



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1068219 E**

(51) Classificação Internacional:

C07J 63/00 (2006.01) **A61K 31/575** (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1999.03.02**

(30) Prioridade(s): **1998.03.02 US 76449 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.01.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.11.23**
003/2007

(73) Titular(es):

**UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL
HILL, THE**

OFFICE TEC. DEV., CAMPUS BOX 4105, 308

BYRUM HALL CHAPEL HILL, NC 27599-4105 US

PANACOS PHARMACEUTICALS, INC. US

(72) Inventor(es):

KUO-HSIUNG LEE

US

LOUIS MARK COSENTINO

US

I-CHEN SUN

US

HUI-KANG WANG

US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA

R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA

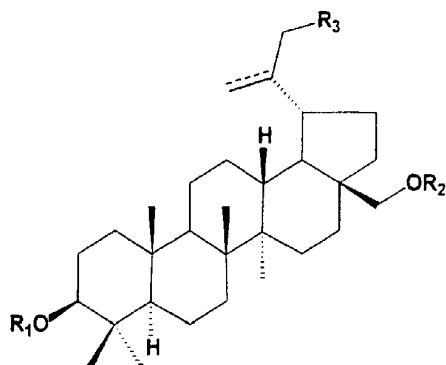
PT

(54) Epígrafe: **DERIVADOS ACILADOS DE BETULINA E DE DI-HIDROBETULINA, SUA
PREPARAÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

RESUMO**"Derivados acilados de betulina e de di-hidrobetulina, sua preparação e sua utilização"**

Verificou-se que os derivados acilo de betulina e de di-hidrobetulina de acordo com o presente invento apresentam forte actividade anti-VIH. Os compostos do presente invento têm a fórmula (I) ou sais farmaceuticamente aceitáveis da mesma, em que R_1 é um carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído, R_2 é um carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído e R_3 é hidrogénio, halogéneo, amino, mono- ou di-alquilamino facultativamente substituído, ou $-OR_4$, onde R_4 é hidrogénio, alcanoílo C_{1-4} , benzoílo ou carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído, em que a linha tracejada representa uma ligação dupla facultativa entre C20 e C29.

*I*

DESCRIÇÃO

"Derivados acilados de betulina e de di-hidrobetulina, sua preparação e sua utilização"

ANTECEDENTES DO INVENTO

Campo do Invento

O presente invento refere-se a novos derivados sintéticos de betulina e de di-hidrobetulina, e à utilização dos referidos derivados como medicamentos.

Arte Relacionada

Os retrovírus são pequenos vírus de ARN de cadeia simples de sentido positivo. Uma partícula retroviral compreende duas moléculas de ARN de cadeia simples de sentido positivo idênticas. O seu genoma contém, entre outras coisas, a sequência da ADN-polimerase dependente de ARN, também conhecida como transcriptase inversa. São encontradas muitas moléculas de transcriptase inversa em estreita associação com o ARN genómico nas partículas virais maduras. Após a entrada numa célula, esta transcriptase inversa produz uma cópia de ADN de cadeia dupla do genoma viral, a qual é de seguida inserida na cromatina da célula hospedeira. Uma vez inserida, a sequência viral é denominada um provírus. A integração retroviral é directamente dependente das proteínas virais. Os terminais do ADN viral lineares (as RTL) são os precursores imediatos do ADN proviral integrado. Ocorre uma duplicação característica de curtos trechos do ADN do hospedeiro no local de integração.

Os genomas virais da progénie e os ARNm são transcritos a partir da sequência proviral inserida pela ARN-polimerase da célula hospedeira em resposta a sinais reguladores da transcrição nas regiões terminais da sequência proviral, as repetições terminais longas ou RTL. A maquinaria de produção de proteínas da célula hospedeira é utilizada para produzir proteínas virais, muitas das quais são inactivas até serem processadas por proteases codificadas pelo vírus. Tipicamente, as partículas virais da progénie desenvolvem-se a partir da superfície celular duma maneira não lítica. A infecção retroviral não interfere necessariamente com o ciclo de vida normal de uma célula ou organismo infectados. No entanto,

também não é sempre benigno em relação ao organismo hospedeiro. Embora a maioria das classes de vírus de ADN possa ser implicada na tumorigénese, os retrovírus são o único grupo taxonómico de vírus de ARN que são oncogénicos. Diversos retrovírus, tais como o vírus da imunodeficiência humana (VIH), que é o agente etiológico responsável pela síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) em humanos, também são responsáveis por diversas doenças muito invulgares do sistema imunitário de animais superiores.

O vírus da imunodeficiência humana (VIH) é um membro dos lentivírus, uma subfamília dos retrovírus. Muitos retrovírus são carcinogénicos bem conhecidos. O VIH *per se* não é reconhecido como causador de cancro em seres humanos e outros animais, mas representa um desafio formidável para o hospedeiro. O genoma viral contém muitos elementos reguladores que permitem que o vírus controle a sua taxa de replicação quer em células em repouso quer em células em divisão. De forma mais importante, o VIH infecta e invade as células do sistema imunitário, provoca o colapso do sistema imunitário do organismo e torna o doente susceptível a infecções oportunistas e a neoplasias. O defeito imunitário parece ser progressivo e irreversível, com uma elevada taxa de mortalidade que se aproxima dos 100% ao longo de vários anos.

O VIH-1 é trófico e citopático para os linfócitos T4, células do sistema imunitário que expressam o antigénio de diferenciação da superfície celular CD4, também conhecido como OKT4, T4 e leu3. O tropismo viral é devido às interacções entre a glicoproteína do invólucro do vírus, gp120, e as moléculas de CD4 da superfície celular (Dalglish et al., *Nature* 312:763-767 (1984)). Estas interacções não apenas medeiam a infecção de células susceptíveis pelo VIH, mas também são responsáveis pela fusão induzida pelo vírus de células T infectadas e não infectadas. Esta fusão celular resulta na formação de sincícios multinucleados gigantes, na morte celular e na depleção progressiva de células CD4 nos doentes infectados pelo VIH. Estes acontecimentos têm como consequência a imunossupressão induzida pelo VIH e as suas subsequentes sequelas, infecções oportunistas e neoplasias.

Para além das células T CD4+, a gama de hospedeiros do VIH inclui células da linhagem fagocítica mononuclear (Dalglish et al., *supra*), incluindo monócitos do sangue, macrófagos teciduais, células de Langerhans da pele e células

dendríticas do retículo dentro dos gânglios linfáticos. O VIH também é neurotrópico, capaz de infectar monócitos e macrófagos no sistema nervoso central, provocando lesão neurológica grave. Os macrófagos/monócitos são um reservatório principal de VIH. Eles podem interagir e fundir-se com as células T portadoras de CD4, ocasionando depleção de células T e contribuindo desse modo para a patogénese da SIDA.

Durante os últimos anos foram feitos progressos consideráveis no desenvolvimento de drogas para a terapia do VIH-1. Existem actualmente 12 drogas aprovadas para utilização nos E.U.A., incluindo cinco análogos de nucleósidos inibidores da transcriptase inversa (AZT, 3TC, ddI, ddC e D4T), três inibidores da transcriptase inversa não nucleosídicos (nevirapina, delavirdina e efavirenz) e quatro inibidores de protease (saquinavir, ritonavir, indinavir e nelfinavir). Combinações destas drogas são particularmente eficazes e podem reduzir os níveis de ARN viral até níveis indetectáveis no plasma e atrasar o desenvolvimento de resistência viral, com resultantes melhorias na saúde e na sobrevivência dos doentes.

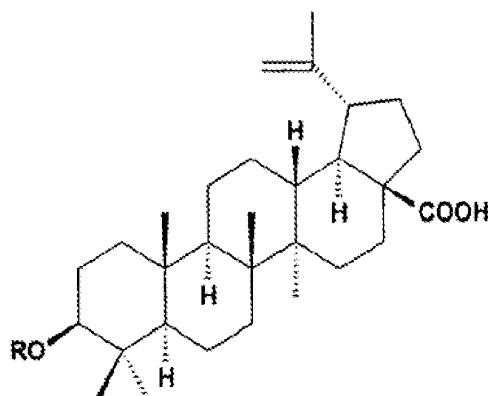
Apesar destes avanços, ainda ocorrem problemas com os regimes de drogas correntemente disponíveis. Muitas destas drogas exibem toxicidades graves, apresentam outros efeitos colaterais (por ex., redistribuição da gordura) ou requerem horários de administração complicados que diminuem a sua aceitação e por conseguinte limitam a sua eficácia. Surgem frequentemente estirpes de VIH resistentes ao longo de períodos de tempo prolongados mesmo com terapias de combinação. O elevado custo destas drogas também é uma limitação à sua utilização alargada, especialmente fora dos países desenvolvidos.

Existe ainda uma grande necessidade de desenvolvimento de drogas adicionais a fim de ultrapassar estas questões. Idealmente estas teriam como alvo estádios diferentes no ciclo de vida do vírus, adicionando-se ao arsenal para a terapia de combinação, e exibiriam toxicidade mínima, tendo ainda custos de fabrico mais baixos.

Previamente, o ácido betulínico e o ácido platânico foram isolados como princípios anti-VIH a partir de *Syzigium claviflorum*. O ácido betulínico e o ácido platânico exibem actividade inibitória contra a replicação do VIH em células de linfócitos H9 com valores de CE_{50} de 1,4 μ M e de 6,5 μ M, respectivamente, e valores de I.T. de 9,3 e de 14, respectivamente. A hidrogenação do ácido betulínico produziu o ácido di-hidrobetulínico, o qual apresentava uma actividade

anti-VIH ligeiramente mais potente com um valor de CE_{50} de 0,9 μ M e um valor de I.T. de 14 (Fujioka, T. et al., *J. Nat. Prod.* 57:243-247 (1994)).

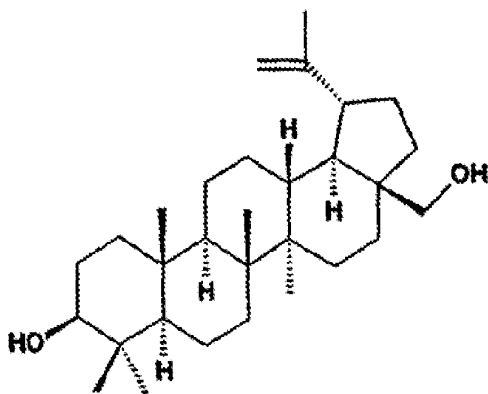
A esterificação do ácido betulínico (**1**) com certos grupos acilo substituídos, tais como os grupos 3',3'-dimetilglutarilo e 3',3'-dimetilsuccinilo, produziu derivados que apresentam actividade intensificada (Kashiwada, Y. et al., *J. Med. Chem.* 39:1016-1017 (1996)). Derivados acilados do ácido betulínico e do ácido di-hidrobetulínico que são agentes anti-VIH potentes também se encontram descritos na Patente dos E.U.A. Nº. 5 679 828.



1 R = H (Ácido betulínico)

A Patente dos E.U.A. Nº. 5 468 888 descreve derivados 28-amido de lupanos que se encontram descritos como apresentando um efeito citoprotector para as células infectadas pelo VIH.

O Pedido de Patente Japonesa Nº. J 01 143 832 descreve que a betulina (**3**) e os seus 3,28-diésteres são úteis no campo anticanceroso.



3 (Betulina)

"Synthesis of Unsaturated Polyesters Containing Betulinol Moieties" por Vasnex et al. refere-se à utilização de certos 3,28-diésteres de betulina que são úteis na síntese de polímeros (*MakroMol. Chem.* 188:683-691 (Abril de 1987)).

"Emulsifiers of plant origin. II. Formation of some betulin esters" por Pasich, refere-se à utilização de certos 3,28-diésteres de betulina como agentes emulsionantes (*Herba Polonica* 25(2):147-53 (1979)), (CAPLUS 1980:8114).

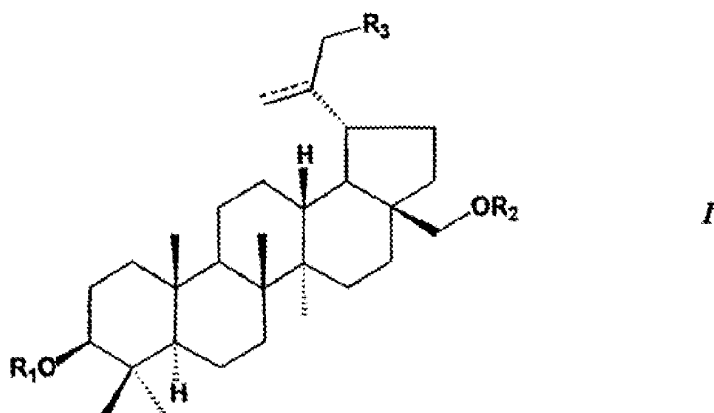
"Emulsifiers from triterpenoid compounds. Parte VIII. Physical-chemical study of betulin and its esters" por Pasich, refere-se à utilização de certos 3,28-diésteres de betulina como agentes emulsionantes (*Farm. Polska* 20(1-2):9-12 (1965)), (CAPLUS 1965:433478).

Os três documentos acima descrevem diésteres que se situam dentro do âmbito da Fórmula I, mas que apresentam utilizações diferentes e não foram reivindicados no âmbito do presente invento.

Continua a existir a necessidade de compostos que possuam actividade anti-VIH potente com modos de acção diferentes. Os referidos compostos são urgentemente necessários a fim de serem adicionados às terapias anti-VIH existentes.

SUMÁRIO DO INVENTO

Um primeiro aspecto do presente invento refere-se a novos compostos de Fórmula I:



ou seus sais farmacologicamente aceitáveis, em que

R_1 é um carboxiacilo C_2 - C_{20} substituído ou não substituído,

R_2 é um carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído, e R_3 é hidrogénio, halogénio, amino, mono- ou di-alquilamino facultativamente substituídos, ou $-OR_4$, onde R_4 é hidrogénio, alcanoílo C_{1-4} , benzoílo, ou carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído,

em que a linha tracejada representa uma ligação dupla facultativa entre C20 e C29, e desde que o composto não seja:

3,29-dimaleato de betulina,

3,29-di[tetracloroftalato] de betulina,

3,29-diftalato de betulina, ou

3,29-dissuccinato de betulina.

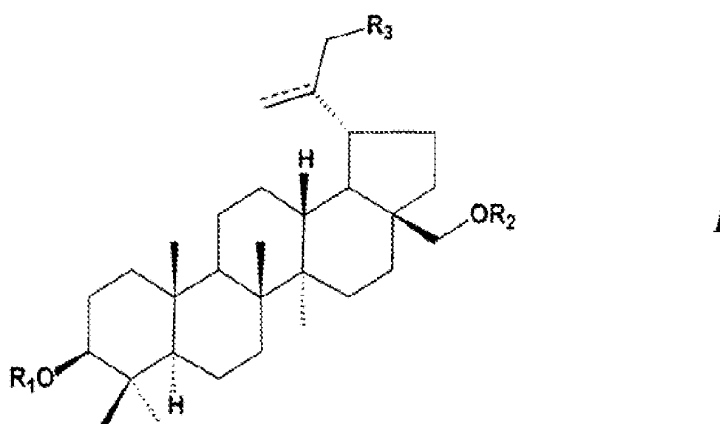
Um segundo aspecto do presente invento refere-se a composições farmacêuticas, compreendendo um ou mais compostos de Fórmula I, e um transportador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Um ou mais compostos farmacêuticamente activos adicionais também podem ser incluídos nestas composições.

Os compostos são úteis como agentes anti-retrovirais. Por conseguinte, um terceiro aspecto do presente invento refere-se a métodos para inibição de uma infecção retroviral em células ou tecidos de um animal, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz inibitória retroviral de um composto de Fórmula I. Uma concretização preferida refere-se a um método para o tratamento de um doente que sofre de uma patologia relacionada com retrovírus, compreendendo a administração ao referido indivíduo de uma quantidade eficaz inibitória retroviral de uma composição farmacêutica que inclua um composto de Fórmula I.

Um quarto aspecto do presente invento refere-se a um método para a preparação dos compostos de Fórmula I.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

Os compostos do presente invento apresentam a Fórmula geral I:



ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em que

R_1 é um carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído,

R_2 é um carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído, e

R_3 é hidrogénio, halogéneo, amino, mono- ou di-alquilamino facultativamente substituído, ou $-OR_4$, onde R_4 é hidrogénio, alcanoílo C_{1-4} , benzoílo, ou carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído,

em que a linha tracejada representa uma ligação dupla facultativa entre C20 e C29.

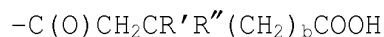
Os compostos preferidos do presente invento são aqueles onde:

R_1 e R_2 são, cada um, carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído, e R_3 é hidrogénio. Numa concretização, a ligação entre C20 e C29 é uma ligação dupla. Numa outra concretização, a ligação entre C20 e C29 é uma ligação simples.

Um outro grupo de compostos preferidos são aqueles onde:

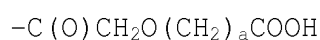
R_1 e R_2 são, cada um, carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído e R_3 é halogéneo ou $-OR_4$, onde R_4 é carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído. Numa concretização, a ligação entre C20 e C29 é uma ligação dupla. Numa outra concretização, a ligação entre C20 e C29 é uma ligação simples.

São compostos ainda mais preferidos aqueles onde R_1 e R_2 são, cada um, um grupo carboxialcanoílo C_4-C_{16} que é mono- ou dissustituído no átomo de carbono 3'. A referida cadeia lateral tem a fórmula:



onde R' e R'' são, cada um, alquilo C₁₋₄, preferencialmente metilo ou etilo, ou R' é hidrogénio e R'' é alquilo C₁₋₄, ou R' e R'' são considerados em conjunto para formar uma ligação di-, tri-, tetra- ou pentametileno, e b é desde zero a doze, preferencialmente de zero a 4, o mais preferencialmente zero ou 1.

São adicionalmente preferidos aqueles compostos onde R₁ e R₂ são ambos um grupo carboxialcoxiacetilo C₄-C₁₆ de fórmula:

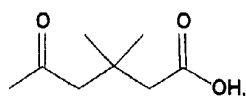
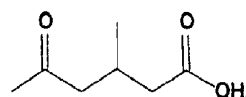
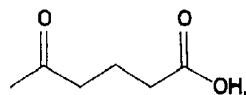
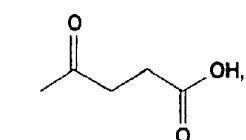


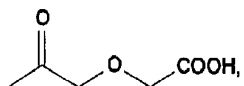
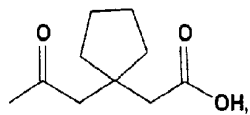
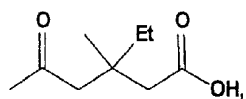
onde a é desde zero a dez, preferencialmente de um a quatro, o mais preferencialmente um ou dois.

Os valores preferidos de R₃ incluem: hidrogénio, halogéneo ou -OR₄, onde R₄ é preferencialmente hidrogénio, -C(O)CH₂CR'R''(CH₂)_bCOOH, onde R', R'' e b são tal como definidos acima, ou -C(O)CH₂CO(CH₂)_aCOOH, onde a é tal como definido acima.

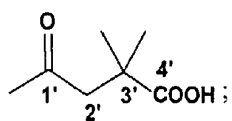
São compostos particularmente preferidos os de Fórmula I, em que:

R₁ e R₂ são, cada um, um de:



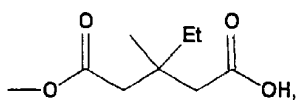
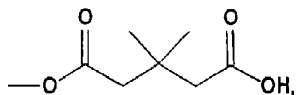
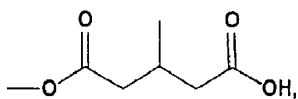
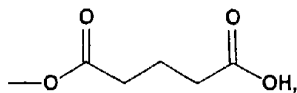
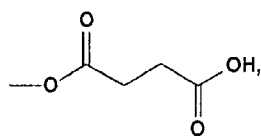


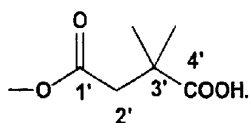
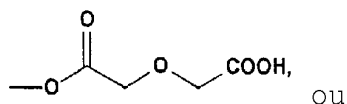
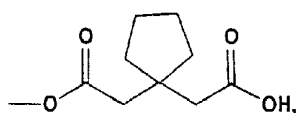
, ou



e

R₃ é preferencialmente hidrogénio, cloro, bromo ou hidroxilo, ou é um de:





Os derivados acilo de betulina e de di-hidrobetulina de acordo com o presente invento apresentam forte actividade anti-VIH. Os grupos C3-hidroxi, C28-hidroxi e C20-exometileno na betulina podem ser facilmente modificados. Verificou-se que a introdução de um grupo acilo C_2 a C_{20} substituído ou não substituído nos grupos C3-hidroxi ou C28-hidroxi da betulina e da di-hidrobetulina produz prontamente os derivados 3-O-acilo, 28-O-acilo e/ou 28-O-acilo correspondentes.

Os grupos C3-acilo e C28-acilo dos compostos mais activos possuem grupos dimetilo ou oxigénio na posição C3. Esta observação sugere que este tipo de grupo acilo pode ser importante para a actividade anti-VIH intensificada.

O invento também se refere a um método para o tratamento de um indivíduo infectado com o VIH-1 por administração de pelo menos um dos derivados de betulina assinalados acima, facultativamente em combinação com qualquer um ou mais dos medicamentos anti-SIDA conhecidos ou um imunoestimulante.

Outras características, vantagens, concretizações, aspectos e objectos do presente invento serão claras para os peritos nas áreas de arte relevante, tendo como base a descrição, os ensinamentos e a orientação aqui apresentadas.

Verificou-se que os compostos do presente invento apresentam actividade anti-retroviral, proporcionando por conseguinte compostos e composições adequados para o tratamento de infecções retrovirais, facultativamente com ingredientes farmacêuticamente activos adicionais, tais como

compostos anti-retrovirais, anti-VIH e/ou imunoestimulantes ou anticorpos antivirais ou seus fragmentos.

Pela expressão "actividade anti-retroviral" ou "actividade anti-VIH" é designada a capacidade para inibir pelo menos um de:

- (1) integração de pro-ADN viral no genoma da célula hospedeira;
- (2) fixação retroviral às células;
- (3) entrada viral nas células;
- (4) metabolismo celular que permite a replicação viral;
- (5) inibição da disseminação intercelular do vírus;
- (6) síntese e/ou expressão celular de antigénios virais;
- (7) actividade de enzimas codificadas pelo vírus (tais como transcriptase inversa, integrase e proteases); e/ou
- (8) quaisquer acções patogénicas retrovirais ou do VIH conhecidas, tais como, por exemplo, imunossupressão.

Assim, qualquer actividade que tenda a inibir qualquer destes mecanismos é "actividade anti-retroviral" ou "actividade anti-VIH".

Um derivado de betulina ou de di-hidrobetulina do presente invento pode ser utilizado para o tratamento de uma infecção retroviral (por ex., VIH), quer isolado quer em combinação com outros modos de terapia conhecidos na arte. Os referidos modos de terapia incluem quimioterapia com drogas, tais como, mas não se lhes limitando, pelo menos uma de AZT, ddC, ddA, d4T, ddI, ou quaisquer outras drogas anti-retrovirais ou anticorpos em combinação uns com os outros, ou associados com uma terapêutica biologicamente baseada, tal como, por exemplo, CD4 solúvel, anticorpos para CD4, e conjugados de CD4 ou anti-CD4, ou como aqui adicionalmente apresentado.

Dado que os derivados de betulina ou de di-hidrobetulina do presente invento são relativamente menos tóxicos ou substancialmente não tóxicos para as células normais, a sua utilidade não se encontra limitada ao tratamento de infecções retrovirais estabelecidas. Por exemplo, um derivado de betulina de acordo com o presente invento pode ser utilizado no tratamento de produtos do sangue, tais como aqueles que são

mantidos em bancos de sangue. A provisão de sangue de um país é habitualmente testada quanto a anticorpos contra o VIH. No entanto, o teste é ainda imperfeito e amostras que produzam testes negativos podem mesmo assim conter vírus do VIH. O tratamento do sangue e dos produtos do sangue com derivados de betulina do presente invento pode adicionar uma margem de segurança extra ao matar qualquer retrovírus que possa não ter sido detectado.

Composições Farmacêuticas

As composições farmacêuticas do presente invento podem compreender pelo menos um dos derivados de betulina ou de dihidrobetulina. As composições farmacêuticas de acordo com o presente invento também podem compreender adicionalmente outros agentes antivirais tais como, mas não se lhes limitando, AZT (Glaxo Wellcome), 3TC (Glaxo Wellcome), ddI (Bristol-Myers Squibb), ddC (Hoffmann-La Roche), D4T (Bristol-Myers Squibb), abacavir (Glaxo Wellcome), nevirapina (Boehringer Ingelheim), delavirdina (Pharmacia & Upjohn), efavirenz (DuPont Pharmaceuticals), saquinavir (Hoffmann-La Roche), ritonavir (Abbott Laboratories), indinavir (Merck & Company), nelfinavir (Agouron Pharmaceuticals), amprenavir (Glaxo Wellcome), adefovir (Gilead Sciences) e hidroxiureia (Bristol-Myers Squibb).

Os agentes antivirais adequados adicionais para utilização óptima com um derivado de betulina do presente invento podem incluir, mas não se lhes encontram limitam, AL-721 (mistura lipídica) fabricada por Ethigen Corporation e Matrix Research Laboratories, éster metílico de anfotericina B, Ampligen (ARN mal emparelhado) desenvolvido por DuPont/HEM Research, anticorpo anti-SIDA (Nisshon Foods), AS-101 (imunoestimulante baseado em metal pesado), Betaseron (interferão β) fabricado por Triton Biosciences (Shell Oil), hidroxitolueno butilado, Carrosyn (polimanoacetato), Castanospermina, Contracan (derivado de ácido esteárico), Pharmatex Creme (contendo cloreto de benzalcónio) fabricado por Pharmalec, CS-87 (derivado de Zidovudina 5-não substituído), Cytovene (ganciclovir) fabricado por Syntex Corporation, sulfato de dextrano, D-penicilamina (3-mercaptop-D-valina) fabricado por Carter-Wallace e Degussa Pharmaceutical, Foscarnet (fosfonoformato trissódico) fabricado por Astra AB, ácido fusídico fabricado por Leo Lovens, glicirrizina (um constituinte de raiz de alcaçuz),

HPA-23 (21-tungsto-9-antimonato de amónio) fabricado por Rhone Poulenc Santé, antiviral do vírus imunitário humano desenvolvido por Porton Products International, Ornidyl (eflornitina) fabricado por Merrell-Dow, nonoxinol, isetionato de pentamidina (PENTAM-300) fabricado por Lypho Med, Péptido T (sequência octapeptídica) fabricado por Peninsula Laboratories, fenitoína (Warner-Lambert), ribavirina, Rifabutin (ansamicina) fabricado por Adria Laboratories, CD4-IgG2 (Progenics Pharmaceuticals) ou outras moléculas contendo CD4 ou baseadas em CD4, T-20 (Trimeris), trimetrexato fabricado por Warner-Lambert Company, SK-818 (antiviral derivado de germânio) fabricado por Sanwa Kagaku, suramina e análogos da mesma fabricados por Miles Pharmaceuticals, UA001 fabricado por Ueno Fine Chemicals Industry, e Wellferon (interferão α) fabricado por Glaxo Wellcome.

As composições farmacêuticas do presente invento podem também compreender adicionalmente imunomoduladores. Os imunomoduladores para utilização facultativa com um derivado de betulina do presente invento, de acordo com o presente invento podem incluir, mas não se lhes limitam: ABPP (bropririmina), Ampligen (ARN mal emparelhado) DuPont/HEM Research, anticorpo anti-interferão α humano (Advanced Biotherapy & Concepts), anticorpo anti-SIDA (Nisshon Foods), AS-101 (imunoestimulante baseado em metal pesado), ácido ascórbico e derivados do mesmo, interferão β , Carrosyn (polimanoacetato), Ciamexon (Boehringer Mannheim), ciclosporina, cimetidina, CL-246 738 (American Cyanamid), factores estimulantes de colónia, incluindo o GM-CSF (Sandoz, Genetics Institute), dinitroclorobenzeno, HE2000 (Hollis-Eden Pharmaceuticals), interferão α , interferão-gama, glucano, gama-globulina hiper-imune (Bayer), IMREG-1 (dialisado de leucócitos) e IMREG-2 (IMREG Corp.), Immuthiol (dietiltiocarbamato de sódio) (Institut Merieux), interleucina-1 (Cetus Corporation, Hoffmann-LaRoche, Immunex), interleucina-2 (IL-2) (Chiron Corporation), isoprinosina (inosina pranobex), Krestin (Sankyo), LC-9018 (Yakult), lentinano (Ajinomoto/Yamanouchi), LF-1695 (Fournier), metionina-encefalina (TNI Pharmaceuticals, Sigma Chemicals), Minophagen C, tripéptido de muramilo, MTP-PE (Ciba-Geigy), naltrexona ("Trexan" DuPont), neutropina, imunomodulador de ARN (Nippon Shingaku), Remune (Immune Response Corporation), Reticulose (Advanced Viral Research Corporation), shosaikoto e ginseng, factor humoral tímico, TP-05 (Thymopentin, Ortho

Pharmaceuticals), factor 5 de Timosina e Timosina 1, timostimulina, TNF (factor de necrose tumoral) fabricado por Genentech, e preparações de vitamina B.

O indivíduo animal preferido do presente invento é um mamífero. Pelo termo "mamífero" é designado um indivíduo que pertence à classe *Mammalia*. O invento é particularmente útil no tratamento de doentes humanos.

O termo "tratamento" significa a administração de um derivado de betulina ou de di-hidrobetulina a indivíduos para fins que podem incluir a prevenção, a melhoria ou a cura de uma patologia relacionada com retrovírus.

Os medicamentos são considerados como sendo proporcionados "em combinação" uns com os outros quando são proporcionados ao doente simultaneamente ou quando o tempo entre a administração de cada um dos medicamentos é tal que permite uma sobreposição da actividade biológica.

Numa concretização preferida, pelo menos um derivado de betulina ou de di-hidrobetulina constitui uma única composição farmacêutica.

As composições farmacêuticas para administração de acordo com o presente invento podem compreender pelo menos um derivado de betulina ou de di-hidrobetulina de acordo com o presente invento sob uma forma farmacêuticamente aceitável, facultativamente combinado com um transportador farmacêuticamente aceitável. Estas composições podem ser administradas por quaisquer meios que alcancem os fins pretendidos. As quantidades e os regimes para a administração de um derivado de betulina de acordo com o presente invento podem ser prontamente determinados pelos peritos na arte clínica de tratamento de uma patologia retroviral.

Por exemplo, a administração pode ser por via parentérica, tal como subcutânea, endovenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica ou bucal. Alternativamente, ou simultaneamente, a administração pode ser pela via oral. A dosagem administrada depende da idade, da saúde e do peso do beneficiário, do tipo de tratamento prévio ou simultâneo, se algum, da frequência do tratamento, e da natureza do efeito desejado.

As composições dentro do âmbito do presente invento incluem todas as composições que compreendam pelo menos um derivado de betulina ou de di-hidrobetulina de acordo com o presente invento numa quantidade eficaz para alcançar o fim pretendido. Embora as necessidades individuais variem, a determinação das gamas óptimas das quantidades eficazes de cada componente faz parte da perícia na arte. As dosagens típicas compreendem cerca de 0,1 a cerca de 100 mg/kg de peso corporal. As dosagens preferidas compreendem cerca de 1 a cerca de 100 mg/kg de peso corporal do ingrediente activo. As dosagens mais preferidas compreendem cerca de 10 a cerca de 100 mg/kg de peso corporal.

A administração terapêutica também pode incluir a administração prévia, simultânea, subsequente ou adjuntiva de pelo menos um derivado de betulina ou de di-hidrobetulina de acordo com o presente invento ou de outro agente terapêutico, tal como um agente antiviral ou imunoestimulante. Na referida abordagem, a dosagem da segunda droga pode preferencialmente ser igual ou ser diferente da dosagem do primeiro agente terapêutico. Preferencialmente, as drogas são administradas em dias alternados nas quantidades recomendadas para cada uma das drogas.

A administração de um composto do presente invento também pode incluir facultativamente a terapia prévia, simultânea, subsequente ou adjuntiva utilizando reforços do sistema imunitário ou imunomoduladores. Para além dos compostos farmacologicamente activos, uma composição farmacêutica do presente invento pode também conter transportadores farmacêuticamente aceitáveis adequados compreendendo excipientes e auxiliares que facilitem o processamento dos compostos activos em preparações que possam ser utilizadas farmacêuticamente. Preferencialmente, as preparações, particularmente as preparações que podem ser administradas por via oral e que podem ser utilizadas para o tipo de administração preferido, tais como comprimidos, drageias e cápsulas, e também as preparações que podem ser administradas por via rectal, como supositórios, bem como as soluções adequadas para administração por injeção ou oralmente, contêm desde cerca de 0,01 a 99 por cento, preferencialmente de cerca de 20 a 75 por cento do composto ou compostos activos, em conjunto com o excipiente.

As preparações farmacêuticas do presente invento são fabricadas duma maneira que é por si própria conhecida, por exemplo, por meio de processos convencionais de mistura, granulação, preparação de drageias, dissolução ou liofilização. Assim, as preparações farmacêuticas para utilização oral podem ser obtidas por combinação dos compostos activos com excipientes sólidos, facultativamente por trituração da mistura resultante, e processamento da mistura de grânulos, após adição de auxiliares adequados, se desejado ou necessário, a fim de obter comprimidos e núcleos de drageias.

São excipientes adequados, por ex., cargas como sacáridos, por exemplo, lactose ou sacarose, manitol ou sorbitol; preparações de celulose e/ou fosfatos de cálcio, tais como fosfato tricálcico ou hidrogenofosfato de cálcio; bem como aglutinantes como uma pasta de amido, utilizando, por exemplo, amido de milho, amido de trigo, amido de arroz, amido de batata, gelatina, goma adragante, metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose de sódio e/ou polivinilpirrolidona. Se desejado, podem ser adicionados agentes desintegrantes tais como os amidos mencionados acima e também carboximetil-amido, polivinilpirrolidona reticulada, ágar ou ácido algínico ou um seu sal, tal como alginato de sódio. Os auxiliares são, acima de tudo, agentes reguladores do escoamento e lubrificantes, por exemplo, sílica, talco, ácido esteárico e seus sais, tais como estearato de magnésio ou estearato de cálcio, e/ou polietilenoglicol. Os núcleos de drageias são proporcionados com revestimentos adequados os quais, se desejado, são resistentes aos sucos gástricos. Para este fim, podem ser utilizadas soluções concentradas de sacáridos, que podem conter facultativamente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, polietilenoglicol e/ou dióxido de titânio, soluções de lacas e solventes orgânicos ou misturas de solventes adequados. A fim de produzir revestimentos resistentes aos sucos gástricos, são utilizadas soluções de preparações de celulose adequadas, tais como ftalato de acetilcelulose ou ftalato de hidroxipropilmetilcelulose. Matérias corantes ou pigmentos podem ser adicionados aos comprimidos ou aos revestimentos das drageias, por exemplo, para identificação ou a fim de caracterizar combinações de doses dos compostos activos.

Outras preparações farmacêuticas que podem ser utilizadas por via oral incluem cápsulas duras de encaixe feitas de

gelatina, bem como cápsulas moles seladas feitas de gelatina e um plastificante tal como glicerol ou sorbitol. As cápsulas duras de encaixe podem conter os compostos activos sob a forma de grânulos que podem ser misturados com cargas como a lactose, aglutinantes como os amidos, e/ou lubrificantes como o talco e o estearato de magnésio, e, facultativamente, estabilizantes. Nas cápsulas moles, os compostos activos são preferencialmente dissolvidos ou suspensos em líquidos adequados, tais como óleos gordos ou parafina líquida. Além disso, podem ser adicionados estabilizantes.

As preparações farmacêuticas possíveis que podem ser utilizadas por via rectal incluem, por exemplo, supositórios que são constituídos por uma combinação dos compostos activos com uma base para supositório. São bases para supositório adequadas, por exemplo, triglicéridos naturais ou sintéticos, ou hidrocarbonetos de parafina. Além disso, também é possível utilizar cápsulas rectais de gelatina que são constituídas por uma combinação dos compostos activos com uma base. Materiais de base possíveis incluem, por exemplo, triglicéridos líquidos, polietilenoglicóis ou hidrocarbonetos de parafina.

Formulações adequadas para administração parentérica incluem soluções aquosas dos compostos activos sob a forma solúvel em água, por exemplo, sais solúveis em água. Além disso, podem ser administradas suspensões dos compostos activos sob a forma de suspensões oleosas apropriadas para injeção. Solventes ou veículos lipófilos adequados incluem óleos gordos, como o óleo de sésamo, ou ésteres de ácido gordo sintéticos, como o oleato de etilo ou triglicéridos. As suspensões aquosas para injeção que podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão incluem, por exemplo, carboximetilcelulose, sorbitol e/ou dextrano. Facultativamente, a suspensão também pode conter estabilizantes.

Uma formulação farmacêutica para administração sistémica de acordo com o invento pode ser formulada para administração entérica, parentérica ou tópica. Na realidade, todos os três tipos de formulação podem ser utilizados simultaneamente a fim de alcançar a administração sistémica do ingrediente activo.

Formulações adequadas para administração oral incluem cápsulas de gelatina dura ou mole, drageias, pílulas, comprimidos, incluindo comprimidos revestidos, elixires,

suspensões, xaropes ou inalações, e suas formas de libertação controlada.

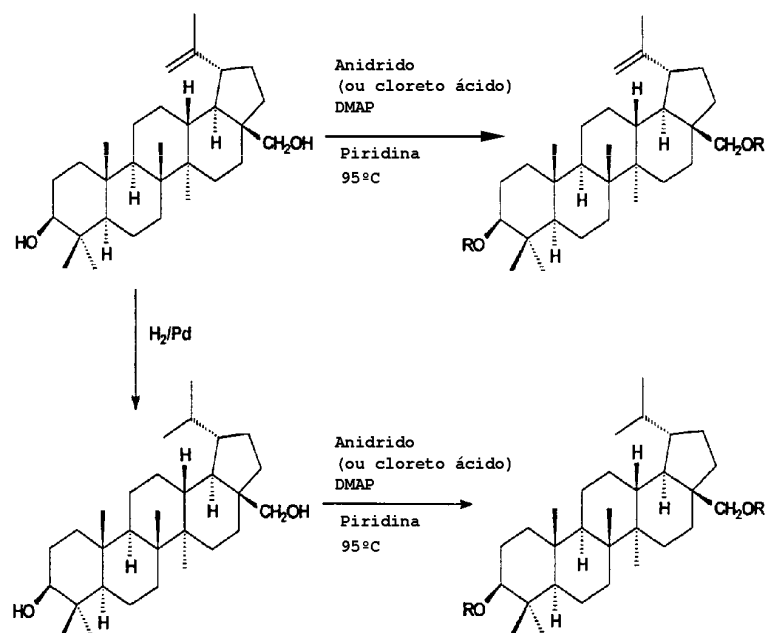
As formas de dosagem sólida, para além daquelas formuladas para administração oral, incluem supositórios rectais.

Os derivados de betulina ou de di-hidrobetulina do presente invento também podem ser administrados sob a forma de um implante quando combinados com um transportador de libertação lenta biodegradável. Alternativamente, os derivados de betulina ou de di-hidrobetulina do presente invento podem ser formulados sob a forma de um penso transdérmico para libertação contínua do ingrediente activo.

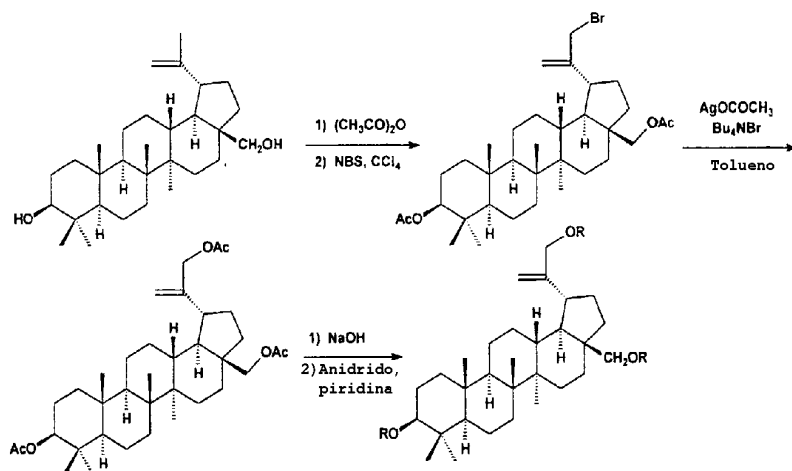
Formulações adequadas para administração tópica incluem cremes, geles, geleias, mucilagens, pastas e unguentos. Soluções injectáveis adequadas incluem soluções injectáveis endovenosas, subcutâneas e intramusculares. Alternativamente, os derivados de betulina ou de di-hidrobetulina podem ser administrados sob a forma de uma solução para infusão ou sob a forma de uma inalação ou pulverização nasal.

Os compostos do presente invento são sintetizados por reacção da betulina ou da di-hidrobetulina com um anidrido adequado em piridina anidra a fim de esterificar a betulina ou a di-hidrobetulina. A betulina ou a di-hidrobetulina foi aquecida ao longo de toda a noite a 95°C com 6 vezes o anidrido apropriado em piridina anidra na presença de 4-(dimetilamino)piridina. Quando a TLC indicou o consumo completo do material de partida, a solução reaccional foi diluída com EtOAc e lavada com solução de HCl a 10%. A camada de EtOAc foi de seguida seca sobre MgSO_4 e submetida a cromatografia em coluna.

O Esquema 1 representa a via sintética seguida no Exemplo 1, para compostos onde R_1 e R_2 são carboxiacilo C_2 - C_{20} substituído ou não substituído, e R_3 é hidrogénio.

Esquema 1

O Esquema 2 representa a via sintética seguida no Exemplo 1, para compostos onde R_1 e R_2 são, cada um, carboxiacilo $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ substituído ou não substituído, e R_3 é $-\text{OR}_4$, onde R_4 é hidrogénio ou acilo, incluindo um carboxiacilo $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ substituído ou não substituído.

Esquema 2

Os compostos **11** e **14** (as estruturas estão após o Exemplo 1) foram preparados por aquecimento da betulina e do composto **13** durante toda a noite a 40°C com 2 vezes de anidrido de 3,3-dimetilglutarilo em piridina anidra na presença de 4-(dimetilamino)piridina, seguido por um processamento semelhante ao dos compostos **4-6** e **8-10**. Os resíduos foram purificados por cromatografia em coluna.

O composto **12** foi sintetizado por agitação do composto **11** com 1,5 equivalentes de clorocromato de pirídio em CH₂Cl₂ à temperatura ambiente. Após 2 h, a mistura reaccional negra foi diluída com Et₂O e filtrada através de uma coluna de enchimento curta. O filtrado foi concentrado e submetido a cromatografia [*n*-hexano:acetona (4:1)] obtendo-se o composto **12** com um rendimento de 72%.

Uma solução de betulina e de trifenilfosfina (4 eq.) em THF seco foi adicionada gota a gota a azodicarboxilato de dietilo (4 eq.) num banho de gelo. A solução reaccional foi agitada durante 12 h. Após remoção do THF sob vácuo, o resíduo foi submetido a cromatografia com *n*-hexano:EtOAc (15:1) como eluente obtendo-se o composto **13**.

A avaliação biológica da inibição do VIH-1 foi levada a cabo de acordo com protocolos estabelecidos (Kashiwada, Y. et al., *J. Med. Chem.* 39:1016-1017 (1996); Hashimoto, F. et al., *Bioorg. & Med. Chem.* 5:2133-2143 (1997)). A linha de células T, H9, foi mantida em cultura contínua com meio completo (RPMI 1640 com 10% de soro de vitelo fetal suplementado com L-glutamina) sob CO₂ a 5% e 37°C. Alíquotas desta linha de células apenas foram utilizadas nas experiências quando se encontravam em fase de crescimento logarítmico. As amostras de teste foram primeiro dissolvidas em dimetilsulfóxido. Foram rotineiramente utilizadas para rastreio as seguintes concentrações finais da droga: 100, 20, 4 e 0,8 µg/ml. Para os agentes activos, foram preparadas diluições adicionais para avaliação subsequente de modo a poder ser obtido um valor da CE₅₀ exacto (definido abaixo). À medida que as amostras de teste foram preparadas, uma alíquota da linha de células H9 foi infectada com o VIH-1 (isolado IIIB), enquanto outra alíquota foi infectada de modo simulado com meio completo. O vírus de reserva utilizado para estes estudos apresentava tipicamente um valor de TCID₅₀ de 10⁴ unidades infecciosas/ml. A quantidade de vírus apropriada

para uma multiplicidade de infecção (moi) entre 0,1 e 0,01 unidades infecciosas/célula foi adicionada à primeira alíquota de células H9. A outra alíquota apenas recebeu meio de cultura, e estas células infectadas de modo simulado foram utilizadas para determinações da toxicidade (CI_{50} definida abaixo). Após 4 h de incubação a 37°C e sob CO_2 a 5%, ambas as populações de células foram lavadas três vezes com meio fresco e, em seguida, foram adicionadas aos poços apropriados de uma placa de 24 poços contendo as diversas concentrações da droga de teste ou do meio de cultura (controle infectado positivo/controlo de droga negativo). Além disso, o AZT também foi analisado durante cada uma das experiências como controle de droga positivo. As placas foram incubadas a 37°C e sob CO_2 a 5% durante 4 dias. Os sobrenadantes isentos de células foram recolhidos no Dia 4 para utilização num ensaio ELISA para o antigénio p24. O antigénio p24 é uma proteína do núcleo do VIH e por conseguinte é uma medida indirecta do vírus presente nos sobrenadantes. A toxicidade foi determinada por execução de contagens de células por um contador Coulter sobre as células H9 infectadas de modo simulado que receberam meio de cultura (sem toxicidade), amostra de teste ou AZT. Se a amostra de teste apresentasse capacidade supressora e não fosse tóxica, os seus efeitos eram reportados nos seguintes termos: CI_{50} , a concentração da amostra de teste que foi tóxica para 50% das células H9 infectadas de modo simulado; CE_{50} , a concentração da amostra de teste que foi capaz de suprimir a replicação do VIH em 50%; e Índice Terapêutico (IT), a proporção da CI_{50} para a CE_{50} .

Os Exemplos seguintes são ilustrativos, mas não limitativos, do método e das composições do presente invento. Outras modificações e adaptações adequadas da diversidade de condições e parâmetros normalmente encontrados e óbvios para os peritos na arte situam-se dentro do espírito e âmbito do invento.

EXEMPLO 1

Síntese de derivados de betulina e de di-hidrobetulina

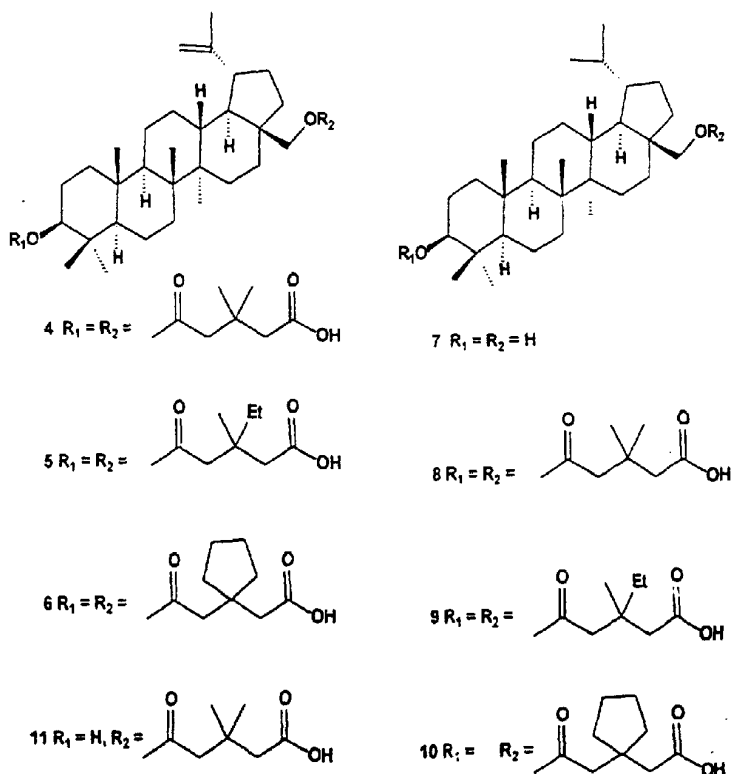
A betulina e a di-hidrobetulina foram aquecidas durante toda a noite a 65°C com 6 vezes o anidrido apropriado em piridina anidra na presença de 4-(dimetilamino)piridina. Quando a TLC indicou o consumo completo do material de partida, a solução reaccional foi diluída com EtOAc e lavada

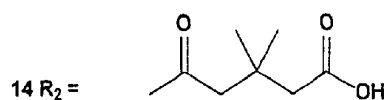
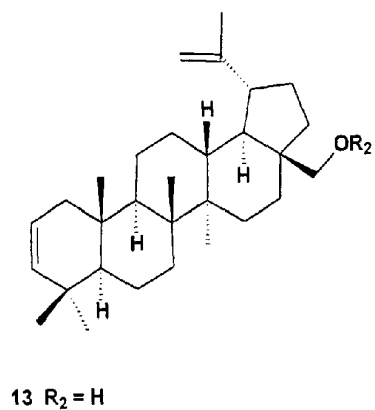
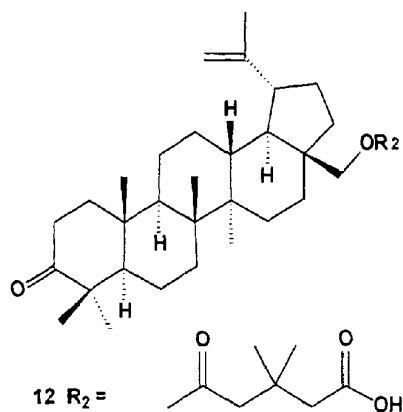
com solução de HCl a 10%. A camada de EtOAc foi de seguida seca sobre MgSO_4 e submetida a cromatografia em coluna.

Os compostos **11** e **14** foram preparados por aquecimento da betulina e do composto **13** durante toda a noite a 40°C com 2 vezes de anidrido de 3,3-dimetilglutarilo em piridina anidra na presença de 4-(dimetilamino)piridina, seguido por um processamento semelhante ao dos compostos **4-6** e **8-10**. Os resíduos foram purificados por cromatografia em coluna.

O composto **12** foi sintetizado por agitação do composto **11** com 1,5 equivalentes de clorocromato de pirídio em CH_2Cl_2 à temperatura ambiente. Após 2 h, a mistura reaccional negra foi diluída com Et_2O e filtrada através de uma coluna acondicionada curta. O filtrado foi concentrado e submetido a cromatografia [*n*-hexano:acetona (4:1)] a fim de produzir o composto **12** com um rendimento de 72%.

Uma solução de betulina e de trifenilfosfina (4 eq.) em THF seco foi adicionada gota a gota a azodicarboxilato de dietilo (4 eq.) num banho de gelo. A solução reaccional foi agitada durante 12 h. Após remoção do THF sob vácuo, o resíduo foi submetido a cromatografia com *n*-hexano:EtOAc (15:1) como eluente a fim de originar o composto **13**.





3,28-Di-O-(3',3'-dimetilglutaril)betulina (4)

Rendimento de 75% (após cromatografia em $CHCl_3$ -acetona [19:1]); um pó amorfo esbranquiçado; $[\alpha]^{25}_D +21,9 (c=0,2, CHCl_3)$; 1H -RMN ($CDCl_3$): 0,84, 0,85, 0,86, 0,97, 1,03 (cada 3H, s; 4-(CH_3)₂, 8- CH_3 , 10- CH_3 , 14- CH_3), 1,14 (12H, s; 3'-(CH_3)₂ e 3''-(CH_3)₂), 1,68 (3H, s; 20- CH_3), 2,42-2,50 (9H, m, H_2 -2', 2'', 4', 4'' e H-19), 3,86, 4,30 (cada 1H, d, $J=11,1$ Hz; H_2 -28), 4,49 (1H, dd, $J=5,2, 11,4$ Hz; H-3), 4,59, 4,69 (cada 1H, s lg; H_2 -29).

Anal. calculada para $C_{44}H_{70}O_8 \cdot \frac{1}{2}H_2O$: C 71,80, H 9,72; determinada C 71,73, H 9,66.

3,28-Di-O-(3',3'-metiletilglutaril)betulina (5)

Rendimento de 94% (após cromatografia em *n*-hexano:EtOAc [6:1]); um pó amorfo opaco; $[\alpha]^{25}_D +13,2$ ($c=0,5$, CHCl_3); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 0,85, 0,86, 0,91, 0,98, 1,04 (cada 3H, s; 4-(CH_3)₂, 8- CH_3 , 10- CH_3 , 14- CH_3), 1,09 (6H, s; 3'- CH_3 e 3''- CH_3), 1,69 (3H, s; 20- CH_3), 2,41-2,57 (9H, m, H_2 -2', 2'', 4', 4'' e H-19), 3,87, 4,30 (cada 1H, d, $J=11,0$ Hz; H_2 -28), 4,52 (1H, dd, $J=4,6, 11,0$ Hz; H-3), 4,60, 4,70 (cada 1H, s lg; H_2 -29).

Anal. calculada para $\text{C}_{46}\text{H}_{74}\text{O}_8 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$: C 72,31, H 9,89; determinada C 72,34, H 9,93.

3,28-Di-O-(3',3'-tetrametilenoglutaril)betulina (6)

Rendimento de 86% (após cromatografia em *n*-hexano:EtOAc [8:1]); um pó amorfo opaco; $[\alpha]^{25}_D +13,9$ ($c=0,99$, CHCl_3); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 0,85, 0,86, (x 2), 0,98, 1,04 (cada 3H, s; 4-(CH_3)₂, 8- CH_3 , 10- CH_3 , 14- CH_3), 1,69 (3H, s; 20- CH_3), 2,45 (1H, dt; $J=5,8, 10,6$ Hz; H-19), 2,52-2,59 (8H, m, H_2 -2', 2'', 4' e 4''), 3,88, 4,29 (cada 1H, d, $J=11,1$ Hz; H_2 -28), 4,51 (1H, dd, $J=5,0, 10,8$ Hz; H-3), 4,60, 4,70 (cada 1H, s lg; H_2 -29).

Anal. calculada para $\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C 72,33, H 9,61; determinada C 72,43, H 9,51.

Di-hidrobetulina (7)

Rendimento de 94%; um pó incolor; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 0,76, 0,77 (cada 3H, d, $J=3,4$ Hz; 20-(CH_3)₂), 0,83, 0,85, 0,96, 0,97, 1,03 (cada 3H, s; 4-(CH_3)₂, 8- CH_3 , 10- CH_3 , 14- CH_3), 3,20 (1H, dd, $J=5,3, 11,0$ Hz; H-3), 3,30, 3,79 (cada 1H, d, $J=11,0$ Hz; H_2 -28).

Anal. calculada para $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_2$: C 81,02, H 11,78; determinada C 81,05, H 11,71.

3,28-Di-O-(3',3'-dimetilglutaril)di-hidrobetulina (8)

Rendimento de 81% (após cromatografia em CHCl_3 -acetona [19:1]); um pó amorfo; $[\alpha]^{25}_D -15,0$ ($c=0,2$, CHCl_3); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 0,77, 0,84 (cada 3H, d, $J=6,7$ Hz; 20-(CH_3)₂), 0,85, 0,86 (x 2), 0,95, 1,04 (cada 3H, s; 4-(CH_3)₂, 8- CH_3 , 10- CH_3 , 14- CH_3), 1,14 (12H, s; 3'-(CH_3)₂ e 3''-(CH_3)₂), 2,43-2,54 (8H, m, H_2 -2', 2'', 4' e 4''), 3,83, 4,29 (cada 1H, d, $J=11,0$ Hz; H_2 -28), 4,52 (1H, dd, $J=4,8, 11,0$ Hz; H-3).

Anal. calculada para $\text{C}_{44}\text{H}_{72}\text{O}_8$: C 72,49, H 9,95; determinada C 72,28, H 9,95.

3,28-Di-O-(3',3'-metiletilglutaril)di-hidrobetulina (9)

Rendimento de 84% (após cromatografia em *n*-hexano:EtOAc [6:1]); um pó amorfo opaco; $[\alpha]_D^{25} -17,6$ ($c=0,49$, CHCl_3); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 0,78, 0,85 (cada 3H, d, $J=6,6$ Hz; $20-(\text{CH}_3)_2$), 0,86 x 2, 0,87, 0,91, 1,05 (cada 3H, s; $4-(\text{CH}_3)_2$, 8- CH_3 , 10- CH_3 , 14- CH_3), 1,09 (6H, s; 3'- CH_3 e 3''- CH_3), 2,40-2,56 (8H, m, H_2-2' , 2'', 4' e 4''), 3,84, 4,30 (cada 1H, d, $J=11,0$ Hz; H_2-28), 4,52 (1H, dd, $J=4,6$, 11,0 Hz; H-3), 4,60, 4,70 (cada 1H, s lg; H_2-29).

Anal. calculada para $\text{C}_{46}\text{H}_{76}\text{O}_8$: C 72,98, H 10,12; determinada C 73,08, H 10,09.

3,28-Di-O-(3',3'-tetrametilenoglutaril)di-hidrobetulina (10)

Rendimento de 89% (após cromatografia em *n*-hexano:EtOAc [8:1]); um pó amorfo opaco; $[\alpha]_D^{25} -18,2$ ($c=0,52$, CHCl_3); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 0,78, 0,85 (cada 3H, d, $J=6,6$ Hz; $20-(\text{CH}_3)_2$), 0,85, 0,87 (2x), 0,96, 1,05 (cada 3H, s; $4-(\text{CH}_3)_2$, 8- CH_3 , 10- CH_3 , 14- CH_3), 2,52-2,63 (8H, m, H_2-2' , 2'', 4' e 4''), 3,84, 4,28 (cada 1H, d, $J=11,1$ Hz; H_2-28), 4,51 (1H, dd, $J=5,4$, 10,3 Hz; H-3).

Anal. calculada para $\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_8 \cdot 3/2\text{H}_2\text{O}$: C 71,34, H 9,85; determinada C 71,57, H 9,53.

28-O-(3',3'-dimetilglutaril)betulina (11)

Rendimento de 71% (após cromatografia em *n*-hexano:acetona [9:1]); um pó amorfo opaco; $[\alpha]_D^{25} +12,3$ ($c=0,49$, CHCl_3); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 0,77, 0,83, 0,98 x 2, 1,04 (cada 3H, s; $4-(\text{CH}_3)_2$, 8- CH_3 , 10- CH_3 , 14- CH_3), 1,15 (6H, s; 3'-(CH_3)₂), 1,69 (3H, s, 20- CH_3), 2,40, 2,48 (1H, m, H-19), 2,48 (4H, s; H_2-2' e H_2-4), 3,20 (1H, dd, $J=5,2$, 10,9 Hz; H-3), 3,87, 4,29 (cada 1H, d, $J=11,1$ Hz; H_2-28), 4,60, 4,70 (cada 1H, br s; H_2-29).

Anal. calculada para $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_5 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: C 74,89, H 10,59; determinada C 74,89, H 10,56.

3-Desoxi-3-oxo-28-O-(3',3'-dimetilglutaril)betulina (12)

Rendimento de 72% (após cromatografia em *n*-hexano:acetona [4:1]); um pó amorfo opaco; $[\alpha]_D^{25} +32,4$ ($c=0,33$, CHCl_3); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 0,94, 1,00, 1,04, 1,08 x 2 (cada 3H, s; $4-(\text{CH}_3)_2$, 8- CH_3 , 10- CH_3 , 14- CH_3), 1,16 (6H, s; 3'-(CH_3)₂), 1,69 (3H, w, 20- CH_3), 2,41-2,54 (7H, m, H_2-2 , 2', 4', e H-19), 3,87, 4,30 (cada 1H, d, $J=11,1$ Hz; H_2-28), 4,61, 4,70 (cada 1H, s lg; H_2-29).

Anal. calculada para $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_5$: C 76,24, H 10,03; determinada C 76,47, H 10,31.

3-Desoxi-2,3-di-hidrobetulina (13)

Rendimento de 74% (após cromatografia em *n*-hexano:EtOAc [15:1]); $[\alpha]^{25}_D +46,5$ (c=0,2, CHCl₃); ¹H-RMN (CDCl₃): 0,90, 0,93, 0,96, 0,99, 1,04 (cada 3H, s; 4-(CH₃)₂, 8-CH₃, 10-CH₃, 14-CH₃), 1,68 (3H, s; 20-CH₃), 2,32-2,53 (2H, m, H-2a, e H-19), 2,85 (1H, ddd, *J*=5,5, 11,1, 11,1 Hz; H-2e), 4,61, 4,74 (cada 1H, s lg; H₂-29), 9,65 (1H, s; H-28).

Anal. calculada para C₃₀H₄₈O · ¼H₂O: C 83,95, H 11,39; encontrada C 84,00, H 11,34.

3-Desoxi-2,3-di-hidro-28-O-(3',3'-dimetilglutaril)betulina (14)

Rendimento de 83% (após cromatografia em *n*-hexano:CHCl₃ [8:2:1]); um pó amorfo opaco; $[\alpha]^{25}_D +26,37$ (c=0,49, CHCl₃); ¹H-RMN (CDCl₃): 0,84, 0,85, 0,92, 0,97, 1,04 (cada 3H, s; 4-(CH₃)₂, 8-CH₃, 10-CH₃, 14-CH₃), 1,13 (6H, s; 3'-(CH₃)₂), 1,67 (3H, s, 20-CH₃), 2,39-2,50 (1H, m, H-19), 2,45, 2,45 (cada 2H, s; H₂-2' e H₂-4'), 3,86, 4,28 (cada 1H, d, *J*=11,1 Hz; H₂-28), 4,58, 4,67 (cada 1H, s lg; H₂-29), 5,34-5,37 (2H, m; H-2 e H-3).

Anal. calculada para C₃₇H₆₀O₄: C 78,12, H 10,63; determinada C 77,99, H 10,47.

EXEMPLO 2**Actividade farmacológica**

Os compostos do presente invento foram analisados quanto à actividade anti-VIH de acordo com os processos de ensaio seguintes. A linha de células T, H9, e a linha de células promonocíticas, U937, foram mantidas separadamente em cultura contínua com meio completo (RPMI 1640 com 10% de soro de vitelo fetal) sob CO₂ a 5% e 37°C. As linhas de células foram utilizadas nas experiências apenas quando na fase de crescimento logarítmico, enquanto que as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) não infectadas foram primeiro estimuladas com PHA (1 µg/ml) durante três dias. Todos os alvos celulares foram incubados com VIH-1 (isolado IIIB, TCID₅₀ de 10⁴ UI/ml, a uma multiplicidade de infecção de 0,01-0,01 UI/célula) durante uma hora a 37°C e sob CO₂ a 5%. As linhas de células e as PBMC foram cuidadosamente lavadas a fim de remover os viriões não adsorvidos e ressuspensas a 4 x 10⁵ células/ml em meio completo ou meio completo com 10% v/v de interleucina-2 (IL-2), respectivamente. Aliquotas de 1 ml foram colocadas nos poços de placas de cultura de

24 poços contendo um volume igual dos compostos em teste (diluídos no meio de cultura apropriado). A toxicidade de cada um dos compostos foi avaliada por determinação do número de células não infectadas expostas ao composto que persistiram após quatro dias a 37°C e sob CO₂ a 5%. O ensaio ELISA para o antígeno p24 foi utilizado para determinar o nível de vírus libertado no meio das culturas infectadas com o VIH. O ensaio para o antígeno p24 utilizou um anticorpo monoclonal específico anti-p24 do VIH-1 como anticorpo de captura a revestir placas de 96 poços. Após um período de incubação da amostra, foi utilizado soro de coelho contendo anticorpos para o p24 de VIH-1 a fim de marcar qualquer p24 capturado sobre a superfície do poço de microtitulação. Foi de seguida utilizado soro de cabra anti-coelho conjugado com peroxidase para marcar os anticorpos de coelho específicos para o p24 de VIH-1 que formaram complexos com o p24 capturado. A presença do p24 nas amostras em teste foi seguidamente revelada pela adição de substrato. O limite de exclusão no ensaio ELISA para o antígeno p24 era de 12,5 pg/ml. O p24 no meio de cultura foi quantificado contra uma curva padrão contendo quantidades conhecidas de p24. Foram determinadas as concentrações eficaz (CE₅₀) e inibitória (CI₅₀) para a actividade anti-VIH e para a toxicidade, respectivamente.

Tabela 1. Actividades anti-VIH da betulina e de derivados relacionados

Composto	Actividade anti-VIH* CE ₅₀ (µM)	Citotoxicidade* CI ₅₀ (µM)	Índice Terapêutico* (IT= CI ₅₀ /CE ₅₀)
1	1,4	13,0	9,3
2	0,0023	4,5	1,974
3	23	43,7	1,9
4	0,00066	14,2	21,515
5	0,0053	18,4	3,476
6	0,077	20,5	267
7	NT	NT	NT
8	0,0047	10,6	2,253
9	0,075	18,7	248
10	0,58	21,6	37
11	3,6	28,2	7,8
12	10,0	29,2	2,9
13	11,9	31,9	2,7
14	5,4	28,3	5,2
AZT	0,015	500	33,333

NT: não testado * todos os dados representados como uma média de pelo menos duas experiências

Os compostos **3-6**, **8-14** e o AZT foram examinados quanto à actividade anti-VIH em linfócitos H-9 tal como representado na

Tabela 1. A betulina (**3**) com um grupo hidroxil C-28 foi menos potente que o ácido betulínico (**1**) com um ácido carboxílico C-28. No entanto, a adição de dois ésteres de 3',3'-dimetilglutarilo à betulina (**3**) originou o composto (**4**), que apresentou actividade significativamente intensificada e um índice terapêutico (IT) notavelmente elevado, com valores da CE_{50} e IT de 0,00066 μ M e de 21,515, respectivamente. Visto que o composto **4** foi cerca de 3 vezes mais potente e apresentou um IT mais elevado do que o composto **2**, a cadeia lateral de acilo C-28 conduziu a actividade melhorada. Quando a substituição 3' foi modificada para 3'-etil-3'-metilo (**5**) ou para 3',3'-tetrametileno (**6**), os valores da CE_{50} situavam-se ainda na gama nanomolar, mas os compostos foram menos activos quando comparados com o composto **4**. A saturação da ligação dupla C20-C29 no composto **4** originou o composto **8** e conduziu a uma queda de cerca de 7 a 9 vezes na actividade e no IT, respectivamente. De forma semelhante, os compostos di-hidro **9** e **10** apresentaram menor inibição do que compostos não saturados **5** e **6**. Dado que os compostos **6** e **10**, que contêm um grupo 3',3'-tetrametilenoglutarilo, exibiram a menor actividade e os valores do IT mais baixos entre as duas séries de compostos (**4-6** e **8-10**, respectivamente), a actividade anti-VIH não é favorecida por um volume adicional na posição 3'.

O composto **11** é esterificado apenas na posição C-28 e é 6 vezes mais potente em comparação com o composto **3**. No entanto, o composto **11** é muito menos potente que o **4**, confirmando a importância da cadeia lateral de 3-acilo para a actividade intensificada. A substituição do grupo 3-hidroxil de **11** por uma cetona diminui adicionalmente a actividade (comparar **11** e **12**). A desidratação do anel "A" da betulina originou o composto **13** não saturado, o qual apresentou uma CE_{50} ligeiramente melhorada em comparação com o composto **3**. O produto acilado, composto **14**, exibiu actividade anti-VIH intensificada, mas talvez por causa da falta de uma porção 3-acilo, a CE_{50} do composto **14** foi de apenas 5,4 μ M.

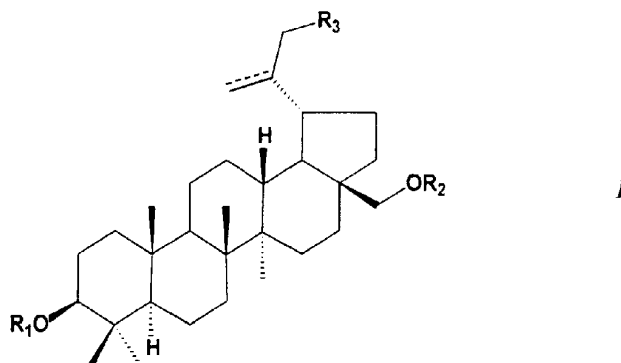
Em conclusão, o derivado de betulina diacilado **4** apresentou actividade anti-VIH digna de registo, mesmo superior à do derivado do ácido betulínico **2**. A cadeia lateral de acilo C-28 pode intensificar adicionalmente a actividade anti-VIH, bem como o IT, mas a cadeia lateral de acilo C-3 foi essencial para a actividade óptima. O grupo 3',3'-

dimetilglutarilo originou a melhor actividade entre os três ésteres 3',3'-dissubstituídos. Além disso, os derivados de betulina (**4-6**) foram mais potentes do que os compostos de di-hidrobetulina correspondentes (**8-10**).

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de fórmula I



ou um seu sal farmacologicamente aceitável, em que

R_1 é um carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído,

R_2 é um carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído, e

R_3 é hidrogénio, halogéneo, amino, mono- ou di-alquilamino facultativamente substituídos, ou $-OR_4$, onde R_4 é hidrogénio, alcenoílo C_{1-4} , benzoílo ou carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído,

em que a linha tracejada representa uma ligação dupla facultativa entre C20 e C29; desde que o composto não seja:

3,29-dimaleato de betulina,

3,29-di[tetracloroftalato] de betulina,

3,29-diftalato de betulina, ou

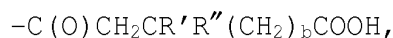
3,29-dissuccinato de betulina.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que R_1 e R_2 são, cada um, carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído, e R_3 é hidrogénio.

3. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que R_1 e R_2 são, cada um, carboxiacilo C_2-C_{20} substituído ou não substituído, e R_3 é halogéneo ou $-OR_4$, onde R_4 é hidrogénio ou carboxiacilo substituído ou não substituído.

4. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que R_1 e R_2 são, cada um, um grupo carboxialcanoílo C_4-C_{16} que é substituído de forma geminal no átomo de carbono 3'.

5. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que R_1 e R_2 apresentam, cada um, a fórmula:



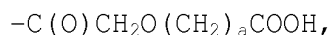
onde

R' e R'' são, cada um, alquilo C_{1-4} , ou R' é hidrogénio e R'' é alquilo C_{1-4} , ou R' e R'' são tomados em conjunto para formar uma ligação di-, tri-, tetra- ou pentametileno, e b é de zero a doze.

6. Composto de acordo com a reivindicação 5, em que b é zero a 4.

7. Composto de acordo com a reivindicação 6, em que R' e R'' são, cada um, metilo, e b é zero ou 1.

8. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que R_1 e R_2 apresentam, cada um, a fórmula:



onde a é de zero a doze.

9. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que R_3 é um de:

i. hidrogénio;

ii. $-O-C(O)CH_2CR'R''(CH_2)_bCOOH$, onde R' e R'' são, cada um, alquilo C_{1-4} , ou R' é hidrogénio e R'' é alquilo C_{1-4} , ou R' e R'' são tomados em conjunto para formar uma ligação di-, tri-, tetra- ou pentametileno, e b é de zero a doze;

iii. $-O-C(O)CH_2O(CH_2)_aCOOH$, onde a é de zero a 12; ou

iv. $-OH$.

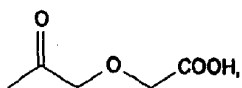
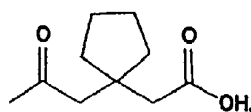
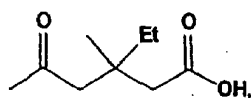
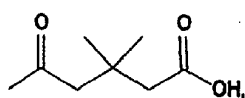
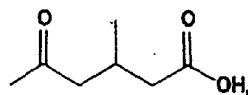
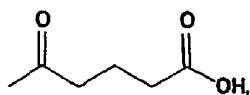
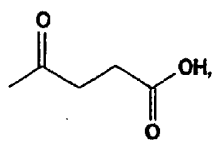
10. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que R_3 é:



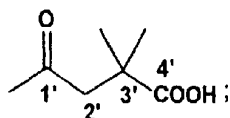
onde R' e R'' são, cada um, metilo, e b é zero ou um.

11. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que:

R_1 e R_2 são, cada um, um de:

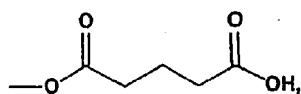
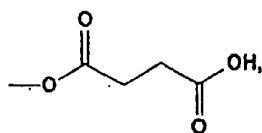


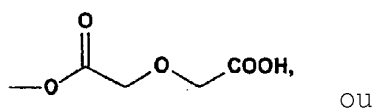
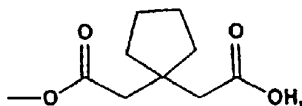
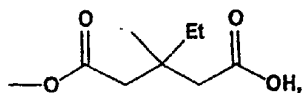
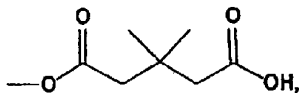
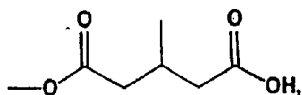
ou



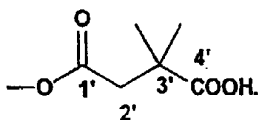
e

R₃ é hidrogénio, hidroxí, ou um de:



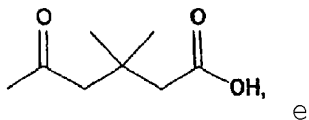


ou



12. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que:

R_1 e R_2 são, cada um,



e

R_3 é hidrogénio.

13. Composição farmacêutica compreendendo um ou mais compostos de acordo com a reivindicação 1, ou um seu éster, sal, éter, sulfato ou glucuronida, farmacêuticamente aceitáveis, e um transportador farmacêuticamente aceitável.

14. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 13, compreendendo adicionalmente uma droga

seleccionada a partir de um agente antiviral ou um agente imunoestimulante.

15. Composição farmacêutica da acordo com a reivindicação 14, em que o referido agente antiviral é seleccionado a partir do grupo constituído por nevirapina, delavirdina, efavirenz, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, hidroxiureia, interleucina-2, gama-globulina, amantadina, guanidina hidroxibenzimidazole, interferão α , interferão β , interferão γ , uma tio-semicarbazona, metisazona, rifampina, ribavirina, um análogo de pirimidina, um análogo de purina, foscarnet, ácido fosfonoacético, aciclovir, um didesoxinucleósido e ganciclovir.

16. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 14, em que o referido agente antiviral é um análogo de nucleósido.

17. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 16, em que o referido análogo de nucleósido é seleccionado a partir do grupo constituído por AZT, 3TC, ddI, ddC, D4T, abacavir e adefovir.

18. Composição farmacêutica compreendendo um ou mais compostos de acordo com a reivindicação 5, ou um seu éster, sal, éter, sulfato ou glucuronida, farmaceuticamente aceitáveis, e um transportador farmaceuticamente aceitável.

19. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 18, compreendendo adicionalmente uma droga seleccionada a partir de um agente antiviral ou um agente imunoestimulante.

20. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 19, em que o referido agente antiviral é seleccionado a partir do grupo constituído por nevirapina, delavirdina, efavirenz, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, hidroxiureia, interleucina-2, gama-globulina, amantadina, guanidina hidroxibenzimidazole, interferão α , interferão β , interferão γ , uma tio-semicarbazona, metisazona, rifampina, ribavirina, um análogo de pirimidina, um análogo de purina, foscarnet, ácido

fosfonoacético, aciclovir, um didesoxinucleósido e ganciclovir.

21. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 19, em que o referido agente antiviral é um análogo de nucleósido.

22. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 21, em que o análogo de nucleósido é seleccionado a partir do grupo constituído por AZT, 3TC, ddI, ddC, D4T, abacavir e adefovir.

23. Composição farmacêutica, tal como reivindicada em qualquer uma das reivindicações 13 a 22, para inibição de uma infecção retroviral em células ou tecido de um animal.

24. Composição farmacêutica, tal como reivindicada na reivindicação 23, em que o referido animal é um ser humano.

25. Composição farmacêutica, tal como reivindicada em qualquer uma das reivindicações 13 a 22, para o tratamento de um doente que sofre de uma patologia relacionada com retrovírus.

26. Composição farmacêutica, tal como reivindicada na reivindicação 25, em que a referida patologia relacionada com retrovírus é uma infecção por VIH.

Lisboa,