dos camptotecinas modificadas en la posición 7 (DB-91 y SN-38) cada una de ellas conteniendo el grupo funcional hidroxilo en la posición 10. Los registros espectrales se iniciaron y completaron poco tiempo después de la adición de la forma lactona del agente a la disolución, asegurando de esta forma que la señal detectada proviene predominantemente de la forma lactona del agente (y no de la forma de anillo abierto). El máximo de emisión para el DB-91 en PBS es 554 nm. En presencia de glóbulos rojos sanguíneos, se observa un pico con un valor de λ_{max} significativamente menor, lo que indica que el agente es capaz de distribuirse en las membranas de los glóbulos rojos sanguíneos. Las membranas de los glóbulos rojos sanguíneos proporcionan un medio microscópico hidrófobo en el que los complejos de estado excitado protonados se pueden formar y emitir fluorescencia. La comparación del espectro del DB-91 en presencia de eritrocitos humanos con el del fármaco importante clínicamente 7-etil-10-hidroxicamptotecina (figura 7) indica que hay una formación del complejo de estado excitado protonado más extensa en el caso del DB-91. Estos descubrimientos corroboran los estudios de membrana modelo que indican que el enlace a la membrana del SN-38 es significativamente menor que las extensas interacciones observadas para el DB-91 (el SN-38 presenta un valor de K_{DMPC} de 300 M^{-1} , mientras que el DB-91 presenta un valor de K_{DMPC} de 8.000 M^{-1}). El nuevo homosilatecano DB-91 es un agente de interacción con los eritrocitos más lipófilo en comparación con el compuesto conocido 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN-38). El máximo de emisión para el SN-38 en PBS es aproximadamente 550 nm. El agente SN-38, como el DB-91, también contiene un grupo funcional hidroxilo en posición 10 y, como consecuencia, el SN-38 también presenta características espectrales de fluorescencia que son sensibles a la presencia de agua. En presencia de glóbulos rojos sanguíneos, se observa para el SN-38 un pico con un valor de λ_{max} significativamente menor (aproximadamente 440 nm), lo que indica que el agente es capaz de distribuirse en las membranas de los glóbulos rojos sanguíneos. Sin embargo, el pico que aparece con un valor de λ_{max} menor para el SN-38 es pequeño con respecto a la situación observada para el DB-91 (véase la figura 6). Estos resultados indican que hay una formación de complejo de estado excitado protonado más extensa en el caso del DB-91, lo que corrobora que el nuevo homosilatecano DB-91 es un agente de interacción con los eritrocitos más lipófilo en comparación con el compuesto conocido 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN-38).

Actividades anticancerosas de los homosilatecanos determinadas por experimentos de cultivos celulares in vitro. Se realizaron medidas de citotoxicidad usando células tumorigénicas de cáncer de mama humano MDA-MB-435. Las células se expusieron a un intervalo de concentraciones de fármaco durante periodos de exposición de 72 horas y a continuación se evaluó la viabilidad usando un ensayo de sulfa-rodamina B (SRB). La SRB mide los niveles totales

de proteína en las células vivas. Las proteínas de las células muertas se descompusieron y se eliminaron en la etapa de lavado antes de la fijación con TCA. Sin embargo, es posible que las células en una etapa temprana de la muerte todavía tengan su integridad de membrana y por lo tanto mantengan dentro los contenidos de proteína. Como resultado, algunas veces la densidad óptica a 490 nm puede estar sobrestimada y la citotoxicidad subestimada. Para validar el análisis con SRB se han ensayado varios agentes quimioterapéuticos a lo largo de múltiples paneles de líneas celulares tumorales y se han encontrado correlaciones cercanas con el análisis estándar con tetrazolio (MIT) y con análisis clonogénicos. El análisis con SRB es ahora un ensayo bien considerado y recientemente fue aprobado por el NCI como un análisis estándar para selección de fármacos anticancerosos. Usando el análisis con SRB, se determinaron los valores de la citotoxicidad para las células expuestas a los cuatro nuevos homolátexanos durante 72 horas. Se determinó la citotoxicidad de los homolátexanos y la camptotecina frente a células tumorigénicas metastásicas de cáncer de mama humano MDA-MB-45 en presencia y en ausencia de albúmina de suero humano y se recogen en la tabla 5. Cada valor de IC₅₀ representa la media de tres ensayos separados con cada nivel de dosificación estudiado por triplicado.

(+/-)4-Etil-8-metoxi-6-trimetilsilanil-3,4-dihidro-1H-pirano[3,4-c]piridina-3,4-diol (4)

En un matraz de fondo redondo se añadió N-óxido de metilmorfolina (0,89 g, 7,6 mmoles) seguido por H₂O (10 mL) y t-BuOH (10 mL). Se añadió una disolución al 2,5 por ciento en peso de OsO₄ en t-BuOH (0,5 mL) seguido por el enol éter (3) (0,5 g, 1,9 mmoles). Después de 12 horas, a 22°C, se añadió Na₂SO₃ (1,0 g) a la mezcla. Después de 30 minutos la mezcla se diluyó con H₂O (100 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 100 mL). La fase orgánica se secó (MgSO₄) y el residuo bruto se cromatografió (mezcla de hexanos:EtOAc 3:1) para dar el lactol (4), 0,55 g (98%), como un sólido blanco. IR (CHCl₃, cm⁻¹) 3602, 3569, 3398, 3022, 2950, 1579, 1456, 1351; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,22 (s, 9H), 0,83 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,71-1,79 (m, J = 7 Hz, 2H), 2,91 (s, 1H), 3,90 (s, 3H), 4,19 (d, J = 5 Hz, 1H), 4,53 (d, J = 16 Hz, 1H), 4,70 (d, J = 16 Hz, 1H), 5,06 (d, J = 5 Hz, 1H), 7,25 (s, 1H); RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ -1,7, 7,8, 31,5, 53,1, 58,8, 70,9, 93,8, 115,1, 119,7, 145,8, 158,0, 162,8; HRMS (EI) m/z calculado para el C₁₄H₂₃NO₄Si (M⁺) 473,0519, encontrado 473,0507; LRMS (EI) m/z 473 (M⁺), 458, 386, 360, 346, 139, 73, 57.

2-Metoxi-4-propionil-6-trimetilsilanil-piridin-3-il metil éster del ácido fórmico

En un matraz de fondo redondo se añadió el lactol (4) (0,100 g, 0,34 mmoles) seguido por AcOH (9 mL) y tetraacetato de plomo (0,18 g, 0,406 mmoles). Después de 3 horas a 50°C, la mezcla se vertió en NaHCO₃ saturado enfriado en hielo y se extrajo con éter (3 x 75 mL). La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se cromatografió (mezcla de hexanos:EtOAc 95:5) para dar el cetoformato éster (5), 91 mg (91%), como un aceite claro. IR (puro, cm⁻¹) 2963, 2902, 1733, 1556, 1455, 1345; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,30 (s, 9H), 1,21 (t, J = 7 Hz, 3H), 2,75-2,95 (m, J = 7 Hz, 2H), 4,02 (s, 3H), 5,28 (s, 2H), 7,07 (s, 1H), 8,05 (s, 1H); RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ -1,8, 7,9, 35,9, 54,0, 57,6, 112,9, 118,7, 148,5, 160,8, 162,2, 167,6, 205,6; HRMS (EI) m/z calculado para el C₁₄H₂₁NO₄Si (M⁺) 295,1240, encontrado 295,1239; LRMS (EI) m/z 295 (M⁺), 280, 267, 250, 234, 222, 206, 176, 162, 103, 89, 79, 73, 57.

(+/-) ter-Butil éster del ácido 3-hidroxi-3-(3-hidroximetil-2-metoxi-6-trimetilsilanil-piridin-4-il)-pentanoico

En un matraz secado con llama se añadió el cetoformato éster (5) (0,5 g, 1,69 mmoles) seguido por dioxano (20 mL). Se añadió α-bromo-ter-butilacetato (0,9 mL, 6,08 mmoles) seguido por Zn activado (0,59 g, 9,1 mmoles). El Zn se activó por el método de Cava como se ha descrito en el documento *J. Organic. Chem.* 47, pág. 5030 (1982). Después se añadió I₂ (0,16 g, 0,63 mmoles) y la mezcla se sonicó durante 3,2 horas. Después de la sonicación, la mezcla se diluyó con H₂O (100 mL) y éter (100 mL). La emulsión resultante se filtró a través de una almohadilla de celita, se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con éter (2 x 100 mL). Los extractos en éter combinados se secaron (MgSO₄) y se cromatografió (mezcla de hexanos:EtOAc 85:15) para dar el betahidroxil éster (6), 0,50 g (78%) como un aceite claro. IR (puro, cm⁻¹) 3469, 2980, 1705, 1575, 1545, 1447, 1342, 1248, 1153; RMN de ¹H (300 MHz, C₆D₆) δ 0,38 (s, 9H), 0,79 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,15 (s, 9H), 1,75-1,92 (m, J = 7 Hz, 2H), 2,52 (d, J = 16 Hz, 1H), 2,79 (d, J = 16 Hz, 1H), 3,03 (t, J = 7 Hz, 2H), 3,74 (s, 3H), 5,18 (d, J = 7 Hz, 2H), 5,19 (s, 1H), 7,18 (s, 1H); RMN de ¹³C (75 MHz, C₆D₆) δ -1,9, 8,1, 27,6, 35,5, 45,6, 53,0, 57,0, 77,3, 81,5, 120,9, 121,8, 152,3, 162,6, 163,3, 172,3; HRMS (EI) m/z calculado para el C₁₉H₃₁NO₄Si (M-H₂O) 365,2022, encontrado 365,2028; LRMS (EI) m/z 383 (M⁺), 365, 336, 309, 280, 262, 250, 208, 89, 73, 57.

(+/-) 5-Etil-4,5-dihidro-5-hidroxi-7-trimetilsilil-9-metoxioxepino[3,4-c]piridin-3(1H)-ona (7)

En un matraz de 100 mL se añadieron el betahidroxil éster (6) (0,75 g, 1,9 mmoles) seguido por ácido trifluoroacético (150 mL). Después de 24 horas, la mezcla se vertió en NaHCO₃ saturado (pH 8) y se extrajo con éter (3 x 100 mL). La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se cromatografió (mezcla de hexanos:EtOAc 2:1) para dar la betahidroxil lactona (7), 0,48 g (79%), como un sólido blanco. IR (CHCl₃, cm⁻¹) 3020, 2978, 2978, 2873, 1742, 1561, 1384, 1348, 1110, 909, 842; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,22 (s, 9H), 0,83 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,81-1,88 (m, J = 7 Hz, 2H), 1,37 (br s, 1H), 3,00 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,32 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 5,18 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,42 (d, J = 15 Hz, 1H), 7,26 (s, 1H); RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ -1,9, 8,4, 33,9, 42,9, 53,8, 62,2, 73,8, 114,7, 121,2, 151,6, 159,8, 165,9, 172,3; HRMS (EI) m/z calculado para el C₁₅H₂₃NO₄Si (M⁺) 309,1396, encontrado 309,1399; LRMS (EI) m/z 309 (M⁺), 294, 266, 252, 238, 89.

ES 2 308 977 T3

(+/-)-5-Etil-4,5-dihidro-5-hidroxi-7-yodo-9-metoxioxepino[3,4-c]piridin-3(1H)-ona (8)

En un matraz secado con llama a 0°C se añadió la betahidroxi lactona (7) (0,94 g, 3,0 mmoles) seguido por CH₂Cl₂ seco (25 mL). Se añadió ICl (3,2 g, 19,7 mmoles) a un matraz secado con llama a -78°C. El matraz se sacó del baño, se calentó ligeramente, se secó el exceso de humedad del exterior y se pesó rápidamente en atmósfera de nitrógeno. Después de la pesada, se volvió a poner en el baño a -78°C y se diluyó con CCl₄ enfriado en hielo (16 mL) para dar una disolución 1,2M de ICl. La disolución de ICl resultante se transfirió en un baño de hielo y se dejó equilibrar a 0°C. Se transfirió una porción de la disolución de ICl (10,1 mL) a la mezcla gota a gota en la oscuridad. Después de 16 horas en oscuridad, la mezcla se vertió en una disolución 1:1 (100 mL) de Na₂SO₃ al 5% y saturada. Se añadió salmuera y se extrajo con EtOAc (3 x 100 mL). La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se cromatografió (mezcla de hexanos:EtOAc 3:1) para dar la betahidroxi lactona (7), 0,43 g (46%), y la yodolactona (8), 0,41 g (37%). IR (CHCl₃, cm⁻¹) 2974, 2951, 1747, 1573, 1554, 1359, 1278, 1212, 1054, 870; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,84 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,78-1,85 (m, J = 7 Hz, 2H), 2,98 (br d, J = 14 Hz, 2H), 3,30 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,90 (s, 3H), 5,10 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,35 (d, J = 15 Hz, 1H), 7,51 (s, 1H); RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 8,4, 37,4, 42,7, 55,0, 61,8, 73,4, 114,0, 114,9, 127,3, 155,3, 159,8, 171,9; HRMS (EI) *m/z* calculado para el C₁₂H₁₄INO₄ (M⁺) 362,9967, encontrado 362,9955 LRMS (EI) *m/z* 363 (M⁺), 334, 326, 317, 302, 292, 262, 234, 162, 137, 120, 57.

(+/-)-5-Etil-1,4,5,8-tetrahidro-5-hidroxi-7-yodooxepino[3,4-c]piridin-3,9-diona (9)

En un matraz secado con llama se añadió la yodolactona (8) (0,33 g, 0,90 mmoles) seguido por acetonitrilo seco (12 mL). Se añadió yoduro de sodio (0,22 g, 1,44 mmoles) seguido por clorotrimetilsilano (0,18 mL, 1,44 mmoles). La mezcla resultante se agitó a 22°C durante 15 minutos, momento en el que se añadió H₂O (7,6 µL, 0,42 mmoles) y se calentó la mezcla a 60°C. Después de 5 horas a 60°C, la mezcla se vertió en una disolución 1:1 de NaSO₃ al 5%/salmuera (75 mL) y a continuación se extrajo rápidamente con EtOAc (6 x 75 mL). La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se cromatografió (CH₂Cl₂:MeOH 95:5) para dar la yodopiridona (9) como un sólido blanco, 0,19 g (61%). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 0,62 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,45-1,54 (m, J = 7 Hz, 2H), 2,80 (d, J = 14 Hz, 1H), 2,97 (d, J = 14 Hz, 1H), 4,93 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,06 (d, J = 15 Hz, 1H), 6,66 (s, 1H); RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 7,5, 35,6, 41,9, 61,6, 72,5, 94,4, 118,3, 121,1, 156,5, 162,6, 172,7; HRMS (EI) *m/z* calculado para el C₁₁H₁₂INO₄ (M⁺) 348,9811, encontrado 348,9815 LRMS (EI) *m/z* 349 (M⁺), 331, 320, 303, 289, 278, 264, 250, 162, 150, 122, 94, 57.

Preparación de las yodopiridonas N-alquiladas

(+/-)-5-Etil-1,4,5-trihidro-5-hidroxi-7-yodo-8-(3-trimetilsilil-2-propinil)-oxepino[3,4-c]piridin-3,9-diona (10a)

En un matraz secado con llama se añadió la yodopiridona (9) (0,16 g, 0,46 mmoles) seguido por DME seco (3,8 mL) y DMF (0,95 mL). Esta disolución se llevó a 0°C y se añadió NaH en dispersión al 60% en aceite (19,3 mg, 0,482 mmoles) en porciones. Después de 15 minutos se añadieron 2 eq. de LiBr (81 mg, 0,92 mmoles), secado a vacío con llama, y la mezcla se llevó a 22°C. Después de 25 minutos a 22°C, se añadió bromuro de trimetilsililpropargilo (0,130 mL, 0,92 mmoles) y se calentó la mezcla a 65°C. Después de 16 horas, se vertió la mezcla en salmuera (50 mL) y se extrajo con EtOAc (8 x 30 mL). La fase en EtOAc se secó (MgSO₄) y se cromatografió (CH₂Cl₂:EtOAc 80:20) para dar la piridona N-alquilada (10a) buscada, 134 mg (63%), como una espuma blanca. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,005 (s, 9H), 0,80 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,60-1,74 (m, J = 7 Hz, 2H), 2,94 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,11 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,60 (br s, 1H), 4,82 (d, J = 17 Hz, 1H), 5,01 (d, J = 17 Hz, 1H), 5,09 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,26 (d, J = 15 Hz, 1H), 7,01 (s, 1H); RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ -0,44, 7,9, 35,7, 42,2, 45,2, 62,3, 72,6, 90,7, 98,1, 99,2, 119,9, 122,3, 155,1, 160,6, 172,6; HRMS (EI) *m/z* calculado para el C₁₇H₂₂INO₄Si (M⁺) 459,0363, encontrado 459,0366 LRMS (EI) *m/z* 459 (M⁺), 444, 388, 306, 111, 96, 83, 73, 57.

(+/-)-5-Etil-1,4,5-trihidro-5-hidroxi-7-yodo-8-(3-ter-butildimetilsilil-2-propinil)-oxepino[3,4-c]piridin-3,9-diona (10b)

Siguiendo el procedimiento resumido anteriormente la yodopiridona (7) (0,16 g, 0,46 mmoles) se N-alquiló con bromuro de propargilo TBDMS (0,21 g, 0,92 mmoles). Por cromatografía ultra-rápida (CH₂Cl₂:EtOAc 9:1) se obtuvo la yodopiridona (8b), 134 mg (58%), como una espuma blanca. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,097 (s, 6H), 0,92 (br s, 12H), 1,82-1,89 (br m, 2H), 3,01 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,33 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,48 (br s, 1H), 5,07 (s, 2H), 5,12 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,47 (d, J = 15 Hz, 1H), 7,10 (s, 1H); RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ -4,7, 8,3, 16,6, 26,3, 36,0, 42,6, 45,3, 62,8, 73,5, 89,4, 98,6, 99,5, 119,5, 122,9, 154,1, 160,4, 172,0; HRMS (EI) *m/z* calculado para el C₂₀H₂₈INO₄Si (M⁺) 501,0832, encontrado 501,0843 LRMS (EI) *m/z* 501 (M⁺), 444, 402, 335, 318, 169, 121, 96, 57.

ES 2 308 977 T3

(+/-) 5-Etil-1,4,5,13-tetrahidro-5-hidroxi-12-trimetilsilil-3H,15H-oxepino[3',4':6,7] indolizino[1,2-b]quinolin-3,15-diona (1h)

(7-trimetilsililhomocamptotecina)

5

En un tubo a presión secado en horno se añadió en atmósfera de Ar la yodopiridona (10a) (15 mg, 0,033 mmoles) seguido por benceno (0,25 mL) y t-BuOH (0,5 mL). Después se añadieron fenilisonitrilo (13,6 mg, 0,13 mmoles) y hexametil-diastaño (16,0 mg, 0,049 mmoles) y el tubo se llenó con Ar, se selló y se colocó enfrente de una lámpara solar GE de 275 W. Después de 12 horas de irradiación, se cromatografió (CH₂Cl₂:acetona 5:1) para dar la homocamptotecina (1h), 5,2 mg (36%), como un sólido de color canela. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 0,64 (s, 9H), 0,96 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,96-2,05 (m, J = 7 Hz, 2H), 3,19 (d, J = 14 Hz, 2H), 3,46 (d, J = 14 Hz, 1H), 5,34 (s, 2H), 5,44 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,63 (d, J = 15 Hz, 1H), 7,65-7,71 (m, 2H), 7,78-7,84 (m, 1H), 8,18 (d, J = 8 Hz, 1H), 8,27 (d, J = 8 Hz, 1H); HRMS (EI) m/z calculado para el C₂₄H₂₆N₂O₄Si (M⁺) 434,1662, encontrado 434,1679 LRMS (EI) m/z 434 (M⁺), 419, 388, 374, 363, 347, 335, 320, 303, 289, 275, 261, 247, 231, 219, 174, 149, 73.

15

(+/-) 5-Etil-1,4,5,13-tetrahidro-5-hidroxi-10-(ter-butiloxycarbonilamino)-12-trimetilsilil-3H,15H-oxepino[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3,15-diona (1c)

(10-ter-butiloxycarbonilamino-7-trimetilsililhomocamptotecina)

20

Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se hizo reaccionar la yodopiridona (10a) (30 mg, 0,065 mmoles) con para-Boc-aminofenilisonitrilo (57 mg, 0,26 mmoles) y hexametil-diastaño (32,2 mg, 0,1 mmoles) en benceno (0,5 mL) y t-BuOH (1 mL). Por cromatografía (CH₂Cl₂:acetona 7:1) se obtuvo el compuesto (1c), 18,8 mg (53%), como un sólido marrón. IR (CHCl₃, cm⁻¹) 3022, 3007, 1736, 1655, 1594, 1528, 1155, 1062; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 0,70 (s, 9H), 0,96 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,61 (s, 9H), 1,85-2,10 (m, J = 7 Hz, 2H), 3,31 (d, J = 13 Hz, 1H), 3,41 (d, J = 13 Hz, 1H), 5,11 (d, J = 19 Hz, 1H), 5,34-5,41 (m, 2H), 5,61 (d, J = 15 Hz, 1H), 6,96 (s, 1H), 7,19-7,40 (m, 1H) 7,62 (s, 1H), 8,37 (s, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 1,43, 8,3, 28,4, 35,8, 42,6, 52,4, 62,3, 73,9, 81,2, 100,3, 115,1, 122,2, 123,0, 130,7, 132,6, 134,8, 137,1, 143,4, 143,6, 145,1, 148,2, 152,6, 156,5, 159,8, 171,8; HRMS (EI) m/z calculado para el C₂₉H₃₅N₃O₆Si (M⁺) 549,2295, encontrado 549,2274 LRMS (EI) m/z 549 (M⁺), 493, 475, 449, 433, 415, 404, 389, 378, 350, 304, 260, 195, 182, 73.

30

(+/-) 5-Etil-1,4,5,13-tetrahidro-5-hidroxi-10-acetoxi-12-trimetilsilil-3H,15H-oxepino [3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3,15-diona

35

(10-acetoxi-7-trimetilsililhomocamptotecina)

Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se hizo reaccionar la yodopiridona (10a) (30 mg, 0,065 mmoles) con para-acetoxifenilisonitrilo (42 mg, 0,26 mmoles) y hexametil-diastaño (32,2 mg, 0,1 mmoles) en benceno (0,5 mL) y t-BuOH (1 mL). Por cromatografía (CH₂Cl₂:acetona 5:1) se obtuvo el producto, 6,6 mg (21%), como un sólido de color canela. IR (CHCl₃, cm⁻¹) 3025, 2992, 2953, 1753, 1657, 1600, 1504, 1193; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,67 (s, 9H), 0,98 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,99-2,07 (m, 2H), 2,42 (s, 3H), 3,26 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,45 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,66 (br s, 1H), 5,18 (d, J = 19 Hz, 1H), 5,35 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,39 (d, J = 19 Hz, 1H), 5,66 (d, J = 15 Hz, 1H), 7,38 (dd, J₁ = 9 Hz, J₂ = 2 Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,88 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,92 (d, J = 2 Hz, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 1,6, 8,3, 21,5, 35,9, 42,6, 52,2, 62,2, 74,0, 100,5, 118,9, 122,9, 124,7, 131,3, 132,2, 135,0, 144,1, 144,8, 145,0, 148,9, 150,0, 156,0, 159,7, 169,1, 171,5; HRMS (EI) m/z calculado para el C₂₆H₂₈N₃O₆Si (M⁺) 492,1717, encontrado 492,1707 LRMS (EI) m/z 492 (M⁺), 477, 459, 450, 432, 421, 403, 393, 379, 365, 351, 336, 147.

50

(+/-) 5-Etil-1,4,5,13-tetrahidro-5-hidroxi-12-(ter-butildimetilsilil-3H,15H-oxepino [3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3,15-diona (1g)

(7-ter-butildimetilsililhomocamptotecina)

55

Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se hizo reaccionar la yodopiridona (10b) (25 mg, 0,05 mmoles) con fenilisonitrilo (15,5 mg, 0,15 mmoles) y hexametil-diastaño (25 mg, 0,075 mmoles) en benceno (0,75 mL). Por cromatografía (CH₂Cl₂:acetona 7:1) se obtuvo el compuesto (1g), 6,4 mg (27%), como un sólido de color canela. IR (CHCl₃, cm⁻¹) 3027, 2958, 2932, 2859, 1745, 1655, 1600, 1269, 1065; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,69 (s, 3H), 0,70 (s, 3H), 0,92 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,00 (s, 9H), 1,92-2,02 (m, J = 7 Hz, 2H), 3,23 (d, J = 13 Hz, 1H), 3,39 (d, J = 13 Hz, 1H), 3,90 (br s, 1H), 5,11 (d, J = 19 Hz, 1H), 5,31 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,40 (d, J = 19 Hz, 1H), 5,60 (d, J = 15 Hz, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,39-7,49 (m, 2H), 7,70 (d, J = 8 Hz, 1H), 8,07 (d, J = 8 Hz, 1H); RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ -0,5, -0,3, 8,3, 19,4, 27,3, 35,9, 42,7, 52,9, 62,3, 74,0, 100,3, 122,8, 126,9, 129,4, 130,3, 132,7, 136,0, 143,3, 145,3, 147,6, 150,1, 156,1, 159,9, 171,5; HRMS (EI) m/z calculado para el C₂₇H₃₂N₂O₄Si (M⁺) 476,2131, encontrado 476,2118 LRMS (EI) m/z 476 (M⁺), 458, 430, 419, 405, 389, 377, 361, 345, 319, 304, 275, 149, 117, 91, 73, 56.

65

ES 2 308 977 T3

(+/-) 5-Etil-1,4,5,13-tetrahidro-5-hidroxi-10-(ter-butiloxycarbonilamino)-12-ter-butildimetilsilil-3H,15H-oxepino [3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3,15-diona (1a)

(10-ter-butiloxycarbonilamino-7-ter-butildimetilsililhomocamptotecina)

5 Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se hizo reaccionar la yodopiridona (10b) (45 mg, 0,089 mmoles) con para-Boc-aminofenilisonitrilo (58 mg, 0,27 mmoles) y hexametil-diastaño (45 mg, 0,13 mmoles) en benceno (1,3 mL). Por cromatografía (CH₂Cl₂:acetona 10:1) se obtuvo el compuesto (1a), 7,8 mg (15%), como un sólido de color canela. IR (CHCl₃, cm⁻¹) 3435, 3022, 2931, 2859, 1738, 1654, 1563, 1528, 1156; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,76 (s, 3H), 0,77 (s, 3H), 0,96 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,10 (s, 9H), 1,62 (s, 9H), 1,91-2,07 (m, J = 7 Hz, 2H), 3,34 (d, J = 14 Hz, 1H) 3,41 (d, J = 14 Hz, 1H), 4,42 (br s, 1H), 5,09 (d, J = 19 Hz, 1H), 5,38 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,47 (d, J = 19 Hz, 1H), 5,62 (d, J = 15 Hz, 1H), 6,99 (br s, 1H), 7,21-7,25 (m, 2H), 7,45, (d, J = 9 Hz, 1H), 8,37 (d, J = 2 Hz, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ -0,9, -0,5, 8,3, 19,6, 27,4, 28,4, 35,5, 42,7, 53,0, 62,2, 73,8, 81,1, 100,0, 116,2, 122,2, 123,0, 130,3, 133,5, 136,3, 136,9, 144,4, 145,2, 148,2, 152,6, 156,4, 160,0, 171,5; HRMS (EI) m/z calculado para el C₃₂H₄₁N₃O₆Si (M⁺) 591,2765, encontrado 591,2751 LRMS (EI) m/z 534 (M-57), 516, 488, 477, 459, 435, 417, 393, 375, 111, 97, 83, 69, 57.

20 (+/-) 5-Etil-1,4,5,13-tetrahidro-5-hidroxi-10-acetoxi-12-ter-butildimetilsilil-3H,15H-oxepino[3',4':6,7]indolizino [1,2-b]quinolin-3,15-diona (1e)

(10-acetoxi-7-ter-butildimetilsililhomocamptotecina)

25 Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se hizo reaccionar la yodopiridona (10b) (45 mg, 0,089 mmoles) con para-acetoxifenilisonitrilo (43 mg, 0,27 mmoles) y hexametil-diastaño (45 mg, 0,13 mmoles) en benceno (1,3 mL). Por cromatografía (CH₂Cl₂:acetona 10:1) se obtuvo el compuesto (1e), 9,6 mg (20%), como un sólido de color canela. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,73 (s, 3H), 0,74 (s, 3H), 0,97 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,07 (s, 9H), 1,94-2,08 (m, J = 7 Hz, 2H), 2,42 (s, 3H), 3,29 (d, J = 14 Hz 1H), 3,44 (d, J = 14 Hz, 1H), 4,05 (br s, 1H), 5,16 (d, J = 19 Hz, 1H), 5,37 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,48 (d, J = 19 Hz, 1H), 5,65 (d, J = 15 Hz, 1H), 7,31 (dd, J₁ = 9 Hz, J₂ = 2 Hz, 1H) 7,36 (s, 1H), 7,70 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,97 (d, J = 2 Hz, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ -0,7, -0,5, 8,3, 19,3, 21,5, 27,2, 35,8, 42,7, 52,9, 62,2, 73,9, 100,4, 120,1, 122,8, 124,7, 131,1, 133,0, 136,5, 143,0, 145,0, 145,4, 148,9, 149,9, 156,2, 159,9, 169,0, 171,5; HRMS (EI) m/z calculado para el C₂₉H₃₄N₂O₆ (M⁺) 534,2186, encontrado 534,2188 LRMS (EI) m/z 534 (M⁺), 516, 488, 477, 459, 435, 417, 393, 375, 335, 320, 291, 275, 234, 164, 137, 125, 111, 97, 83, 69, 57.

35 (+/-) 5-Etil-1,4,5,13-tetrahidro-5-hidroxi-10-hidroxi-12-ter-butildimetilsilil-3H,15H-oxepino[3',4':6,7]indolizino [1,2-b]quinolin-3,15-diona (1f)

(10-hidroxi-7-ter-butildimetilsililhomocamptotecina)

40 El compuesto (1e) (11,9 mg, 0,022 mmoles) se disolvió en H₂O (0,3 mL) y MeOH (0,3 mL). A continuación, se añadió K₂CO₃ (7,5 mg, 0,054 mmoles) y la mezcla se agitó a 22°C. Después de 4 horas, se evaporó el disolvente y el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (2 mL) y TFA (2 mL). Después de agitación a 22°C durante 16 horas, se añadió cuidadosamente NaHCO₃ saturado hasta que se alcanzó un pH de 5. En este momento se extrajo la disolución con EtOAc (3 x 10 mL) y la fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo se cromatografió dos veces (1: CH₂Cl₂:MeOH:AcOH 94:5:1) (2: CH₂Cl₂:acetona 5:1) para dar el compuesto (1f), 8,6 mg (79%), como un sólido amarillo. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 0,65 (s, 6H), 0,90-0,99 (m, 12H), 1,89-2,05 (m, 2H), 3,14 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,34 (d, J = 14 Hz, 1H), 5,23 (s, 2H), 5,35 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,57 (d, J = 15 Hz, 1H), 7,42 (dd, J₁ = 9 Hz, J₂ = 2 Hz, 1H), 7,58 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,70 (s, 1H), 8,16 (d, J = 9 Hz, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ -1,1, 8,1, 19,2, 26,9, 36,1, 42,1, 52,8, 62,1, 73,5, 101,8, 111,5, 122,7, 123,6, 127,5, 129,0, 135,0, 136,6, 139,8, 143,1, 145,5, 156,7, 156,9, 159,6, 172,8; HRMS (EI) m/z calculado para el C₂₇H₃₂N₂O₅Si (M⁺) 492,2080, encontrado 492,2087 LRMS (EI) m/z 492 (M⁺), 474, 446, 435, 421, 393, 375, 346, 335, 315, 291, 273, 259, 231, 183, 155.

55 (+/-) 5-Etil-1,4,5,13-tetrahidro-5-hidroxi-10-amino-12-ter-butildimetilsilil-3H,15H-oxepino[3',4':6,7]indolizino [1,2-b]quinolin-3,15-diona (1b)

(10-amino-7-ter-butildimetilsililhomocamptotecina)

60 Se añadió ácido trifluoroacético (0,1 mL) a una disolución que contenía CH₂Cl₂ (0,5 mL) y el compuesto (1a) (8,1 mg, 0,014 mmoles) y el contenido se agitó a 22°C. Después de 5 horas, la mezcla se vertió en NaHCO₃ saturado (2 mL) y se extrajo con EtOAc (6 x 2 mL). El EtOAc se secó (Na₂SO₄), se concentró y se cromatografió (CH₂Cl₂:MeOH 96:4) para dar el compuesto (1b), 6 mg (89%), como un sólido amarillo. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 0,28 (s, 6H), 0,78-0,88 (m, 12H), 1,78-1,90 (m 2H), 3,04 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,24 (d, J = 14 Hz, 1H), 5,02-5,11 (m, 2H), 5,24 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,46 (d, J = 15 Hz, 1H), 7,20 (s, 1H), 7,26 (dd, J₁ = 9 Hz, J₂ = 2 Hz, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ -1,0, 8,0, 19,1, 26,9, 36,1, 42,1, 52,7, 62,1, 73,4, 100,7, 122,0, 123,2, 130,5, 134,3, 136,8, 141,8, 144,2, 147,1, 156,7, 159,7, 172,8; HRMS (EI) m/z calculado para el C₂₇H₃₃N₃O₄Si (M⁺) 491,2240, encontrado 491,2242 LRMS (EI) m/z 491 (M⁺), 434, 392, 376, 319, 279, 262, 223, 178, 167, 149, 136, 121, 107, 91, 77, 57.

ES 2 308 977 T3

(+/-) 5-Etil-1,4,5,13-tetrahidro-5-hidroxi-10-amino-12-trimetilsilil-3H,15H-oxepino [3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3,15-diona (1d)

(10-amino-7-trimetilsililhomocamptotecina)

Se añadió ácido trifluoroacético (0,1 mL) a una disolución que contenía CH₂Cl₂ (0,5 mL) y el compuesto (1c) (6,6 mg, 0,012 mmoles) y el contenido se agitó a 22°C. Después de 5 horas, la mezcla se vertió en NaHCO₃ saturado (2 mL) y se extrajo con EtOAc (6 x 2 mL). El EtOAc se secó (Na₂SO₄), se concentró y se cromatografió (CH₂Cl₂:MeOH 95:5) para dar el compuesto (1d), 2,5 mg (45%), como un sólido rojo-anaranjado. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 0,60 (s, 9H), 0,94 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,92-2,05 (m, 2H), 3,16 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,46 (d, J = 14 Hz, 1H), 5,24 (s, 2H), 5,40 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,61 (d, J = 15 Hz, 1H), 7,25-7,32 (m, 2H), 7,52 (s, 1H), 7,89 (d, J = 9 Hz, 1H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ -0,12, 7,1, 35,7, 41,5, 51,6, 61,3, 72,8, 99,3, 107,0, 120,4, 121,7, 129,9, 133,6, 134,4, 139,5, 141,0, 144,7, 145,2, 146,4, 156,2, 159,3, 172,6; HRMS (EI) m/z calculado para el C₂₄H₂₇N₃O₄Si (M⁺) 449,1771, encontrado 449,1791 (LRMS (EI) m/z 449 (M⁺), 434, 402, 389, 374, 350, 335, 304, 178, 73. (+/-).

(+/-) 5-Etil-1,4,5-trihidro-5-hidroxi-7-yodo-(5-trimetilsilil-2-pentini)oxepino[3,4-c]piridin-3,9-diona (10c)

Seguendo el procedimiento resumido anteriormente, la yodopiridona (9) (0,106 g, 0,92 mmoles) se N-alquiló con bromuro de 2-trimetilsililetilpropargilo (0,43 g, 1,84 mmoles). Por cromatografía ultra-rápida (CH₂Cl₂:EtOAc 10:1) se obtuvo la yodopiridona (10c), 68 mg (46%), como una espuma de color amarillo claro. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ -0,069 (s, 9H), 0,72 (t, J = 8 Hz, 2H), 0,87 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,70-1,88 (m, 2H), 2,10-2,20 (m, 2H), 2,96 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,15 (br s, 1H), 3,27 (d, J = 14 Hz, 1H), 4,90-5,00 (m, 2H), 5,07 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,41 (d, J = 15 Hz, 1H); RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ -1,6, 8,2, 13,5, 15,7, 35,9, 42,5, 45,3, 62,7, 72,5, 73,4, 88,0, 99,7, 119,2, 122,8, 153,9, 160,4, 171,8; HRMS (EI) m/z calculado para el C₁₉H₂₆INO₄Si (M⁺) 487,0676, encontrado 487,0676 LRMS (EI) m/z 487 (M⁺), 472, 400, 374, 346, 96, 73.

(+/-) 5-Etil-1,4,5,13-tetrahidro-5-hidroxi-12-(2-trimetilsililetil)-3H,15H-oxepino [3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3,15-diona (1i)

(7-(2-trimetilsililetil)homocamptotecina)

Este compuesto no es un compuesto según la reivindicación 1.

En un tubo a presión secado en horno se añadió en atmósfera de Ar la yodopiridona (10c) (16 mg, 0,033 mmoles) seguido por benceno (0,5 mL). Después se añadieron fenilisonitrilo (10,2 mg, 0,1 mmoles) y hexametil-diastaño (16,7 mg, 0,051 mmoles) y el tubo se llenó con Ar, se selló y se colocó enfrente de una lámpara solar GE de 275 W. Después de 12 horas de irradiación, la mezcla se concentró y se cromatografió (CH₂Cl₂:acetona 4:1) para dar la homocamptotecina (1i) deseada, 3,6 mg (24%) como un sólido de color canela. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,184 (s, 9H), 0,85-1,05 (m, 5H), 1,98-2,10 (m, 2H), 3,00-3,12 (m, 2H), 3,18 (d, J = 14 Hz, 2H), 3,48 (d, J = 13 Hz, 1H), 5,14 (d, J = 19 Hz, 1H), 5,24 (d, J = 19 Hz, 1H), 5,34 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,71 (d, J = 15 Hz, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,57-7,63 (m, 1H), 7,70-7,77 (m, 1H), 7,94 (d, J = 8 Hz, 1H), 8,10 (d, J = 8 Hz, 1H); HRMS (EI) m/z calculado para el C₂₆H₃₀N₂O₄Si (M⁺) 462,1975, encontrado 462,1976 LRMS (EI) m/z 462 (M⁺), 447, 415, 402, 391, 377, 363, 348, 317, 289, 243, 231, 73, 59.

(+/-) 5-Etil-1,4,5,13-tetrahidro-5-hidroxi-10-(ter-butiloxicarbonilamino)-12-(2-trimetilsililetil)-3H,15H-oxepino [3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3,15-diona (1j)

(10-ter-butoxicarbonilamino-7-(2-trimetilsililetil)homocamptotecina)

Seguendo el procedimiento descrito anteriormente, se hizo reaccionar la yodopiridona (10c) (16 mg, 0,033 mmoles) con para-Boc-aminofenilisonitrilo (21,6 mg, 0,1 mmoles) y hexametil-diastaño (16,7 mg, 0,051 mmoles) en benceno (0,5 mL). Por cromatografía (CH₂Cl₂:acetona 7:1) se obtuvo el compuesto (1j), 10,7 mg (56%), como un sólido marrón. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,20 (s, 9H), 0,83-0,93 (m, 2H), 0,99 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,60 (s, 9H), 1,93-2,10 (m, 2H), 2,90-3,05 (m, 2H), 3,24 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,44 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,74 (br s, 1H), 5,03 (d, J = 19 Hz, 1H), 5,20 (d, J = 19 Hz, 1H), 5,33 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,67 (d, J = 15 Hz, 1H), 6,85 (s, 1H), 7,35-7,44 (m, 2H), 7,85 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,11 (br s, 1H); HRMS (EI) m/z calculado para el C₃₁H₃₉N₃O₆Si (M⁺) 577,2608, encontrado 577,2611 LRMS (EI) m/z 577 (M⁺), 521, 477, 462, 434, 417, 378, 304, 260, 178, 108, 73.

ES 2 308 977 T3

(+/-) 5-Etil-1,4,5,13-tetrahidro-5-hidroxi-10-acetoxi-12-(2-trimetilsililetil)-3H,15H-oxepino[3',4':6,7]indolizino [1,2-b]quinolin-3,15-diona (1k)

(10-acetoxi-7-(2-trimetilsililetil)homocamptotecina)

5

Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se hizo reaccionar la yodopiridona (10c) (16 mg, 0,033 mmoles) con para-acetoxifenilisonitrilo (16 mg, 0,1 mmoles) y hexametil-diestaño (16,7 mg, 0,051 mmoles) en benceno (0,5 mL). Por cromatografía (CH₂Cl₂:acetona 5:1) se obtuvo el compuesto (1k), 7,1 mg (41%), como un sólido de color canela. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,19 (s, 9H), 0,82-0,89 (m, 2H), 0,99 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,95-2,06 (m, 2H), 2,42 (s, 3H), 2,94-2,98 (m, 2H), 3,23 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,46 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,59 (br s, 1H), 5,08 (d, J = 19 Hz, 1H), 5,24 (d, J = 19 Hz, 1H), 5,35 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,68 (d, J = 15 Hz, 1H), 7,41-7,49 (m, 2H), 7,60 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,96 (d, J = 9 Hz, 1H); HRMS (EI) m/z calculado para el C₂₈H₃₂N₂O₆Si (M⁺) 520,2030, encontrado 520,2017 LRMS (EI) m/z 520 (M⁺), 491, 478, 463, 449, 431, 421, 406, 393, 379, 333, 305, 261, 178, 109, 73.

15

(+/-) 5-Etil-1,4,5,13-tetrahidro-5-hidroxi-10-hidroxi-12-(2-trimetilsililetil)-3H,15H-oxepino[3',4':6,7]indolizino [1,2-b]quinolin-3,15-diona (1l)

(10-hidroxi-7-(2-trimetilsililetil)homocamptotecina)

20

Siguiendo el procedimiento resumido anteriormente, se hizo reaccionar el compuesto (1k) (7,1 mg, 0,014 mmoles) con K₂CO₃ (4 mg, 0,028 mmoles) en una disolución de MeOH/H₂O. El residuo se cromatografió (CH₂Cl₂:acetona 7:1 para obtener el compuesto (1l), 2,6 mg (39%), como un sólido amarillo. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 0,042 (s, 9H), 0,68-0,92 (m, 5H), 1,80-1,95 (m, 2H), 2,83-2,95 (m, 2H), 3,07 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,28 (d, J = 14 Hz, 1H), 5,05 (s, 2H), 5,29 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,51 (d, J = 15 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,26-7,34 (m, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,89 (d, J = 9 Hz, 1H); HRMS (EI) m/z calculado para el C₂₆H₃₀N₂O₅Si (M⁺) 478,1924, encontrado 478,1915 LRMS (EI) m/z 478 (M⁺), 463, 431, 418, 393, 379, 364, 305, 261, 153, 117, 105, 91, 73, 59.

30

(+/-) 5-Etil-1,4,5,13-tetrahidro-5-hidroxi-10-amino-12-(2-trimetilsililetil)-3H,15H-oxepino[3',4':6,7]indolizino [1,2-b]quinolin-3,15-diona (1m)

(10-amino-7-(2-trimetilsililetil)homocamptotecina)

35

Se añadió ácido trifluoroacético (0,1 mL) a una disolución que contenía CH₂Cl₂ (0,5 mL) y el compuesto (1i) (10,7 mg, 0,018 mmoles) y el contenido se agitó a 22°C. Después de 5 horas, la mezcla se vertió en NaHCO₃ saturado (2 mL) y se extrajo con EtOAc (6 x 2 mL). El EtOAc se secó (Na₂SO₄), se concentró y se cromatografió (CH₂Cl₂:MeOH 96:4) para dar el compuesto (1m), 6,7 mg (78%), como un sólido amarillo. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 0,059 (s, 9H), 0,70-0,92 (m, 5H), 1,82-1,98 (m, 2H), 2,80-2,92 (m, 2H), 3,08 (d, J = 14 Hz, 1H), 3,29 (d, J = 14 Hz, 1H), 5,00 (s, 2H), 5,29 (d, J = 15 Hz, 1H), 5,52 (d, J = 15 Hz, 1H), 6,95 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,18 (dd, J₁ = 9 Hz, J₂ = 2 Hz, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,83 (d, J = 9 Hz, 1H).

45

50

55

60

65

5



20

25

30

40

45

50

55

60

65

$$R^{16} \text{ es } -C(O)R^f \text{ o } H;$$

o uno de los compuestos:

- 7-trimetilsililhomocamptotecina;

- 7-ter-butildimetilsililhomocamptotecina;

y sus sales farmacéuticamente aceptables;

donde:

- alquilo es un grupo hidrocarbonado ramificado o no ramificado, cíclico o acíclico que tiene de 1 a 15 átomos de carbono (a menos que se indique de otra forma); opcionalmente sustituido con un grupo elegido entre: un grupo bencilo, un grupo fenilo, un grupo alcoxi como se define a continuación, un grupo hidroxilo, un grupo amino como se define a continuación, un grupo alquilamino, un grupo dialquilamino, un grupo arilamino donde el arilo es fenilo o naftilo, un grupo alquenilo como se define a continuación, un grupo alquinilo como se define a continuación o un grupo aciloxi como se define a continuación;
- alquenilo es un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada con al menos un doble enlace, que tiene de 2 a 15 átomos de carbono (a menos que se indique de otra forma), opcionalmente sustituido con un grupo alquilo, un grupo aminoalquilo, un grupo bencilo o un grupo alcoxialquilo;
- alquinilo es un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada con al menos un tripe enlace, que tiene de 2 a 15 átomos de carbono (a menos que se indique de otra forma), opcionalmente sustituido con un grupo alquilo, un grupo aminoalquilo, un grupo bencilo o un grupo alcoxialquilo;
- alcoxi es un grupo de fórmula $-OR^d$, donde R^d es un grupo alquilo C_{1-15} (a menos que se indique de otra forma); y
- aciloxi es un grupo de fórmula $-OC(O)R^d$, donde R^d es como se ha definido anteriormente.

2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R^{16} es H.

3. El compuesto según la reivindicación 2, en el que R^2 y R^3 juntos forman un grupo de fórmula $-O(CH_2)_nO-$ en la que n representa el número entero 1 ó 2.

4. El compuesto según la reivindicación 2, en el que R^5 es un grupo etilo, un grupo alilo, un grupo bencilo o un grupo propargilo.

5. El compuesto según la reivindicación 2, en el que R^{13} es H.

6. El compuesto según la reivindicación 5, en el que R^5 es un grupo etilo.

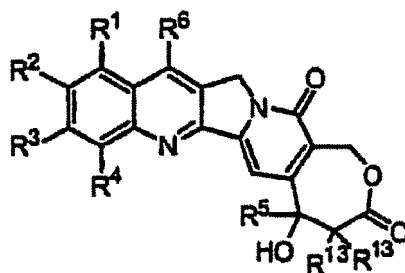
7. El compuesto según la reivindicación 6, en el que R^4 es H.

8. El compuesto según la reivindicación 7, en el que R^8 y R^9 son grupos metilo, R^{10} es un grupo ter-butilo o un grupo metilo, R^1 es H y R^3 es H.

9. El compuesto según la reivindicación 8, en el que R^2 es NH_2 u OH.

10. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que R^6 es $-Si(R^8R^9R^{10})$.

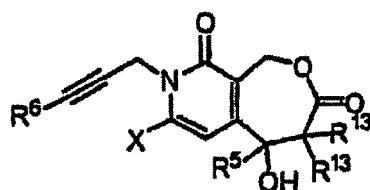
11. Un método de síntesis de un compuesto que tiene la fórmula:



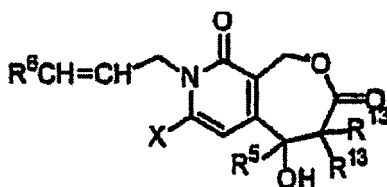
en la que R¹ y R² son independientemente el mismo o diferentes y son hidrógeno, -C(O)R^f, donde R^f es como se ha definido en la reivindicación 1, un grupo alquilo como se ha definido en la reivindicación 1, un grupo alqueno como se ha definido en la reivindicación 1, un grupo alquino como se ha definido en la reivindicación 1, un grupo alcoxi como se ha definido en la reivindicación 1, un grupo arilo como se ha definido en la reivindicación 1, un grupo acilo como se define a continuación, un grupo alcocarbonilo como se define a continuación, un grupo carbamoilo como se define a continuación, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo nitrilo, un grupo ciano, un grupo azido, un grupo formilo, un grupo hidrazino, un grupo amino de fórmula -NR^aR^b, -SR^c; o R¹ y R² juntos forman una cadena de tres o cuatro miembros elegidos entre el grupo de CH, CH₂, O, S, NH o NR¹⁵, donde R¹⁵ es un grupo alquilo C₁-C₆;

y en la que R^3, R^4, R^5, R^6 y R^{13} son como se han definido en la reivindicación 1,

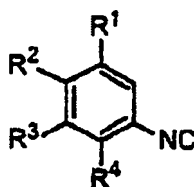
mediante una anulación 4+1 en cascada de radicales, en la que el precursor:



o el precursor:



se hacen reaccionar con un arilisonitrilo que tiene la fórmula:



en la que X es un precursor de radicales elegido entre el grupo que consiste en Cl, Br, I, ácidos carboxílicos y sus derivados, selenofenilo y sales de diazonio.

12. El método según la reivindicación 11, en el que R^2 y R^3 juntos forman un grupo de fórmula $-O(CH_2)_nO-$ en la que n representa el número entero 1 ó 2.

13. El método según la reivindicación 11, en el que R^5 es un grupo etilo, un grupo alilo, un grupo bencilo o un grupo propargilo.

14. El método según la reivindicación 11, en el que X es Br o I.

15. El método según la reivindicación 14, en el que R^{13} es H.

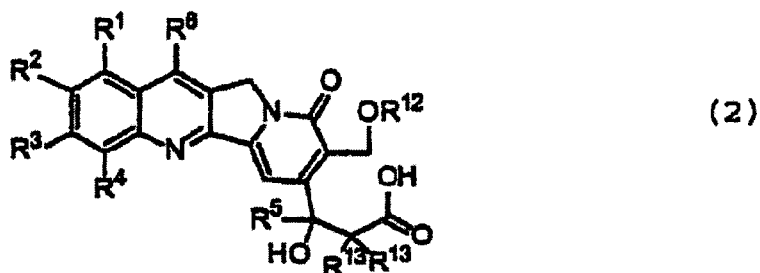
16. El método según la reivindicación 15, en el que R^5 es un grupo etilo.

17. El método según la reivindicación 16, en el que R^4 es H.

18. El método según la reivindicación 17, en el que R^8 y R^9 son grupos metilo, R^{10} es un grupo ter-butilo o un grupo metilo, R^1 es H y R^3 es H.

19. El método según la reivindicación 18, en el que R^2 es H, NH_2 u OH.

20. Un compuesto que tiene la fórmula:



en forma racémica, forma enantioméricamente enriquecida o forma enantioméricamente pura;

en la que R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 y R^{13} son como se han definido en la reivindicación 1,

y en la que R^{12} es H o $-C(O)R^f$, $-C(O)OR^d$ o $-C(O)NR^aR^b$; donde R^a , R^b , R^d y R^f son como se han definido en la reivindicación 1.

21. El compuesto según la reivindicación 20, en el que R^2 y R^3 juntos forman un grupo de fórmula $-O(CH_2)_nO-$ en la que n representa el número entero 1 ó 2.

22. El compuesto según la reivindicación 20, en el que R^5 es un grupo etilo, un grupo alilo, un grupo bencilo o un grupo propargilo.

23. El compuesto según la reivindicación 20, en el que R^{13} es H.

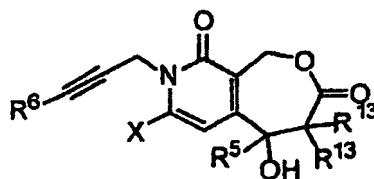
24. El compuesto según la reivindicación 23, en el que R^5 es un grupo etilo.

25. El compuesto según la reivindicación 24, en el que R^4 es H.

26. El compuesto según la reivindicación 25, en el que R^8 y R^9 son grupos metilo, R^{10} es un grupo ter-butilo o un grupo metilo, R^1 es H y R^3 es H.

27. El compuesto según la reivindicación 26, en el que R^2 es NH_2 u OH.

28. Un compuesto que tiene la fórmula:



en forma racémica, forma enantioméricamente enriquecida o forma enantioméricamente pura;

en la que R^5 , R^6 y R^{13} son como se han definido en la reivindicación 1;

en la que X es un precursor de radicales como se ha definido en la reivindicación 11.

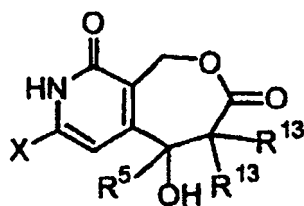
29. El compuesto según la reivindicación 28, en el que R^5 es un grupo etilo, un grupo alilo, un grupo bencilo o un grupo propargilo.

30. El compuesto según la reivindicación 28, en el que X es Br o I.

31. El compuesto según la reivindicación 30, en el que R^{13} es H.

32. El compuesto según la reivindicación 31, en el que R^5 es un grupo etilo.

33. Un compuesto que tiene la fórmula:



en forma racémica, forma enantioméricamente enriquecida o forma enantioméricamente pura;

en la que R^5 y R^{13} son como se han definido en la reivindicación 1;

en la que X es un precursor de radicales como se ha definido en la reivindicación 11.

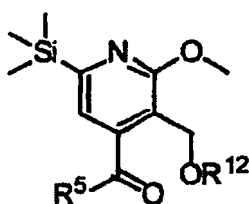
34. El compuesto según la reivindicación 33, en el que R^5 es un grupo etilo, un grupo alilo, un grupo bencilo o un grupo propargilo.

35. El compuesto según la reivindicación 34, en el que X es Br o I.

36. El compuesto según la reivindicación 34, en el que R^{13} es H.

37. El compuesto según la reivindicación 36, en el que R^5 es un grupo etilo.

38. Un compuesto que tiene la fórmula:

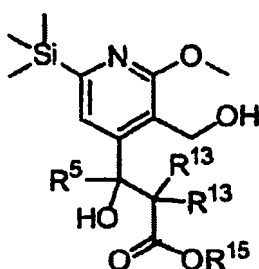


en la que R^5 es como se ha definido en la reivindicación 1 y R^{12} es como se ha definido en la reivindicación 20.

39. El compuesto según la reivindicación 38, en el que R^5 es un grupo etilo, un grupo alilo, un grupo bencilo o un grupo propargilo.

40. El compuesto según la reivindicación 39, en el que R^5 es un grupo etilo.

41. Un compuesto que tiene la fórmula:



en la que R^5 y R^{13} son como se han definido en la reivindicación 1; y R^{15} es un grupo alquilo C_{1-6} .

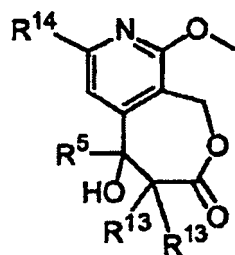
en la que X es un precursor de radicales como se ha definido en la reivindicación 11.

42. El compuesto según la reivindicación 41, en el que R^5 es un grupo etilo, un grupo alilo, un grupo bencilo o un grupo propargilo.

43. El compuesto según la reivindicación 42, en el que R^{13} es H.

44. El compuesto según la reivindicación 43, en el que R^5 es un grupo etilo.

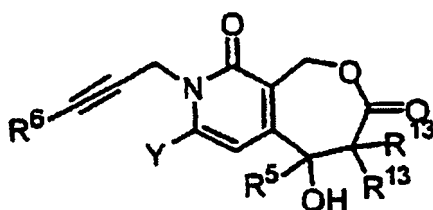
45. Un compuesto que tiene la fórmula:



en forma racémica, forma enantioméricamente enriquecida o forma enantioméricamente pura;

en la que R⁵ y R¹³ son como se han definido en la reivindicación 1 y R¹⁴ es SiMe₃, I o Br.

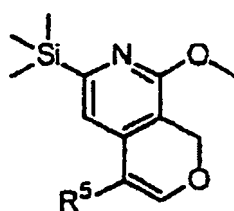
46. Un método de síntesis de un compuesto que tiene la fórmula siguiente:



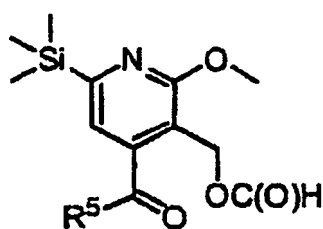
en la que R⁵, R⁶ y R¹³ son como se han definido en la reivindicación 1; y

en la que Y es Cl, Br o I; que comprende las etapas de:

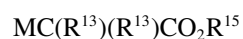
(a) tratar un enol éter de estructura:



en condiciones de escisión oxidante adecuadas para formar un compuesto que tiene la estructura:

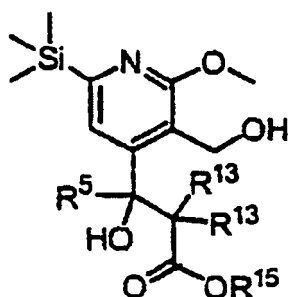


(b) tratar el compuesto formado en la etapa (a) con un reactivo organometálico que tiene la estructura:

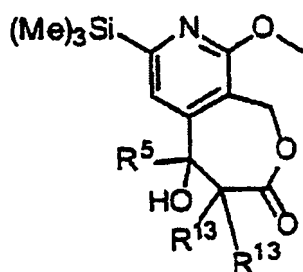


ES 2 308 977 T3

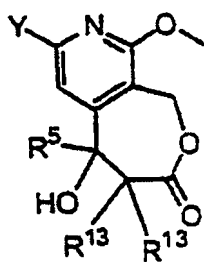
en la que M es Li, Na, K, MgY o ZnY, y R¹⁵ es un grupo alquilo C₁-C₆ en condiciones adecuadas para formar un compuesto que tiene la estructura:



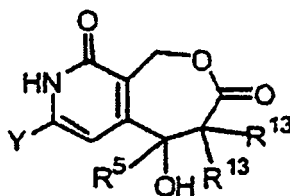
(c) tratar el compuesto formado en la etapa (b) en condiciones adecuadas con ácido para formar un compuesto que tiene la estructura:



(d) tratar el compuesto formado en la etapa (c) en condiciones adecuadas de desililación halogenante para formar un compuesto que tiene la estructura:



(e) tratar el compuesto de la etapa (d) con ácido o con yodotrimetilsilano en condiciones adecuadas para la desmetilación, para proporcionar un compuesto de la estructura siguiente:

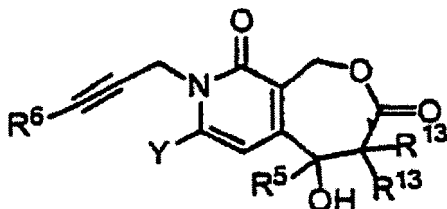


(f) tratar el compuesto de la etapa (e) con una base de litio o una base de sodio en presencia de una sal inorgánica de litio para desprotonar el átomo de nitrógeno;

(g) hacer reaccionar la especie desprotonada resultante de la etapa (f) con un compuesto de la estructura siguiente:



en la que Z es I, Br, Cl, un grupo mesilato o un grupo tosilato, y en condiciones adecuadas para producir la formación del compuesto de la estructura siguiente:



47. El método según la reivindicación 46, en el que R⁵ es un grupo etilo, un grupo alilo, un grupo bencilo o un grupo propargilo.

48. El método según la reivindicación 47, en el que R¹³ es H.

49. El método según la reivindicación 48, en el que R⁵ es un grupo etilo.

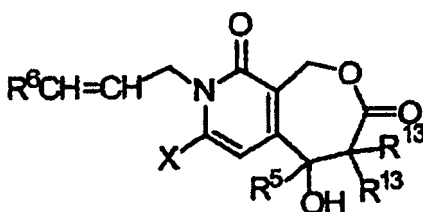
50. Un compuesto según la reivindicación 1 para usarlo para tratar a un paciente que padece cáncer o leucemia.

51. El compuesto para usarlo según la reivindicación 50, donde cáncer es cáncer de cerebro o cáncer de mama.

52. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer o la leucemia.

53. Uso según la reivindicación 52, donde el cáncer es cáncer de cerebro o cáncer de mama.

54. Un compuesto que tiene la fórmula:



en forma racémica, forma enantioméricamente enriquecida o forma enantioméricamente pura;

en la que R⁵, R⁶ y R¹³ son como se han definido en la reivindicación 1; y

en la que X es un precursor de radicales como se ha definido en la reivindicación 11.

55. El compuesto según la reivindicación 54, en el que R⁵ es un grupo etilo, un grupo alilo, un grupo bencilo o un grupo propargilo.

56. El compuesto según la reivindicación 55, en el que X es Br o I.

57. El compuesto según la reivindicación 56, en el que R¹³ es H.

58. El compuesto según la reivindicación 57, en el que R⁵ es un grupo etilo.

Síntesis de precursores de la reacción en cascada de radicales

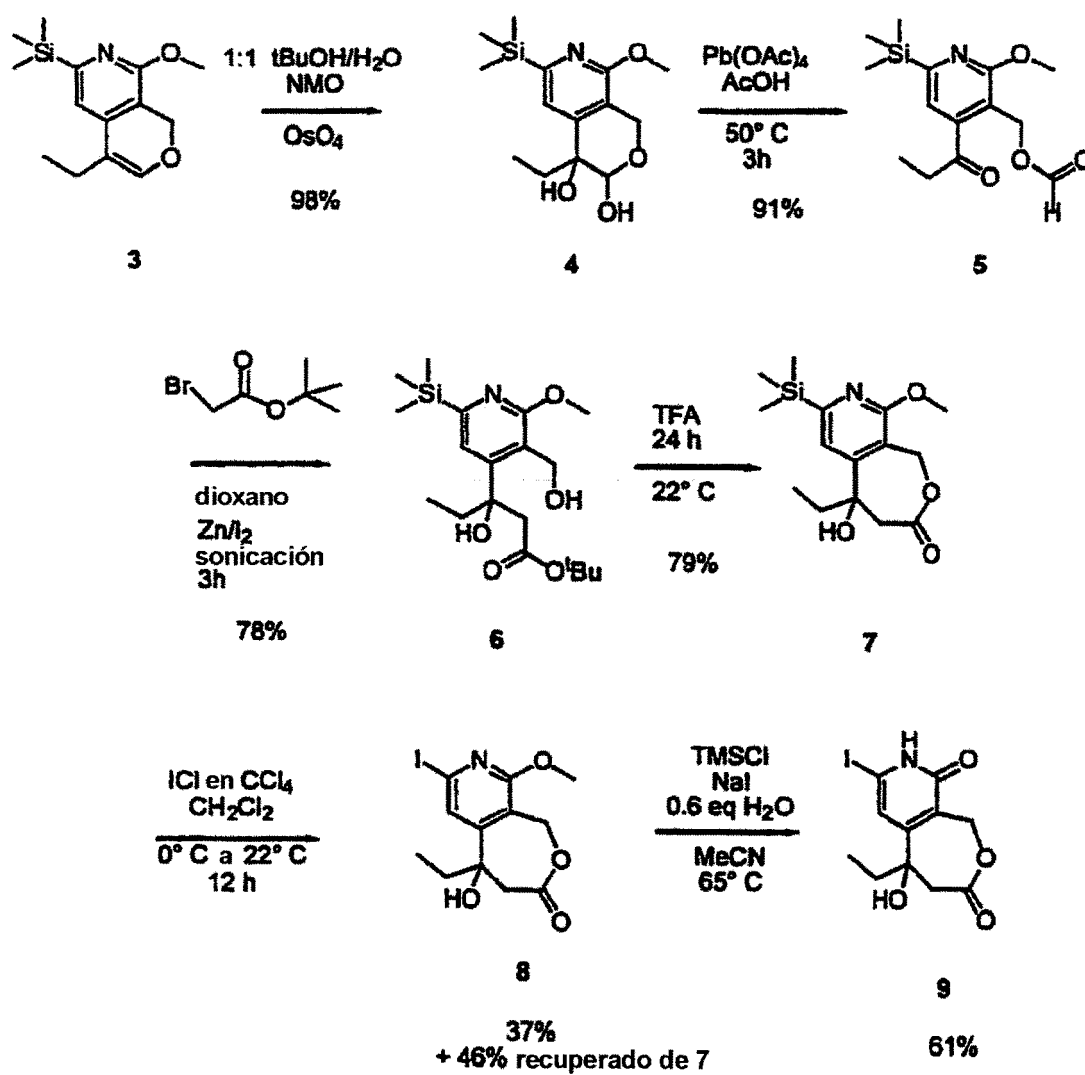
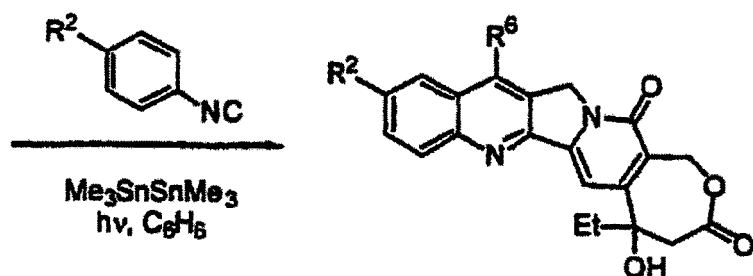
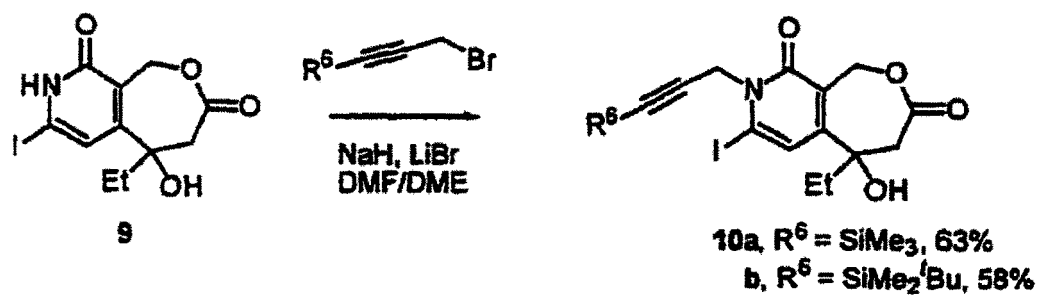


FIG. 1

Síntesis de los nuevos derivados de homosilatecano modificados en el anillo AB



	R^6	R^2	Rendimiento
1a	SiMe_2^tBu	NHBoc	15%
1b	SiMe_2^tBu	NH_2	89%
1c	SiMe_3	NHBoc	53%
1d	SiMe_3	NH_2	45%
1e	SiMe_2^tBu	OAc	20%
1f	SiMe_2^tBu	OH	79%
1g	SiMe_2^tBu	H	27%
1h	SiMe_3	H	37%

FIG. 2A

Vía general para la obtención de homocamptotecinas
sustituidas en A, B y A/B

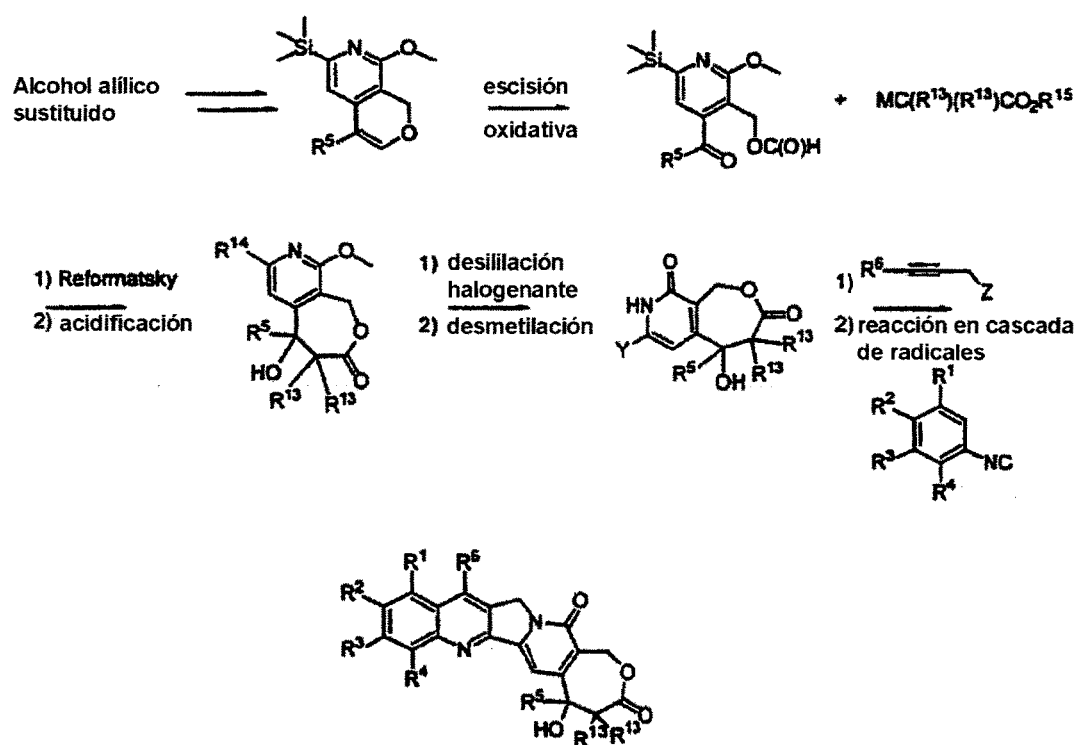


FIG. 2B

Espectros de emisión de fluorescencia del DB-38 1 μ M

Concentración de lípido 5mM, $\lambda_{\text{ex}} = 410$ nm,
resolución de excitación 4 nm, resolución de emisión 4 nm,
sin polarizador de emisión, HV = 820 V

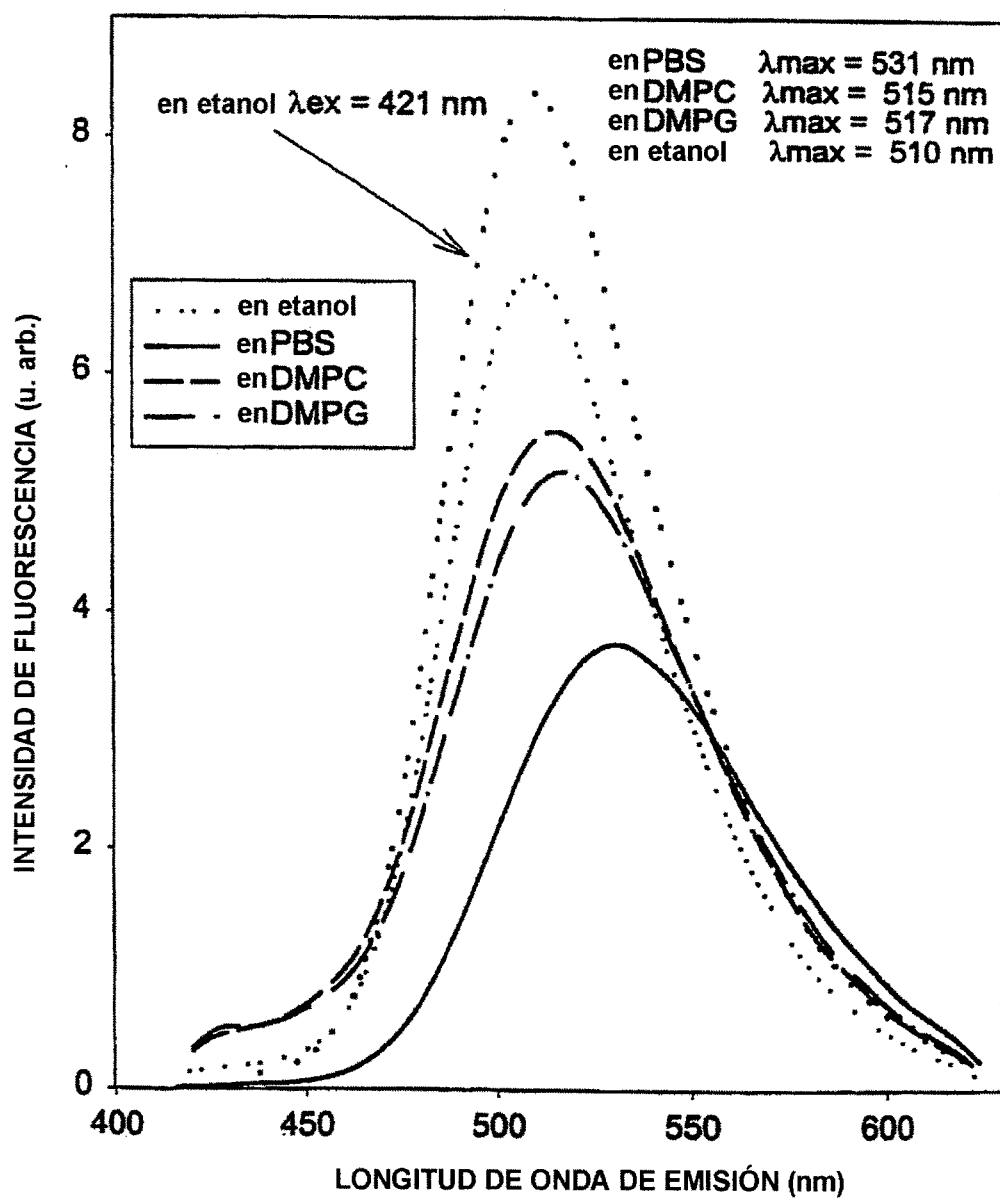


FIG. 3

Enlace de equilibrio del DB-38, DB-81, DB-91,
CPT y TTP con la DMPC a 37°C

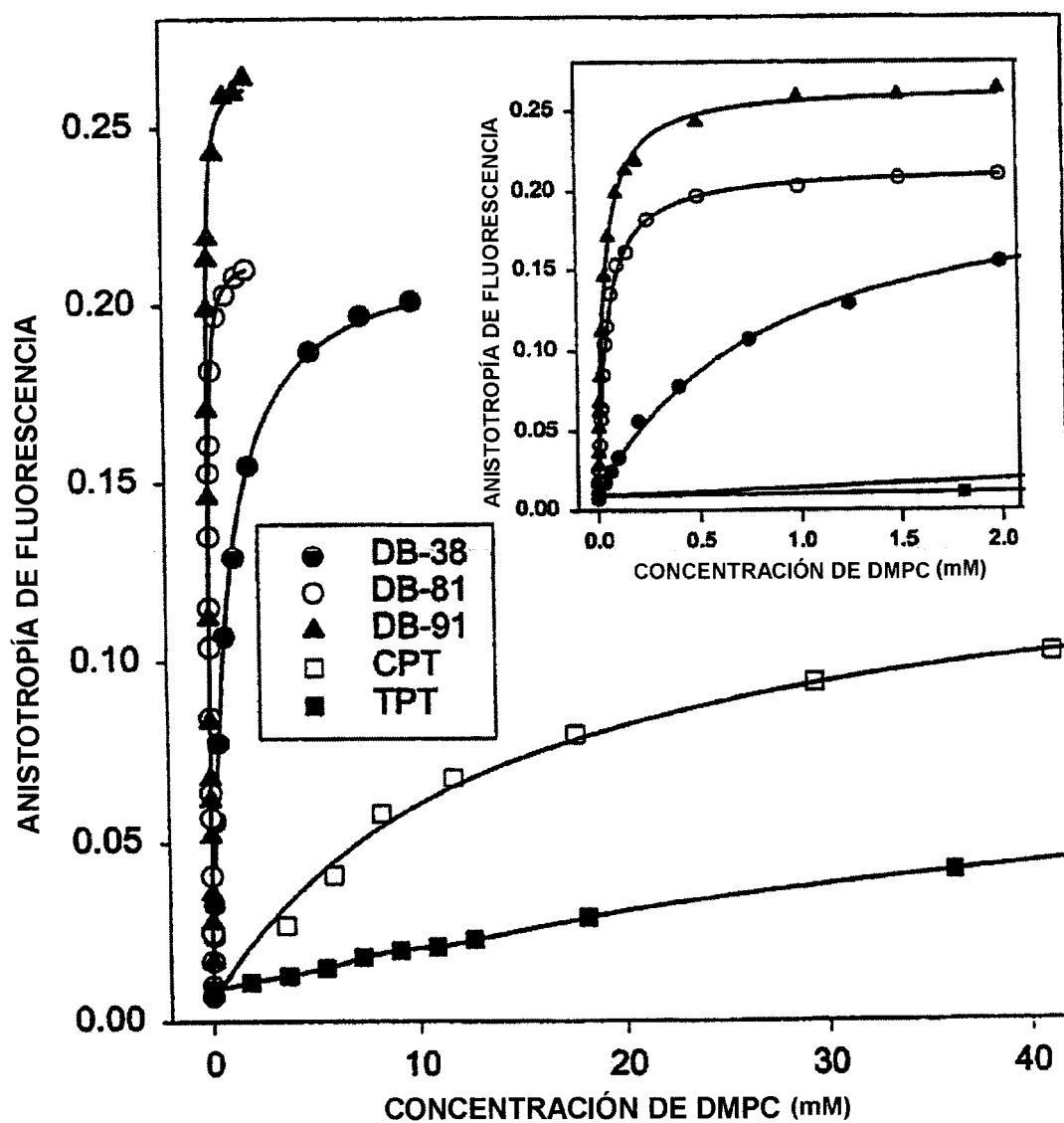


FIG. 4

Espectros de emisión de fluorescencia del DB-91 en disolución de etanol y disolución de PBS y sus mezclas
 $\lambda_{\text{ex}} = 394 \text{ nm}$, resolución de excitación 4 nm, resolución de emisión 4 nm, sin polarizador de emisión, HV = 840 V

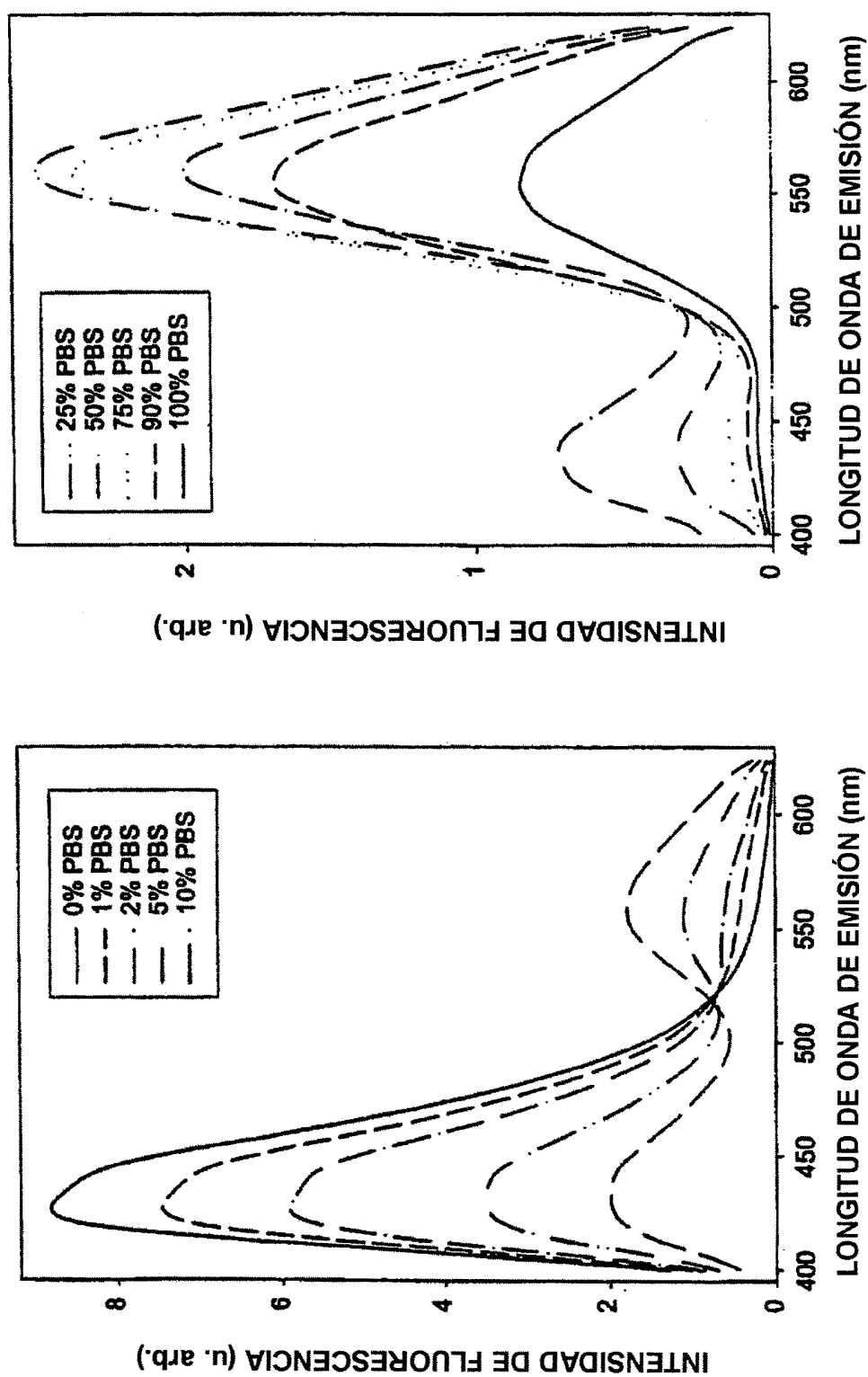


FIG. 5

Espectros de emisión de fluorescencia del DB-91 en glóbulos rojos (a) y espectros de emisión de fluorescencia normalizados del DB-91 10 μ M en glóbulos rojos y PBS (b). Los espectros se obtuvieron usando el método de cara frontal. $\lambda_{\text{ex}} = 370$ nm, resolución de excitación 8 nm, resolución de emisión 4 nm, sin polarizador de emisión, HV = 1260 V

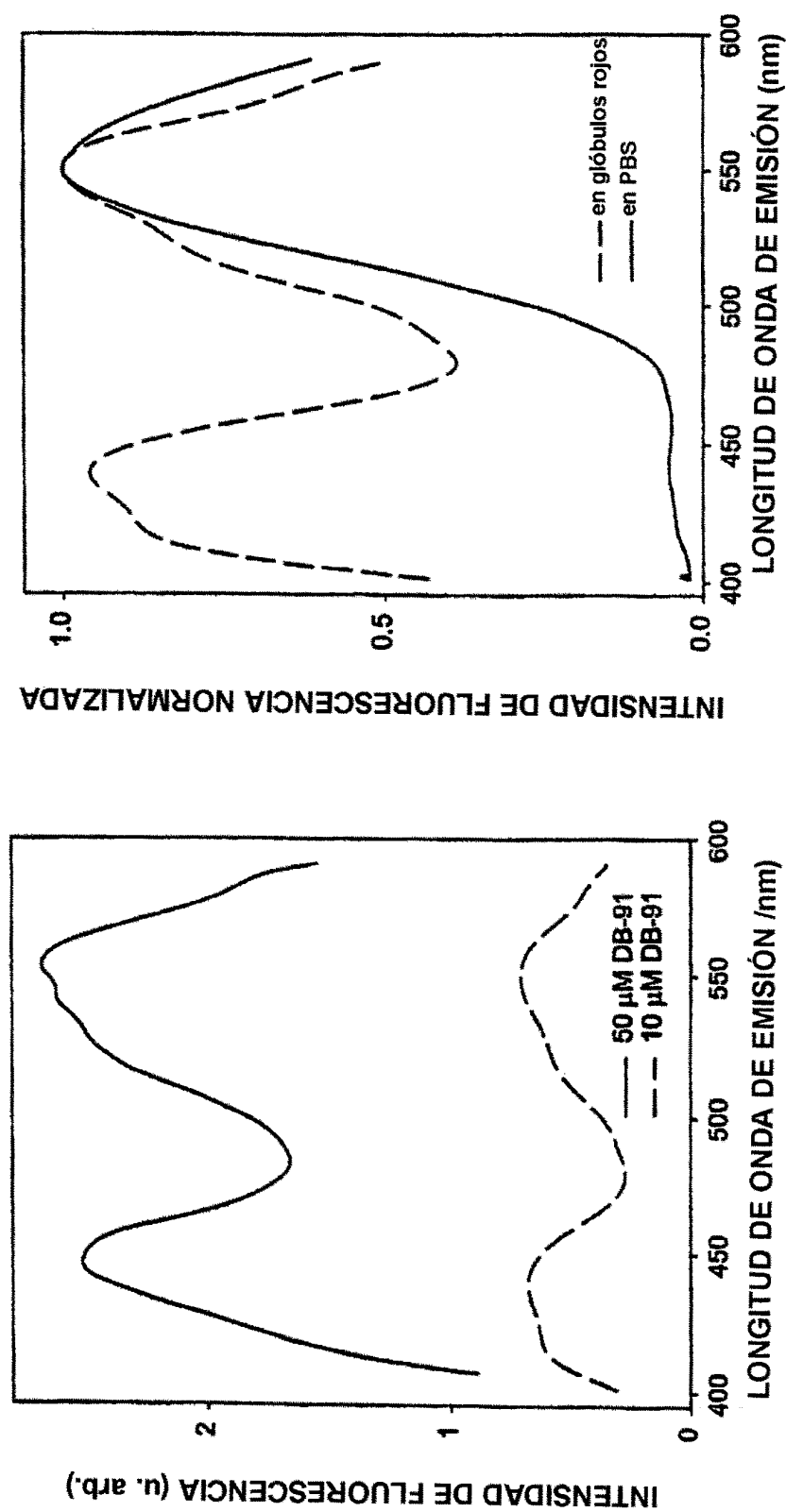


FIG. 6

Espectros de emisión de fluorescencia del SN-38 en glóbulos rojos (a) y espectros de emisión de fluorescencia normalizados del SN-38 10 μM en glóbulos rojos y PBS (b). Los espectros se obtuvieron usando el método de cara frontal. $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$, resolución de excitación 8 nm, resolución de emisión 4 nm, sin polarizador de emisión, HV = 1260 V

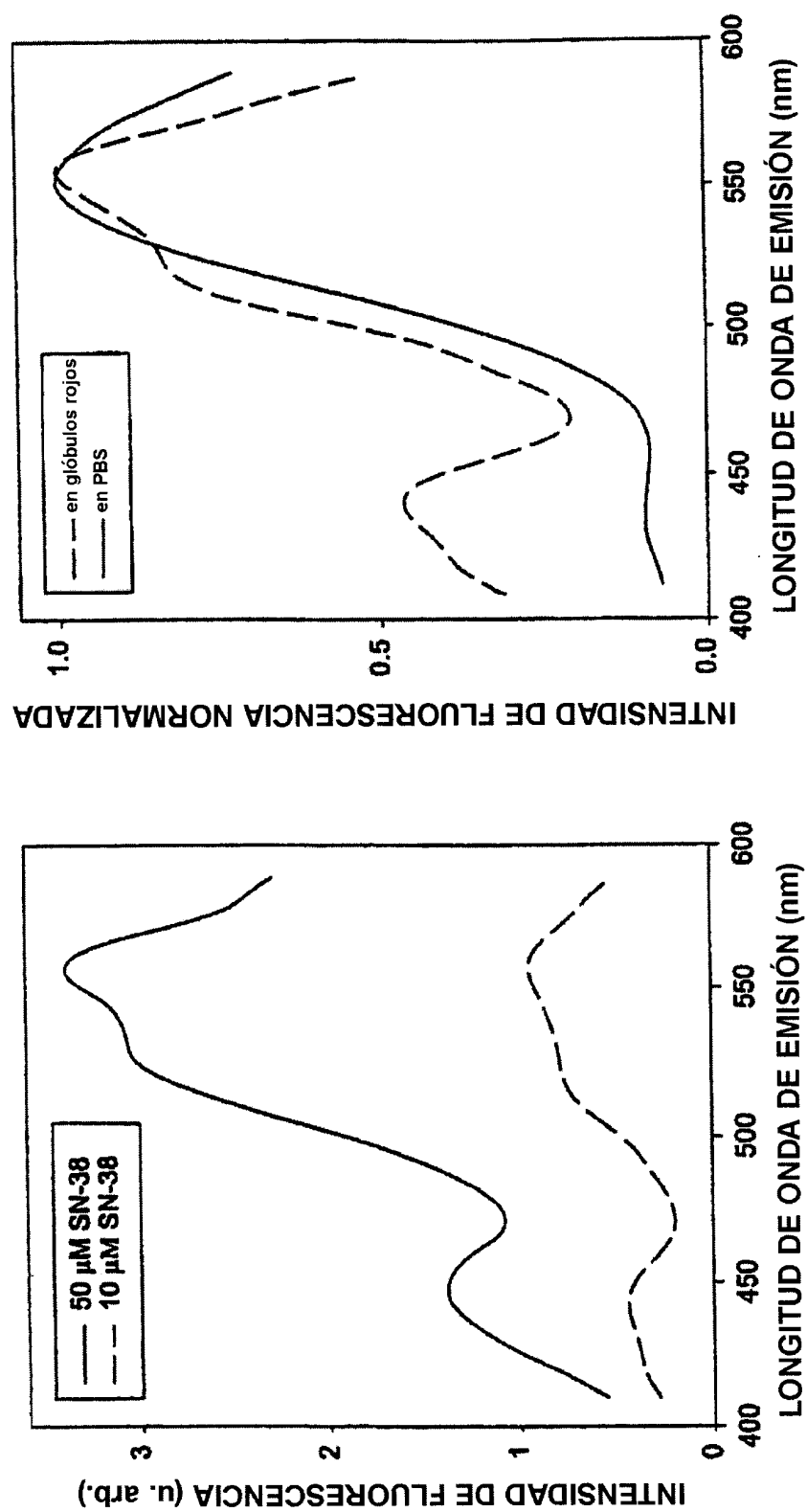


FIG. 7

Dependencia con el pH de la estabilidad del resto β -OH-lactona del DB-38

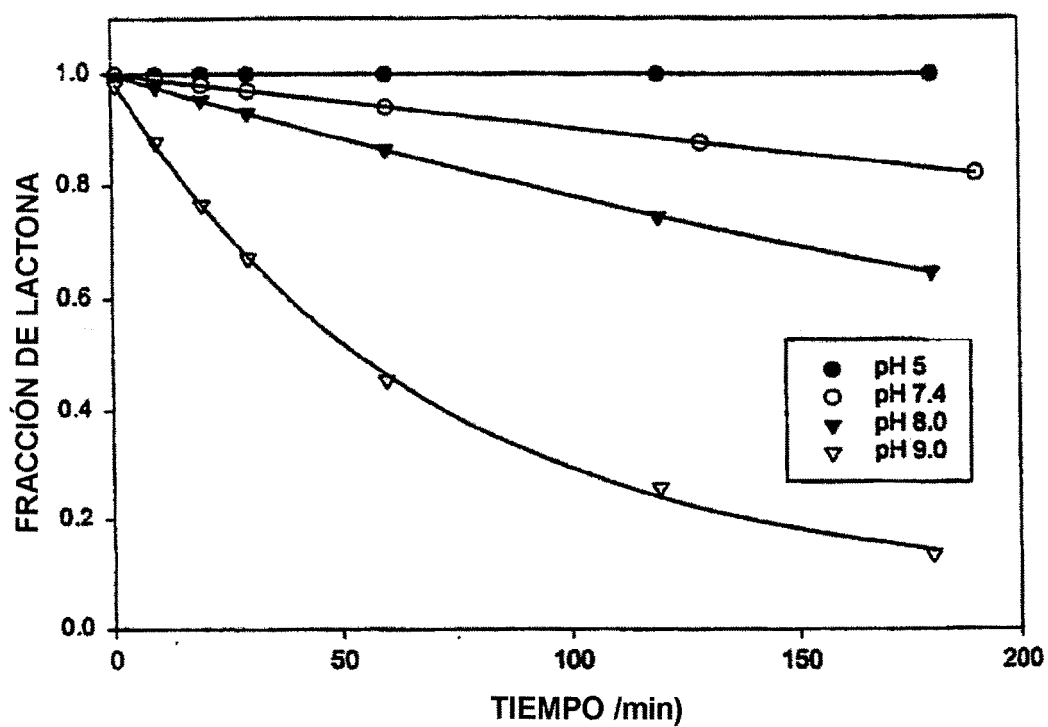


FIG. 8

Dependencia con el pH de la estabilidad del resto β -OH-lactona
del DB-81

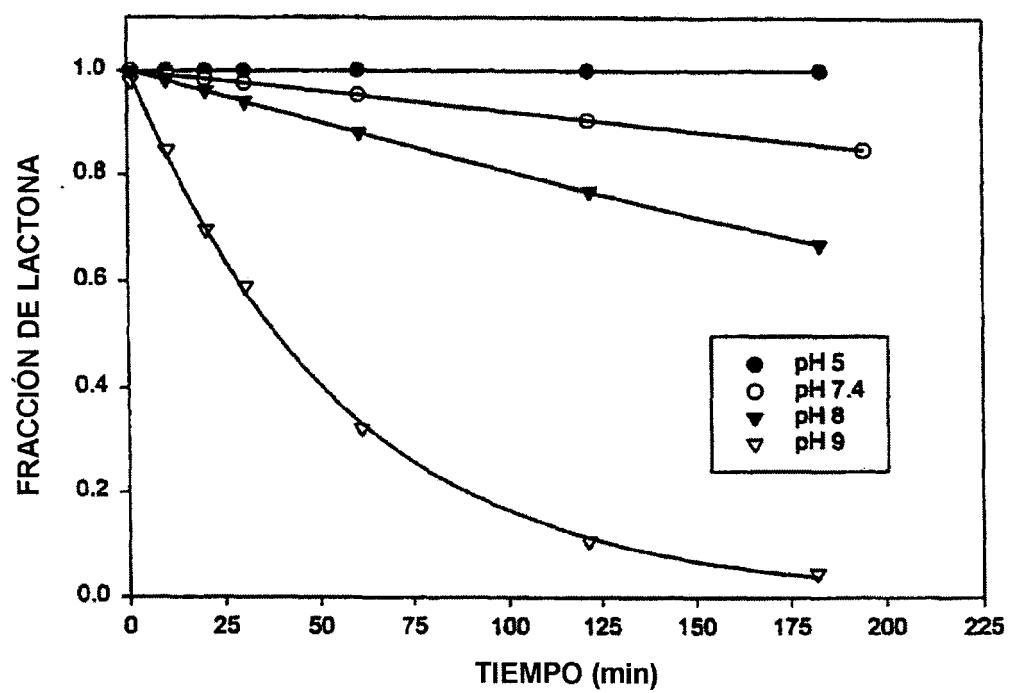


FIG. 9

Dependencia con el pH de la estabilidad del resto β -OH-lactona
del DB-90

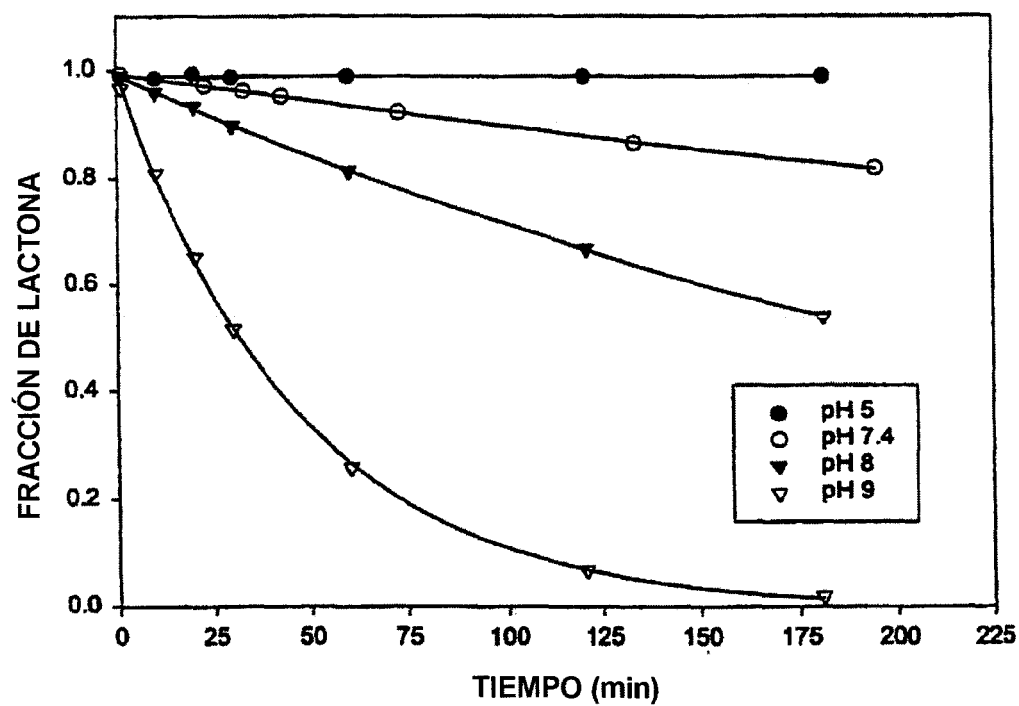


FIG. 10

Dependencia con el pH de la estabilidad del resto β -OH-lactona
del DB-91

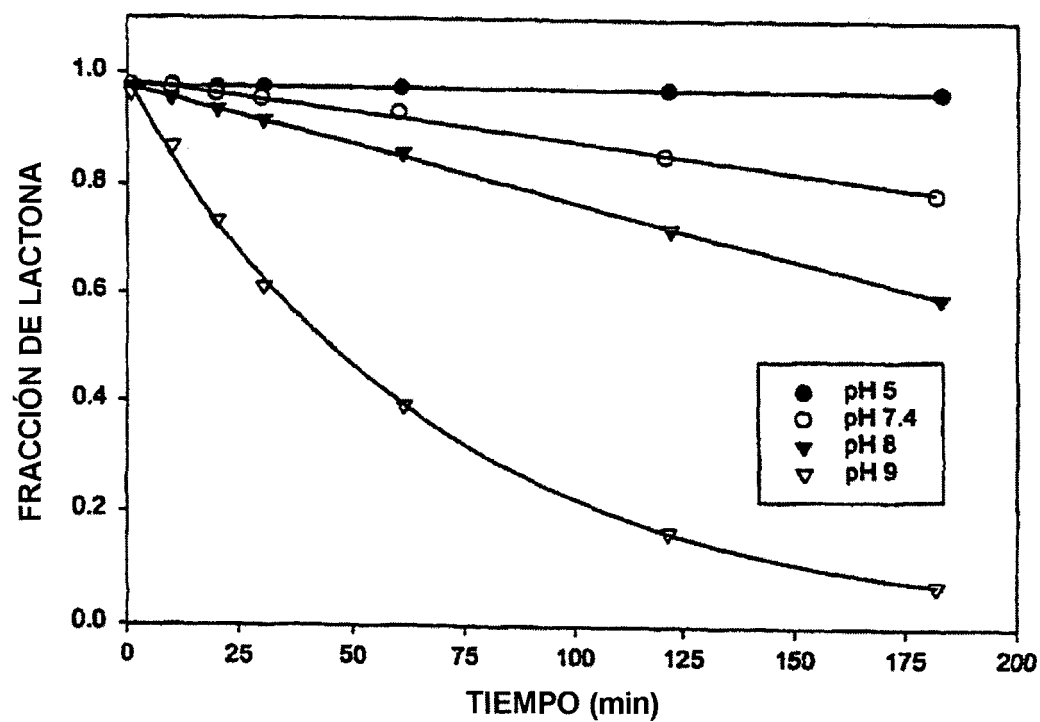


FIG. 11

Comparación de las estabildades de los silatecanos con α -lactona
con sus correspondientes homosilatecanos
en disolución tampón de PBS a 37°C

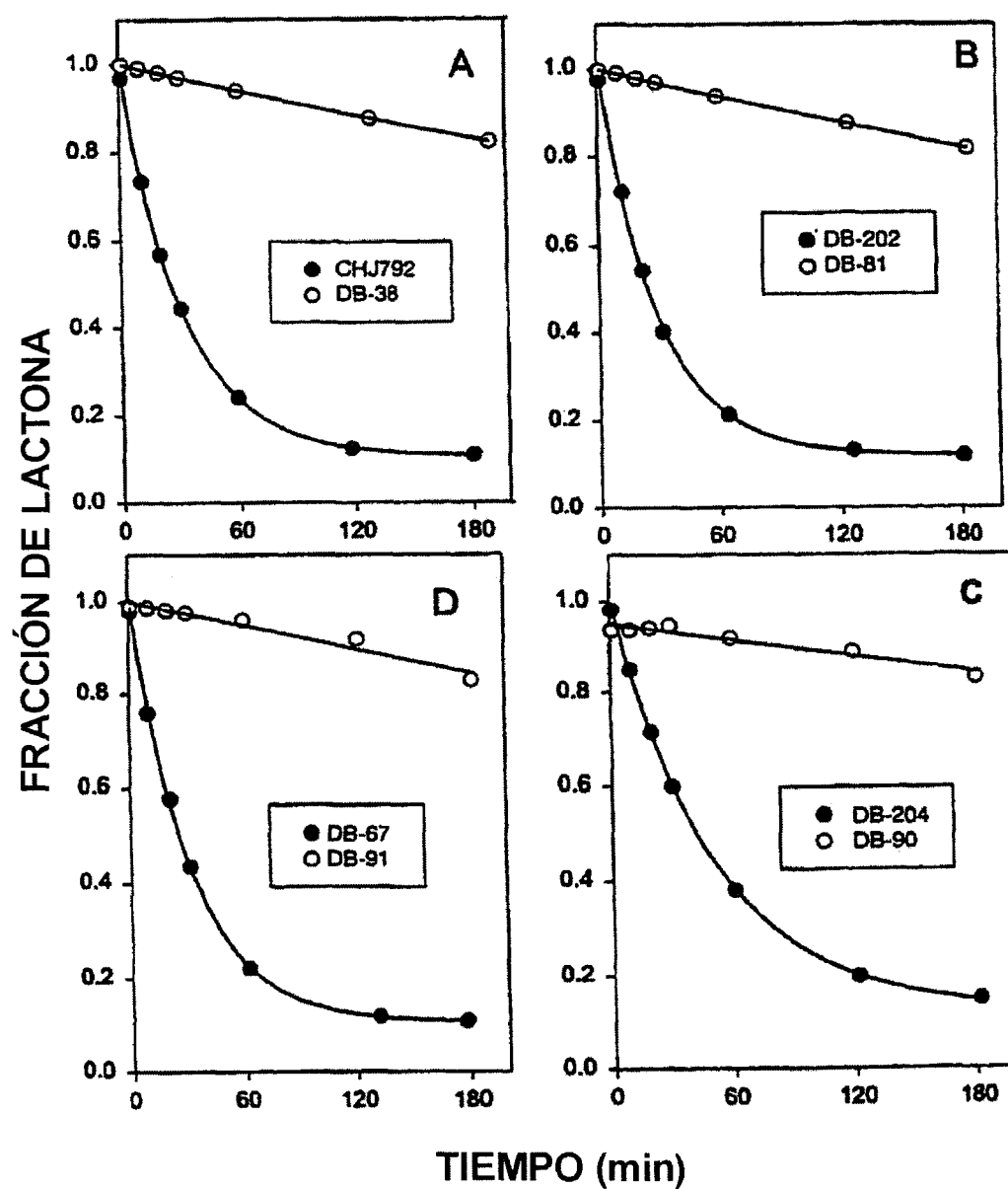


FIG. 12

Comparación de las estabilidades de los silatecanos con α -lactona con sus correspondientes homosilatecanos en disolución tampón de PBS/HSA a 37°C

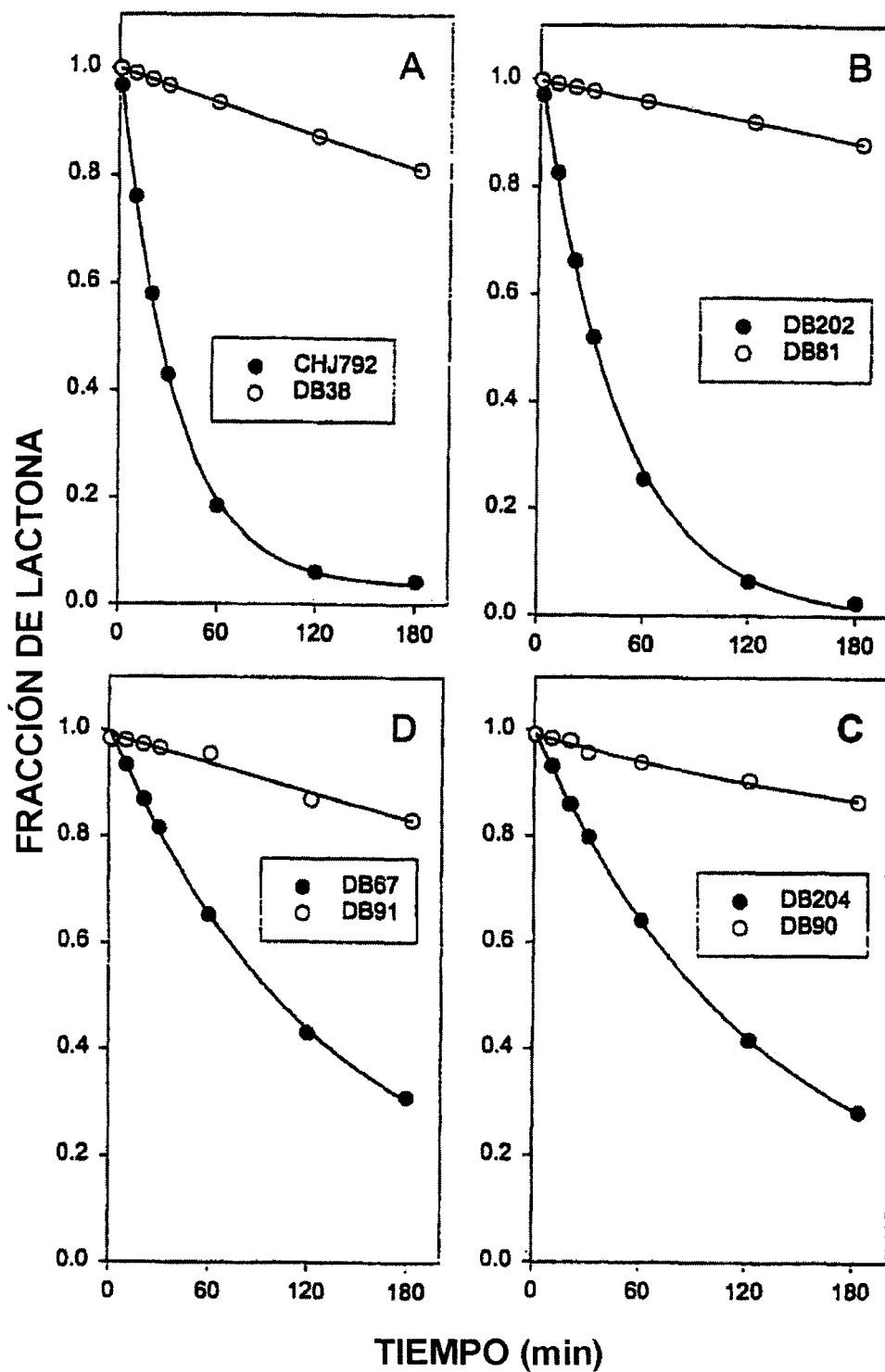


FIG. 13

Estabilidad de los homosilatecanos en plasma humano

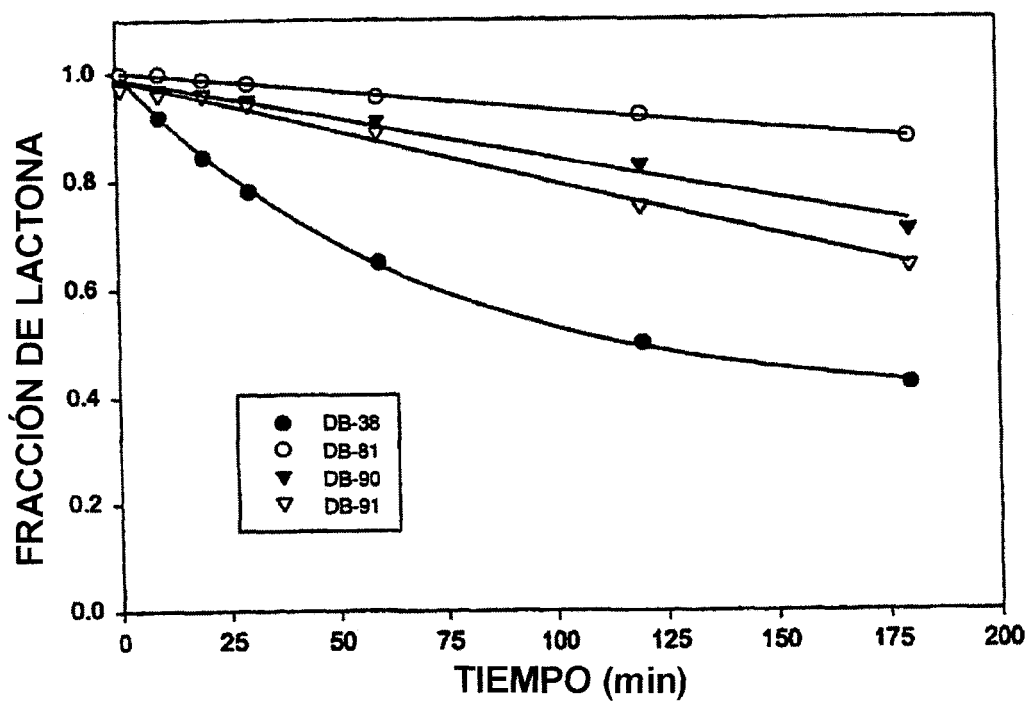


FIG. 14

Estabilidad de los homosilatecanos en glóbulos rojos sanguíneos

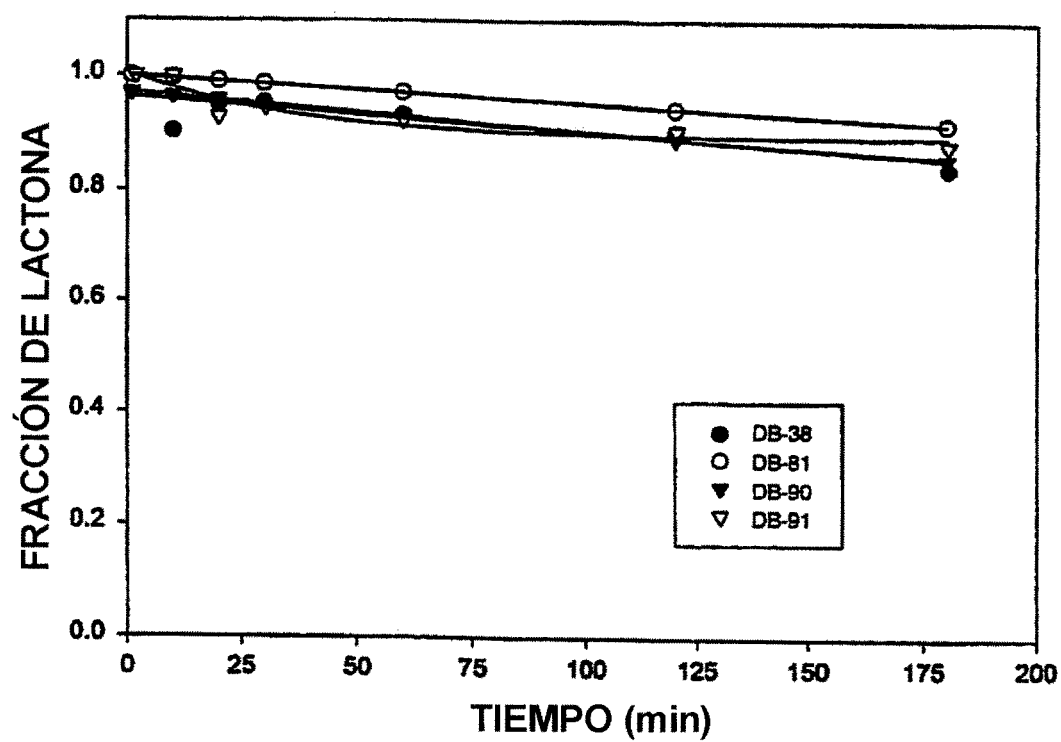


FIG. 15

Comparación de las estabilidades de los silatecanos con α -lactona con sus correspondientes homosilatecanos en sangre total a 37°C

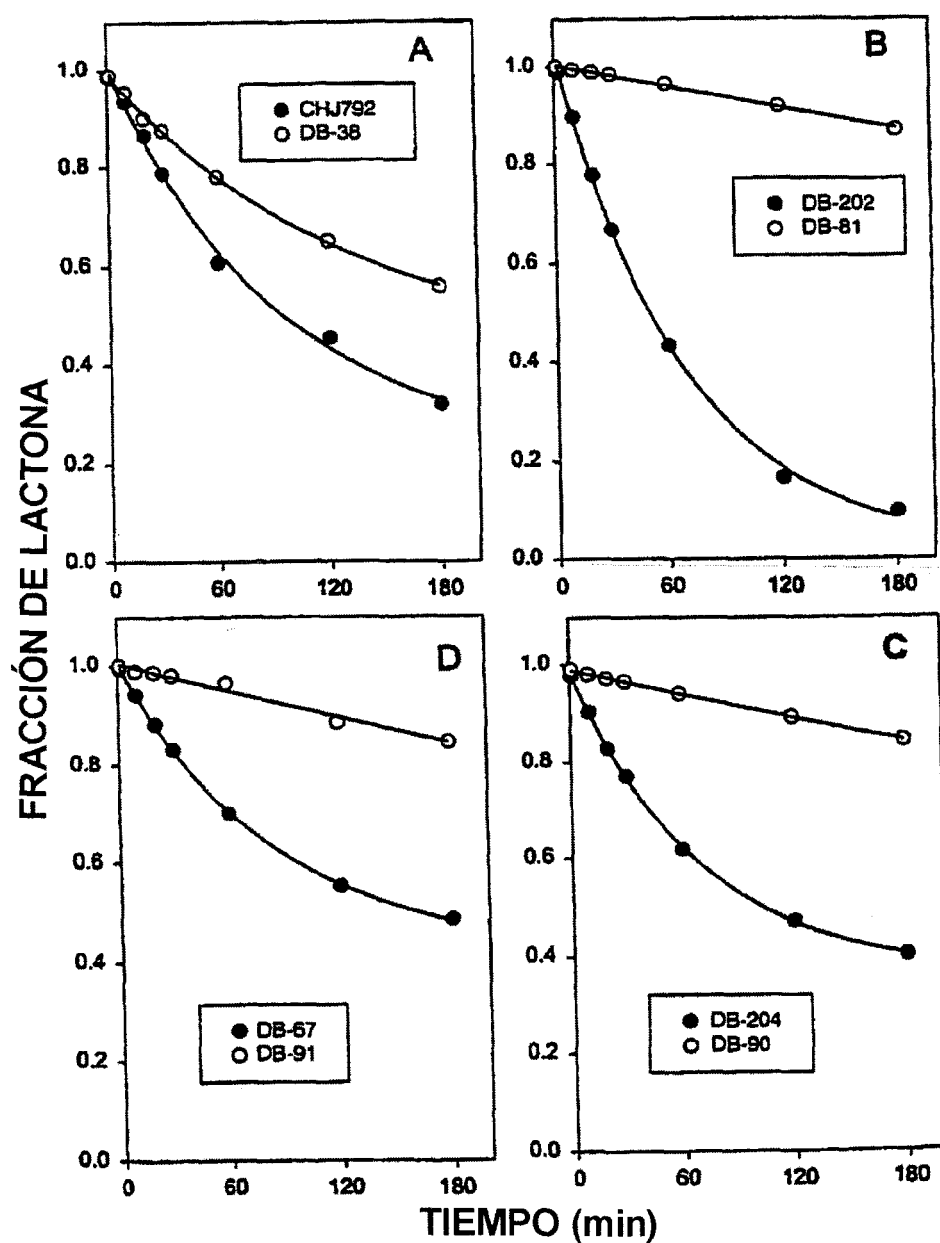


FIG. 16

Comparación de la estabilidad de los homosilatecanos con
camptotecinas clínicamente importantes en sangre total a 37°C

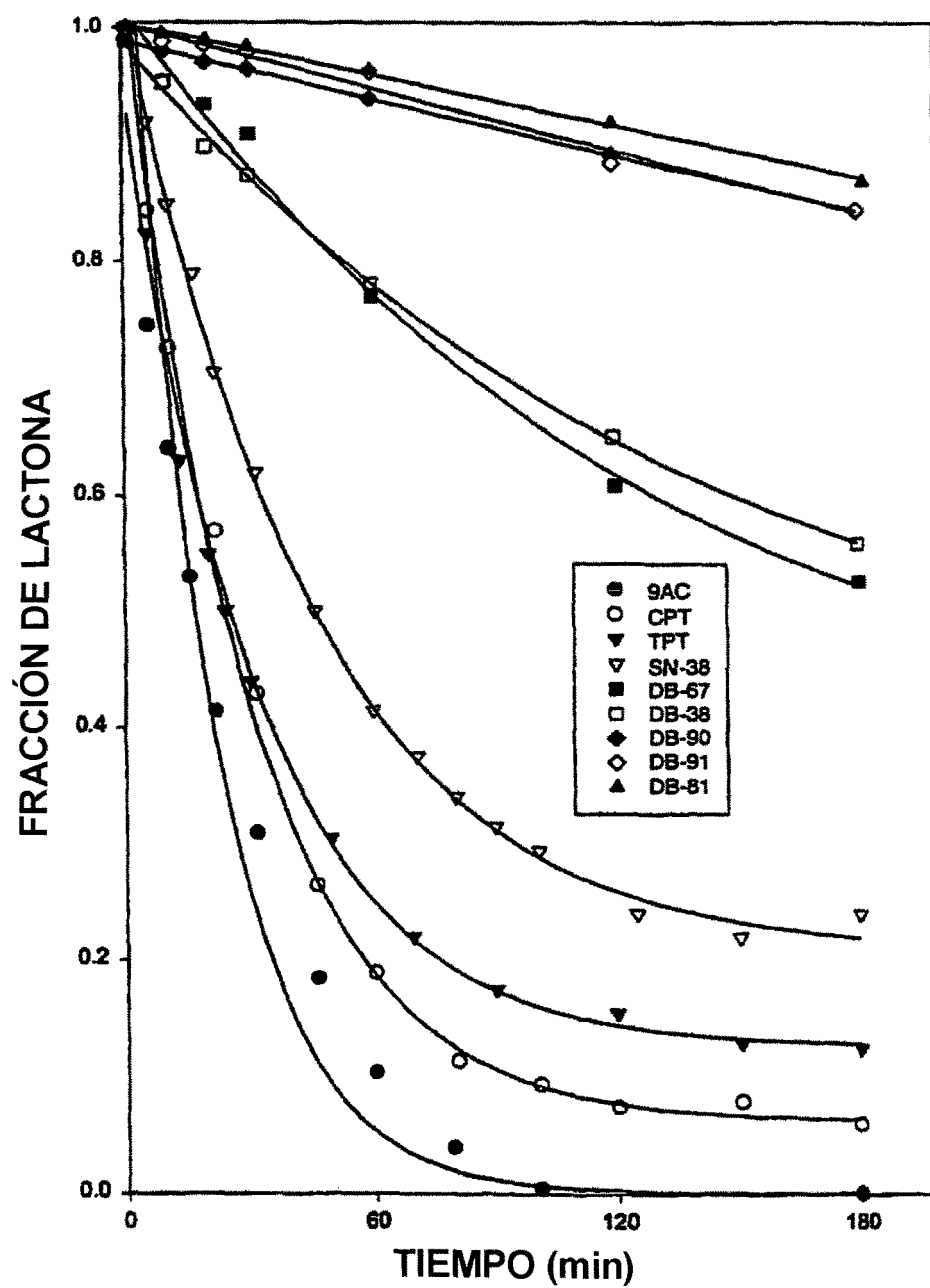


FIG. 17