

(11) *Número de Publicação:* **PT 88961 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)
C07H015/252 A

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

<p>(22) <i>Data de depósito:</i> 1988.11.08</p> <p>(30) <i>Prioridade:</i> 1987.11.10 GB 8726272</p> <p>(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.11.30</p> <p>(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 02/94 1994.02.01</p>	<p>(73) <i>Titular(es):</i> FARMITALIA CARLO ERBA, S.P.A. VIA CARLO IMBONATI, 24 MILÃO 20159 IT</p> <p>(72) <i>Inventor(es):</i> ALBERTO BARGIOTTI IT MARIA GRANDI IT ANTONINO SUARATO IT FERNANDO GIULIANI IT</p> <p>(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO LUÍS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DE MIGUEL LUPI 16 R/C 1200 LISBOA PT</p>
---	--

(54) *Epígrafe:* **PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS DE 4-DEMETOXI-ANTRACICLINA**

(57) *Resumo:*

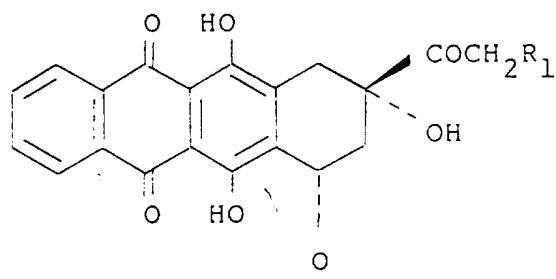
[Fig.]

FARMITALIA CARLO ERBA

S.R.L.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS DE 4-DEMETOXI-
-ANTRACICLINA"

A presente invenção refere-se a um processo de preparação de glicosidos de antraciclina de fórmula geral



na qual R_1 representa um átomo de hidrogénio ou um grupo hidroxil;

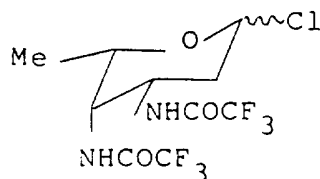
e dos seus sais de adição de ácido aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.

Um sal preferido é o cloridrato.

Os compostos da presente invenção são derivados de 4-demetoxi-daunorubicina (idarubicina) que é um antibiótico anti-tumoral conhecido. Os glicosidos de antraciclina preferidos de fórmula geral I são 4-demetoxi-4'-amino-4'-desoxi-daunorubicina (I-A) ($I;R_1=H$) e 4-demetoxi-4'-amino-4'-desoxi-doxorubicina (I-B) ($I;R_1=OH$).

O processo para a preparação de glicosidos de antraciclina de fórmula geral I ou dos seus sais de adição de ácido aceitáveis em farmácia consiste em;

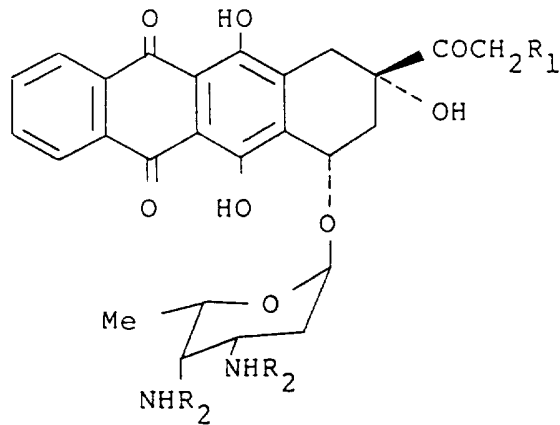
i) fazer reagir 4-demetoxi-daunomicinona, uma aglicona conhecida da idarubicina de antraciclina anti-tumoral com o cloreto de 2,3,4,6-tetradeso-3,4-ditri-fluoracetamino-L-lixoexopiranosilo de fórmula geral:



(II)

4.

ii) remover os grupos N-trifluoracetilos do composto obtido deste modo de fórmula geral:



(III)

na qual R₁ representa um átomo de hidrogénio; e R₂ representa um grupo CF₃CO-,

para se obter deste modo um glicosido de fórmula geral I na qual R₁ representa um átomo de hidrogénio;

iii) se apropriado, converter o referido glicosido de fórmula geral I num seu sal de adição de ácido aceitável sob o ponto de vista farmacêutico;

iv) se apropriado, fazer-se a bromação do referido glicosido de fórmula geral I ou de um seu sal de adição de ácido aceitável em farmácia e hidrolizar-se o derivado 14-bromado, assim obtido, de tal forma que se obtenha o glicosido de antraciclina correspondente de fórmula geral I na qual R_1 representa um grupo hidroxí; e

v) se apropriado, converter-se o referido glicosido de fórmula geral I, na qual R_1 representa um grupo hidroxí, em um seu sal de adição de ácido aceitável em farmácia.

Pode obter-se o cloreto de 2,3,4,6-tetradesoxi-3,4-ditri-fluoroacetimido-L-lixo-hexopiranosilo de fórmula geral II pelo processo descrito no pedido de patente de invenção norte-americana nº. 4 366 149. A fase (i) do presente processo pode ser efectuada fazendo-se reagir a 4-demetoxi-daunomicinona, dissolvida em cloreto de metileno anidro, à temperatura ambiente, com cloreto de 2,3,4,6-tetradesoxi-3,4-ditri-fluoroacetamido-L-lixo-hexopiranosilo, na presença de um peneiro molecular e sulfanato de trifluorometano e prata.

Após a fase i), mas antes da fase ii), o composto de fórmula geral II pode ser submetido a uma purificação cromatográfica em uma coluna de gel de sílica, utilizando-se como eluente uma mistura de cloreto de metileno/acetona a 97:3 v/v. A fase ii) pode ser efectuada submetendo-se o composto de fórmula geral III à hidrólise alcalina com solução aquosa de hidróxido de sódio 0,2 N,

4.

à temperatura ambiente, sob atmosfera de azoto e durante uma hora e 30 minutos.

A fase iii) pode realizar-se por tratamento da 4-demetoxi-4'-amino-4'-desoxi-daunorubicina com ácido clorídrico metanólico isolando-se a 4-demetoxi-4'-amino-4'-desoxi-doxorubicina sob a forma do seu cloridrato. A fase iv) pode ser realizada por bromação e hidrólise suave como descrito no pedido de patente de invenção norte-americana nº. 4 112 076. O derivado 14-bromo pode ser hidrolisado mediante tratamento com solução aquosa de formato de sódio à temperatura ambiente. A 4-demetoxi-4'-amino-4'-desoxi-doxorubicina é tipicamente isolado sob a forma do seu cloridrato na fase v) mediante tratamento com ácido clorídrico metanólico.

Os compostos de fórmula geral I e os seus sais são úteis como agentes anti-tumorais.

Exemplo 1

Preparação de 4-demetoxi-4'-amino-4'-desoxi-daunorubicina (I-A)

O acoplamento de 4-demetoxi-daunomicinona (0,55 g, 1,5 mmole) em cloreto de metileno (75 ml) com cloreto de 2,3,4,6-tetradesoxi-3,4-ditri-fluoroacetamido-L-lixo-hexopiranosilo (II, 0,43 g, 1,2 mmoles) na presença de peneiro molecular (4,A - Merck, 4 g) foi realizada utilizando-se sulfonato de trifluorometano e prata (0,31 g em 10 ml de éter dietílico anidro) como catalisador. Após 15 minutos sob agitação vigorosa à temperatura ambiente, a mistura reaccional foi tratada com uma solução aquosa saturada de carbonato de hidrogénio e sódio e a fase orgânica foi a seguir separada e evaporada sob vácuo. A purificação cromatográfica do resíduo impuro em uma coluna de gel de sílica, utilizando-se uma mistura de cloreto de metileno/acetona a 97:3 em volume, como eluente, forneceu 4-demetoxi-4'-trifluoroacetamida-4'-desoxi-N-trifluoroacetil-daunorubicina (III, 0,56 g, 68%):

P.F. 163^o-164^oC, com decomposição.

O espectro de RMP (200 MHz, CDCl₃) mostrou absorções a 1,24 (d, J=6,6 Hz, 3H, CH₃-s'), 2,42 (s, 3H, COCH₃), 4,33 (m, 2H, h-3'h-4'), 4,49 (dq, J<1, 4,0 Hz, 1H, H-1'), 5,26 (dd, J=1,8, 4 Hz, 1H, H-7), 5,55 (d, J<1, 4,0 Hz, 1H, H-1'), 5,64 (d, J=7,0 Hz, 1H, NH-COCF₃-4'), 6,78 (d, J=6,0 Hz, 1H, NH-COCF₃-3') 7,81-7,86 (m, 2H, H-2, H-3), 8,29-8,36 (m, 2H, H-1, H-4), 13,30 (s, 1H, OH-11), 13,63δ (s, 1H, OH-6). 0,5 g (0,73 mmole) de III em 45 ml de

4.

-7-

hidróxido de sódio aquoso 0,2 N, agitado sob atmosfera de azoto à temperatura ambiente.

Após uma hora e meia a mistura reaccional foi acidificada para pH 2,5 com solução aquosa de ácido clorídrico e em seguida extraída com cloreto de metileno para eliminar algumas impurezas. A fase aquosa foi ajustada para pH 8,1, extraída com cloreto de metileno e o extracto foi lavado com água, seco sobre sulfato de sódio anidro e concentrado até um pequeno volume. A acidificação com ácido clorídrico metanólico para pH 4,5, seguida da adição de éter etílico, forneceu 4-demetoxi-4'-amino-4'-desoxi-daunorubicina (I-A, 0,37 g 90% de rendimento) sob a forma do seu cloridrato, ponto de fusão 155^o-156^oC, com decomposição.

Exemplo 2

Preparação de 4-demetoxi-4'-amino-4'-desoxi-dexorubicina (I-B)

0,2 g de I-A dissolvido numa mistura de 2,7 ml de metanol anidro e 7,5 ml de dioxano foram misturados com 0,2 ml de ortoformato de etilo e 0,75 ml de uma solução de 0,94 g de bromo em 10 ml de cloreto de metileno.

4

Após uma hora e meia à temperatura ambiente, a mistura reaccional foi vertida sobre uma mistura de 40 ml de éter etílico e 20 ml de éter do petróleo. Formou-se um precipitado vermelho que se filtrou e se , lavou diversas vezes com éter etílico para eliminar completamente a acidez. O precipitado foi dissolvido numa mistura de 6 ml de acetona e 6 ml de ácido bromídrico aquoso 0,25 N.

Após 10 horas à temperatura ambiente, adicionaram-se 0,3 g de formato de sódio dissolvido em 1 ml de água. A mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente durante 30 horas, e adicionada com 6 ml de água e a solução foi extraída com cloreto de metileno para eliminar a parte aglícona.

A fase aquosa foi adicionada com 5 ml duma solução aquosa a 8% de carbonato de hidrogénio e sódio e repetidamente extraída com cloreto de metileno. Os extractos orgânicos foram secos com sulfato de sódio e evaporados até um pequeno volume sob vazio.

A solução vermelha resultante ajustada para um pH 3,5 com ácido clorídrico metanólico anidro, foi adicionada com um excesso de éter etílico para fornecer 0,17 g de 4-demetoxi-4'-amino-4'-desoxi-doxorubicina (I-B), sob a forma de cloridrato. Ponto de fusão 156°-157°C (com decomposição).

Actividade biológica

"IN VITRO"

Os compostos I-A e I-B foram ensaiados para verificação da actividade "in vitro" como inibidores de desenvolvimento de colónias em duas linhas de células humanas: LOVO (adenocarcinoma de cólon) e LOVO/DX (adenocarcinoma de cólon resistente à doxorubicina). Ambos os compostos se evidenciaram mais citotóxicos do que os fármacos iniciais, respectivamente, 4'-amino-4'-desoxi-daunorubicina e 4'-amino-4'-desoxi-doxorubicina (pedido de patente de invenção norte americana nº. 4 366 149) sobre LOVO e LOVO/DX (Quadro 1).

Quando comparados com daunorubicina e doxorubicina observou-se uma actividade admiravelmente mais elevada sobre as linhas de células resistentes à doxorubicina para I-A, 4'-amino-4'-desoxi-daunorubicina, I-B e 4'-amino-4'-desoxi-doxorubicina

Quadro 1. Actividade citotóxica sobre LOVO e LOVO/DX mediante um tratamento de 4 horas.

COMPOSTO	ID ₅₀ ^c (mg/ml)		R.I. ^d
	LOVO	LOVO/DX	
DOXORUBICINA ^a	56,5	2087	36,9
4'-AMINO-4'-DESOXI-DX ^b	34,6	121,6	3,5
I-B ^b	8,6	31,5	3,6
DAUNORUBICINA ^a	42,4	2357	55,5
4'-AMINO-4'-DESOXI-DN ^b	82,5	440	5,3
I-A ^b	12,5	65,6	5,24

a) Dados de dez experiências

b) Dados de três experiências

c) DI₅₀ Dose inibidora 50%: derivada das curvas de dose-resposta

d) I.R. Índice de resistência: relação entre DI₅₀ sobre LOVO versus DI₅₀ sobre LOVO/DX

4

"IN VIVO"

Os compostos I-A e I-B foram ensaiados preliminarmente " in vivo sobre leucemia disseminada de Gross nos murganhos (Quadro 2).

Ambos os compostos resultaram mais potentes do que os fármacos iniciais.

Quadro 2.- Actividade sobre leucemia de Gross disseminada tratamento endovenoso um dia após inoculação do tumor

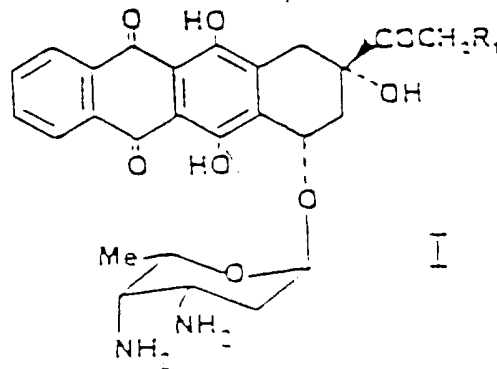
COMPOSTO	O.D. ^a (mg/kg)	T/C % ^b
DOXORUBICINA	13	200
4'-AMINO-4'-DESOXI-DX	26	183
I-B	3,9	250
DAUNORUBICINA	15	200
4'-AMINO-4'-DESOXI-DN	28	185
I-A	4,4	240

a) Dose óptima

b) Mediana dos tempos de sobrevivência dos murganhos tratados/
/mediana dos tempos de sobrevivência do controlo × 100.

Reivindicações

Processo analógico para a preparação de compostos glicosídicos de fórmula geral

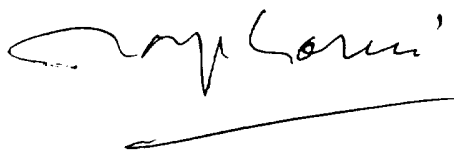


na qual

R_1 representa um átomo de hidrogénio ou um grupo hidroxil, e dos seus sais de adição de ácido aceitáveis em farmácia, caracterizado pelo facto de se fazer reagir, à temperatura ambiente, o composto conhecido 4-demetoxi-daunomicinona, dissolvido em diclo-

reto de metileno anidro, com o cloreto de 2,3,4,6-tetradesoxi-3,4-ditri-fluoroacetamido-L-lixo-hexapiranosilo conhecido, na presença de um peneiro molecular e sulfonato de trifluorometano e prata, para se obter o glicosido intermédio protegido no átomo de azoto, 4-demetoxi-4'-trifluoroacetamido-4'-desoxi-N-trifluoroacetil-daunorubicina, de se purificar depois este último sobre uma coluna de gel de sílica cromatográfica, utilizando como eluente uma mistura de dicloreto de metileno-acetona a 97:3 v/v, de se submeter a uma hidrólise alcalina suave com uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,2 N, à temperatura ambiente, sob atmosfera de azoto durante 1 hora e 30 minutos, para se obter o glicosido desejado, 4-demetoxi-4'-amino-4'-desoxi-daunorubicina de fórmula geral I, na qual R_1 representa um átomo de hidrogénio, e de se isolar sob a forma do seu cloridrato mediante adição de cloreto de hidrogénio metanólico e, eventualmente, de se converter o derivado de daunorubicina obtido no derivado de doxorubicina correspondente mediante bromação, seguida de tratamento do derivado 14-bromado resultante com uma solução aquosa de formato de sódio à temperatura ambiente e, eventualmente, de se tratar o derivado resultante de doxorubicina de fórmula geral I, na qual R_1 representa um grupo hidróxi, com cloreto de hidrogénio metanólico para se obter o seu cloridrato,

Lisboa, 8 de Novembro de 1988
O Agente Oficial da Propriedade Industrial

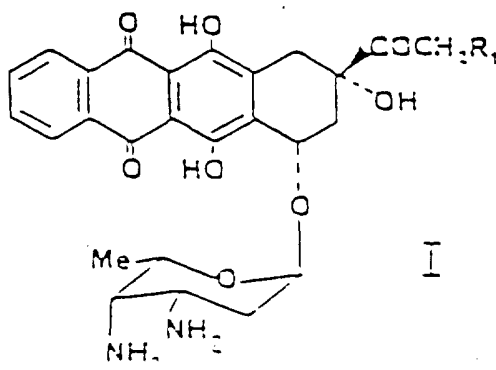


4.

RESUMO

"Processo para a preparação de novos derivados de 4-demetoxi-antraciclina"

Descreve-se um processo para a preparação de novos glicosídeos de antraciclina com actividade antitumor de fórmula geral



na qual R_1 representa um átomo de hidrogênio ou um grupo hidroxil, de acordo com o qual se condensa a 4-demetoxi-daunomicinona com o cloreto de 2,3,4,6-tetradesoxi-3,4-ditri-fluoroacetamido-L-lixo-hexapiranosilo, removendo-se os grupos protectores do átomo de azoto de trifluoroacetilo do composto intermédio assim obtido mediante hidrólise alcalina suave para se obter então a 4-demetoxi-4'-amino-4'-desoxi-daunorubicina de fórmula geral I, na qual o símbolo R_1 representa um átomo de hidrogênio, a qual, eventualmente, se transforma no seu derivado de doxorubicina de fórmula geral I,

4.

na qual R_1 representa um grupo hidroxil, mediante reacção com bromo e subsequente hidrólise do seu derivado 14-bromado com formato de sódio. Os derivados glicosídicos de antraciclina assim obtidos apresentam actividade antitumor.

Lisboa, 8 de Novembro de 1988
O Agente Oficial da Propriedade Industrial

