

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da
Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2013/053034 A2

(43) Data de Publicação Internacional
18 de Abril de 2013 (18.04.2013) W I P O I P C T

- (51) Classificação Internacional de Patentes :
C07D 277/08 (2006.01)
- (21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR20 12/000421
- (22) Data do Depósito Internacional :
24 de Outubro de 2012 (24.10.2012)
- (25) Língua de Depósito Internacional :
Português
- (26) Língua de Publicação :
Português
- (30) Dados Relativos à Prioridade :
PI1 106333-5
10 de Outubro de 2011 (10.10.2011) BR
- (71) Requerentes (para todos os Estados designados, exceto US) : **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE** [BR/BR]; Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP-50670-901 Recife - PE (BR). **UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC** [BR/BR]; Av. da Universidade 2853, Benfica, Fortaleza, CE, CEP:60020-181 (BR).
- (72) Inventores; e
- (71) Requerentes (para US unicamente) : **LINS GALDINO. Suely** [BR/BR]; Av. Boa Viagem, 5554 - Apto. 202, Boa Viagem - Recife - PE, CEP: 51030-000 (BR). **DA ROCHA PITTA, Ivan** [BR/BR]; Avenida Boa Viagem 5554, Apto 202, Boa Viagem, CEP: 51.030-000 Recife - PE (BR). **DO CARMO ALVES DE LIMA, Maria** [BR/BR]; Rua Beta, 55, Sucupira - Jaboatão Dos Guararapes -, Pernambuco, CEP: 54280-550 (BR). **GALDINO DA ROCHA PITTA, Marina**; Av. Boa Viagem, 5554 - Apto. 202, Boa Viagem - Recife - PE, CEP: 51030-000 (BR). **ARAUJO BARROS, Francisco Washington** [BR/BR]; Rua Gustavo Sampaio, 372, Parque Araxá - Fortaleza - Ceará, CEP: 60450-635 (BR). **DO Ó PESSOA, Claudia** [BR/BR]; Rua Eduardo Garcia, 888 -

APTO. 901, Aldeota - Fortaleza - Ceará, CEP: 60150-100 (BR). **DE MORAES FILHO, Manoel Odorico** [BR/BR]; Rua República Do Líbano, 881/500, Meireles - Fortaleza - Ceará, CEP: 60160-140 (BR). **DA ROCHA PITTA, Maira Galdino** [BR/BR]; Av. Boa Viagem, 5554 - Apto. 202, Boa Viagem - Recife - Pe, CEP: 51030-000 (BR).

- (81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- sem relatório de pesquisa internacional; será republicado após receção do mesmo (Regra 48.2(g))
- a data de depósito do pedido internacional cai dentro do prazo de dois meses a contar da data de expiração do período de prioridade (Regra 26bis.3)

(54) Title : THIAZACRIDINES USED IN ANTI-CANCER THERAPY

(54) Título : THIAZACRIDINAS UTILIZADAS NA TERAPIA ANTICÂNCER

(57) Abstract : The present invention relates to 3-acridinyl-methyl-thiazolidine-2,4-dione-derived compounds, also denominated thiazacridines, and to the related processes for chemically synthesizing same, and also to the therapeutic use thereof for treating cancer.

(57) Resumo : A presente invenção é relativa a compostos derivados da 3-acridinilmetil-tiazolidina- 2,4-diona, também denominados tiazacridinas, bem como aos respectivos processos para sua síntese química, bem como seu uso terapêutico no tratamento do câncer.



WO 2013/053034 A2

TIAZACRIDINAS UTILIZADAS NA TERAPIA ANTICÂNCER

OBJETO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à síntese de derivados tiazolidínicos N-acridínicos específicos e seus respectivos usos como fármacos utilizados na terapêutica do câncer.

ESTADO DA TÉCNICA

Os derivados acridínicos são conhecidos por apresentarem um amplo espectro de atividades biológicas, como atividades antimicrobiana, antimalárica, antitripanossômica (BONSE et al., 1999, J. Med. Chem., v.42, n.26, p.5448-54), leishmanicida (GIRAULT et al., 2000, J. Med. Chem., v.43, n.14, p.2646-54) e, sobretudo, por suas propriedades antineoplásicas. O interesse medicinal das acridinas data de 1888, mas apenas em 1913 estes compostos começaram a ser usados na prática médica quando Browning descobriu a ação bactericida da proflavina c e da acriflavina b. A atividade anticâncer foi considerada pela primeira vez em 1920. A partir de então, vários compostos, alcalóides naturais ou moléculas sintéticas, foram testados como agentes antitumorais (DEMEUNYNCK et al., 2001, Curr. Pharm. Des., v.7, p.1703-24). As propriedades citotóxicas dos compostos acridínicos dependem de sua habilidade de se intercalar entre os pares de base do DNA e, também, de inibir a síntese de ácidos nucleicos pelo bloqueio da ação das enzimas topoisomerase I e topoisomerase II (SURDON et al., 2001, Molecules, v.6, p.673-82). Logo, estes compostos exercem seus efeitos clínicos primários pela capacidade de interferir na função do DNA, seja inibindo a replicação ou transcrição do DNA. Pesquisadores do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos - LPSF realizaram a síntese de derivados tiazacridínicos e imidazacridínicos que mostraram ser bastante eficazes no tratamento do câncer. A rota sintética utilizada pelos mesmos autores para a obtenção dos derivados tiazacridínicos iniciou-se com a oxidação da 9-metil-acridina, preparada a partir da difenilamina, em acridina-9-carboxaldeído, seguindo-se uma reação de condensação tipo Knoevenagel em meio alcalino com o cianoacetato de etila para obtenção do éster 2-ciano-acridina-9-il-acrilato de etila. A síntese da parte tiazolidínica da molécula foi realizada por meio da benzilação da tiazolidina-2,4-diona com os halogenetos de benzila em meio alcalino. Na última etapa, os derivados tiazacridínicos foram obtidos através de uma reação de adição com o éster 2-ciano-acridina-9-il-acrilato de etila na presença de piperidina (PITTA et al, 2002, PI 0203747-5, 2003, PCT/BR03/00128; PITTA et al., 2006, PI-0601827-0, PCT/WO 2007/109871 A2).

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

As substâncias obtidas conforme esta invenção compõem um grupo de derivados tiazolidínicos N-acridínicos. O derivado 2-ciano-acridina-9-il-acrilato de etila (Figura 1) foi utilizado na condensação com o 3-acridin-9-ilmetil-tiazolidina-2,4-diona LPSF AA-1A (Figura 2) para obtenção do composto bis-acridínico 3-acridin-9-ilmetil-5-acridin-9-ilmetileno-tiazolidina-2,4-diona LPSF AA-2 (Figura 3). Os derivados de fórmula geral 3-acridin-9-ilmetil-5-benzilideno-tiazolidina-2,4-diona (Figura 4) foram obtidos a partir da

reação tipo Michael dos derivados 2-ciano-3-fenil-acrilatos de etila com o derivado 3-acridin-9-ilmetil-tiazolidina-2,4-diona LPSF AA-1A (Figura 2). Os ésteres 2-ciano-3-fenil-acrilatos de etila substituídos no anel aromático por metoxi, metil, cloro, bromo ou metanosulfonil foram preparados através da condensação de Knoevenagel a partir dos benzaldeídos correspondentes com o cianoacetato de etila.

A. Síntese dos Compostos

Procedimento geral de preparação dos Ésteres 2-ciano-3-fenil-acrilatos de etila substituídos

Em um balão de fundo redondo, com agitação magnética, adaptado a um condensador, foram adicionados quantidades equimolares do aldeído aromático substituído e do cianoacetato de etila na presença de piperidina como catalisador e benzeno como solvente. A mistura reacional foi aquecida sob refluxo a 110°C por 4 horas. Passado este tempo, o produto foi seco, suspenso em água, filtrado e purificado com álcool etílico.

Procedimento de preparação do éster 2-ciano-acridina-9-il-acrilato de etila (Figura 1)

Em um balão de fundo redondo, com agitação magnética, adaptado a um condensador, foram adicionadas quantidades equimolares da 9-acridina-carboxaldeído e do cianoacetato de etila na presença de piperidina como catalisador. A mistura reacional foi aquecida sob refluxo a 110°C por 8 horas. O produto foi purificado por cromatografia sob pressão em sílica gel 60, rc-hexano/acetato 6:4.

Procedimento de preparação da 3-acridin-9-ilmetil-tiazolidina-2,4-diona codificado LPSF AA-1A (Figura 2)

Em um balão de fundo redondo, com agitação magnética, adaptado a um condensador, foram adicionados a tiazolidina-2,4-diona e hidróxido de sódio previamente dissolvido em álcool etílico. A mistura reacional foi agitada durante 10 minutos. Passado este tempo, foi adicionado a 9-bromometilacridina em quantidades equimolares e a mistura foi aquecida a uma temperatura de 60°C durante 7 horas. O produto foi lavado com água destilada e, depois, purificado com álcool etílico.

Procedimento de preparação da 3-acridin-9-ilmetil-5-acridin-9-ilmetileno-tiazolidina-2,4-diona LPSF AA-2 (Figura 3)

Obtêm-se o derivado *bis*-acridínico através do aquecimento da 3-(acridin-9-il-metil)-tiazolidina-2,4-diona, dissolvida em etanol anidro na presença de piperidina, com o 2-ciano-acridin-9-il-acrilato de etila a uma temperatura de 80°C por 4 horas.

Procedimento geral de preparação das tiazacridinas substituídas (Figura 4)

Em um balão de fundo redondo, com agitação magnética, adaptado a um condensador, foram adicionados quantidades equimolares da 3-acridin-9-ilmetil-tiazolidina-2,4-diona e dos derivados 2-ciano-3-fenil-acrilatos de etila substituídos dissolvidos em álcool etílico, na presença de piperidina como catalisador. A mistura reacional foi aquecida sob refluxo a 50°C

por 4 horas levando à formação dos novos derivados tiazacrinícos, que foram purificados através de lavagens sucessivas com água destilada e álcool etílico. Foram sintetizados os compostos de formula geral 3-acridin-9-ilmetil-5-benzilideno-tiazolidina-2,4-diona (Figura 4):

- 5 3-Acridin-9-ilmetil-5-(4-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-3)
3-Acridin-9-ilmetil-5-(4-metil-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-4)
3-Acridin-9-ilmetil-5-(4-cloro-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-5)
3-Acridin-9-ilmetil-5-(4-bromo-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-6)
3-Acridin-9-ilmetil-5-(4-metanosulfonil-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-8)
10 3-Acridin-9-ilmetil-5-(3-bromo-4-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-9)

B. Avaliação da Atividade Anticâncer

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT

Células: As linhagens utilizadas, HL60 (leucemia), MDA-MB 435(mama - humano), HCT-8 (cólon - humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (USA), tendo sido
15 cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As células foram plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ céls./100 µL, para células suspensas e $0,1 \times 10^6$ céls./100µL, para células aderidas. Os diversos compostos foram acrescidos em diferentes concentrações, que variaram entre 0,39 - 25ug/mL para substâncias puras. Foram
20 incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 200µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO em espectro fotômetro de placa a 550nm.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. O cálculo das IC₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos desvios foram realizados a partir da regressão não-linear no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi analisada a partir de 2 dois experimentos realizados em triplicata.
25

Os compostos foram diluídos na concentração de 5mg/mL. Foram testados em concentração única 100 µg/mL nas seguintes linhagens SF295 (SNC); HCT-8 (cólon) e MDA-MB-435 (mama). Os compostos foram selecionados de acordo com percentual de inibição do crescimento tumoral maior que 80% nas linhagens celulares utilizadas (GI% > 80%). Estes compostos foram testados para a determinação do IC₅₀.
30

Resultados

Os derivados tiazacridínicos foram testados nas seguintes linhagens: SF-295, HCT-8 e MDA-MB435. Os resultados da atividade citotóxica estão apresentados na tabela 1, que se refere a
35

inibição da proliferação (%) realizado em duplicata pelo método do MTT para as células SF-295 (SNC), HCT-8 (carcinoma de cólon) e MDA-MB435 (melanoma); doxorrubicina foi usada como controle positivo, na tabela 1 temos que os valores de 0 - 35% foram considerados (SA) - Sem Atividade; 36 - 55% (PA) - Pouca Atividade; 56 - 85% (MO) - Moderada Atividade; 86 - 100% (MA) - Muita Atividade.

Tabela 1

Substância – Código	Linhagens Celulares		
	SF-295	HCT-8	MDA-MB435
AA-1A	32,8 (SA)	42,0 (PA)	0,00 (AS) ₁₀
AA-2	76,7 (MO)	92,4 (MA)	95,9 (MA)
AA-3	59,5 (MO)	86,7 (MA)	84,2 (MO)
AA-4	29,9 (SA)	51,3 (PA)	31,2 (AS)
AA-5	31,3 (PA)	37,8 (PA)	0,00 (AS)
AA-6	62,2 (PA)	96,6 (MA)	85,3 (MO) ₁₅
AA-8	44,3 (PA)	64,3 (MO)	12,9 (AS)
AA-9	48,0 (PA)	72,5 (MO)	53,0 (PA)
Doxorrubicina	91,1 (MA)	95,2 (MA)	93,6 (MA)

20 O derivado LPSF-AA2 foi a molécula mais ativa desta série. Todos os compostos mostram um potencial citotóxico seletivo para a linhagem de células HCT-8, tendo o composto AA6 apresentado o maior potencial citotóxico para esta linhagem. O composto LPSF-AA6, com um átomo de bromo para substituído no anel benzilidênico, também foi bastante eficaz. Ele foi o mais ativo para a linhagem de células HCT-8 e o segundo mais ativo para as linhagens

25 SF-295 e MDA-MB435. O derivado LPSF-AA8, com o substituinte metanosulfonil na posição para, teve moderada atividade para a linhagem HCT-8 (64,3% de inibição), foi pouco ativo para SF-295 (44,3%) e não teve atividade para MDA-MB435 (12,9%). O derivado substituído na posição para pelo radical metil foi pouco ativo para a linhagem HCT-8 (51,3% de inibição) e não teve atividade para SF-29 (29,9%) e MDA-MB435 (31,2%). O LPSF-AA5

30 foi o menos ativo de todos os compostos sintetizados contra a linhagem de células HCT-8 e MDA-MB435.

Os compostos LPSF-AA2, LPSF-AA3 e LPSF-AA6 foram selecionados para a determinação do IC₅₀ (Tabela 2), pois apresentaram percentual de inibição do crescimento tumoral maior que 80% nas linhagens celulares utilizadas. Valores de IC₅₀ (concentração inibitória de 50%)

e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) realizado pelo método do MTT para as células HL-60 (leucemia promielocítica), CEM (leucemia linfocítica), MDA-MB435 (melanoma), HCT-8 (carcinoma de cólon) e SF-295 (SNC) obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prism

5 Tabela 2 -

Código	Linhagens Celulares				
	HL-60 IC ₅₀ (µg/mL)	CEM IC ₅₀ (µg/mL)	MDA-MB435 IC ₅₀ (µg/mL)	HCT-8 IC ₅₀ (µg/mL)	SF-295 IC ₅₀ (µg/mL)
AA-2	>25	>25	4,44 3,37-5,85	4,45 3,57-5,55	7,01 5,50-8,92
AA-3	>25	>25	>25	19,26 15,11-24,53	>25 10
AA-6	19,49 14,21- 26,73	>25	>25	20,63 18,24-23,34	>25
Doxorrubicina	0,02 0,01-0,02	0,02 0,02-0,03	0,48 0,34 - 0,66	0,01 0,01-0,02	0,24 0,17 - 0,36

- 15 Dos 3 compostos mais potentes, o LPSF-AA2 apresentou os melhores valores de IC₅₀: 4,4 µg/mL para MDA-MB435, 4,45 µg/mL para HCT-8, 7,01 µg/mL para SF-295 e valores maiores que 25 µg/mL para HL-60 e CEM, mas ainda assim estes valores estão muito altos quando comparados a doxorrubicina.

RELAÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 - Representação do éster 2-ciano-acridina-9-il-acrilato de etila.

- 20 Figura 2 - Representação da molécula acridínica intermediária: 3-acridin-9-ilmetil-tiazolidina-2,4-diona - LPSF AA-1 A.

Figura 3 - Representação do derivado ôzs-acridínico 3-acridm-9-ilmetil-5-acridin-9-ilmetileno-tiazolidina-2,4-diona - LPSF AA-2.

Figura 4 - apresenta a estrutura geral de sete dos nove derivados sintetizados.

25 RELAÇÃO DAS TABELAS

Tabela 1. Valores referentes à determinação da atividade citotóxica

Tabela 2. Valores referentes à determinação de IC₅₀ para os compostos LPSF-AA2, LPSF-AA3 e LPSF-AA6

REIVINDICAÇÕES

1. TIAZACRIDINAS COM ATIVIDADE ANTICÂNCER, caracterizadas pelo composto de fórmula 3-acridin-9-ilmetil-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-1 A).
- 5 2. TIAZACRIDINAS COM ATIVIDADE ANTICÂNCER, caracterizadas pelo composto de fórmula 3-acridin-9-ilmetil-5-acridin-9-ilmetileno-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-2).
3. TIAZACRIDINAS COM ATIVIDADE ANTICÂNCER, caracterizadas pelo composto de fórmula 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
10 (LPSF AA-3).
4. TIAZACRIDINAS COM ATIVIDADE ANTICÂNCER, caracterizadas pelo composto de fórmula 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-metil-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-4).
5. TIAZACRIDINAS COM ATIVIDADE ANTICÂNCER, caracterizadas pelo
15 composto de fórmula 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-cloro-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-5).
6. TIAZACRIDINAS COM ATIVIDADE ANTICÂNCER, caracterizadas pelo composto de fórmula 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-bromo-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-6).
- 20 7. TIAZACRIDINAS COM ATIVIDADE ANTICÂNCER, caracterizadas pelo composto de fórmula 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-metanosulfonil-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-8).
9. TIAZACRIDINAS COM ATIVIDADE ANTICÂNCER, caracterizadas pelo composto de fórmula 3-acridin-9-ilmetil-5-(3-bromo-4-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-
25 2,4-diona (LPSF AA-9).
10. TIAZACRIDINAS COM ATIVIDADE ANTICÂNCER, como descritas nas reivindicações 1,2,3,4,5,6,7,8 ou 9 caracterizadas por sua atividade anticâncer e por serem administradas sistemicamente para a terapia anticâncer.
11. USO DE TIAZACRIDINAS COM ATIVIDADE ANTICÂNCER representada
30 pelos compostos conforme reivindicações 1 ou 2 ou 3 ou 4 ou 5 ou 6 ou 7 ou 8 ou 9 para preparação de um medicamento para o tratamento do câncer.

Figura 1

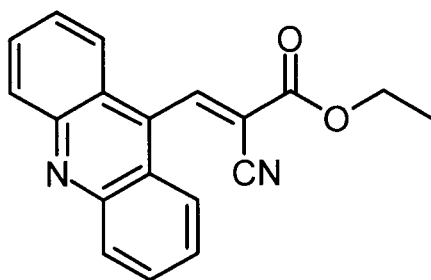


Figura 2

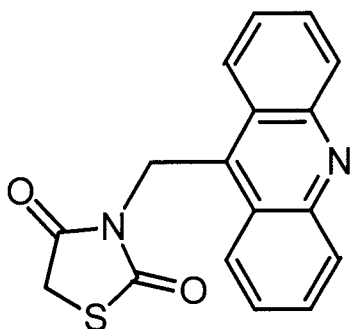


Figura 3

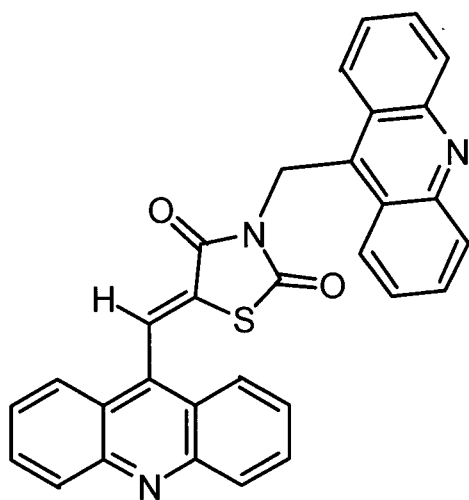


Figura 4

