

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1996.07.26	(73) Titular(es): PETER MACCALLUM CANCER INSTITUTE SMORGON FAMILY BUILDING ST ANDREWS PLACE EAST MELBOURNE VIC 3002 AU
(30) Prioridade(s): 1995.07.28 AU PN449295	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.04.08	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.02.18 111/2015	(72) Inventor(es): ROGER FRANCIS MARTIN AU DAVID PATTERSON KELLY AU JONATHON MICHAEL WHITE AU
	(74) Mandatário: NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA PT

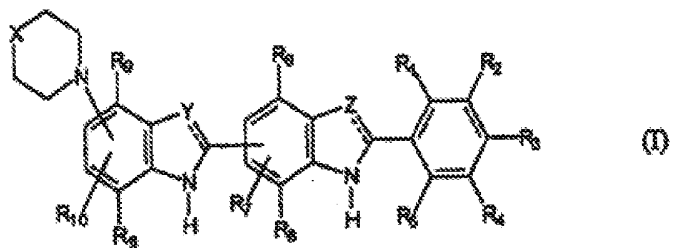
(54) Epígrafe: **RADIOPROTETORES**

(57) Resumo:

COMPOSTOS DE FÓRMULA (I) E SUA UTILIZAÇÃO COMO RADIOPROTETORES.

RESUMO
"RADIOPROTETORES"

Compostos de fórmula (I)



e sua utilização como radioprotetores.

DESCRIÇÃO
"RADIOPROTETORES"

A invenção refere-se a radioprotetores, processos para a sua preparação e sua utilização em terapia, em particular em radioterapia do cancro, onde podem ser usados para proteger materiais biológicos dos danos causados pela radiação.

É geralmente aceite que o DNA é o alvo crucial dos efeitos citotóxicos da radiação ionizante. Existe evidência considerável que apoia a ideia de que quebras no DNA de cadeia dupla ou de que quebras na cadeia dupla de DNA são particularmente importantes. Os danos no DNA resultam tanto da ionização direta da molécula de DNA (efeito direto) como de efeitos indiretos mediados pelos produtos de radiólise da água. Pensa-se que os radicais centrados no carbono na unidade desoxirribose do DNA são os precursores das quebras nas cadeias.

O tratamento de tumores com radiação ionizante (doravante referido como "radioterapia do cancro") é extensivamente usado na terapia do cancro. O objetivo de um tal tratamento é a destruição das células tumorais e a inibição do crescimento das células tumorais, presumivelmente através de danos no DNA, minimizando ao mesmo tempo os danos em células e tecidos não tumorais. Os danos em células não tumorais limitam frequentemente a eficácia da radioterapia de certos tumores, tal como exemplificado por tumores no cérebro e tumores na cavidade abdominal.

A radioterapia do cancro é uma atividade de saúde pública muito significativa. Dada a incidência de cancro na

população e a avaliação internacional de que mais de 50% dos pacientes com cancro beneficiam da inclusão da radioterapia no seu tratamento, mais de 10% da população é suscetível de vir a experimentar a radioterapia do cancro durante a sua vida.

A consideração dominante ao se prescrever doses de radiação para a radioterapia do cancro é avaliar a tolerância dos tecidos/órgãos normais mais radiosensíveis no campo de tratamento. Esta avaliação, conjuntamente com a dose de radiação esperada necessária para erradicar um tumor, determina se a estratégia de tratamento se destina à cura ou a palição. Em muitos casos, as doses toleráveis máximas são insuficientes para erradicar o tumor. Este dilema está incorporado no conceito de razão terapêutica, que representa a razão de probabilidade de controlo do tumor em relação à morbilidade dos tecidos normais. Aproximações para melhorar a razão terapêutica incluem:

- (a) a otimização do direcionamento físico da radiação para o tumor;
- (b) o fracionamento da dose de radiação; e
- (c) o uso de radiomodificadores.

A melhoria da administração física da radiação teve um impacto considerável na prática da radioterapia. Por exemplo, o aumento da energia de fotões de Raios-x desde as várias centenas de quilovolts até aos feixes de megavoltagem de hoje em dia permite que a zona da dose de radiação máxima seja fixada a uma profundidade de vários centímetros, enquanto que com nas máquinas mais antigas a dose máxima era fixada perto da superfície da pele. Existe uma série de aproximações mais sofisticadas para "adaptar" os feixes de tratamento em várias fases de desenvolvimento

e implementação. A braquiterapia, o uso de fontes radioativas implantadas em vez de feixes externos, é uma outra aproximação para melhorar a distribuição física das doses.

Quase sem exceção, a radioterapia curativa com feixes externos envolve o fracionamento da dose de radiação. Um exemplo de um calendário convencional seria um total de 50 Grays administrados em vinte e cinco frações de 2 Grays. Uma vez que as células têm a capacidade de reparar os danos causados pela radiação entre as frações, o tratamento fracionado resulta em muito menor morte celular do que uma única dose de 50 Grays. No entanto, as células normais têm em geral uma capacidade de reparação mais elevada do que as células tumorais, donde que o efeito "poupador" do fracionamento é mais marcado para os tecidos normais. Em resumo, o fracionamento melhora a razão terapêutica.

A exploração de radiomodificadores tais como radioprotetores e radiossensibilizadores tem-se focado em sensibilizadores de células hipóxicas tais como o metranidazol e o misonidazol. Os radioprotetores receberam muito menos atenção do que os radiossensibilizadores a nível clínico. A era nuclear gerou um esforço considerável no desenvolvimento de radioprotetores com mais de 4000 compostos sintetizados e testados no Walter Reed Army Institute of Research nos Estados Unidos da América na década de 60. Com a exceção de um composto conhecido como WR2727, nenhum dos compostos provou ser útil nos contextos militar ou industrial (isto é, na proteção contra a irradiação total do corpo) ou para radioterapia do cancro.

É importante notar-se a interação entre estas três aproximações para melhorar a razão terapêutica. Uma combinação da melhoria do direcionamento físico, fracionamento e radiomodificadores poderia transformar o objetivo em algumas situações de radioterapia de paliativo para curativo. Para calendários curativos, a aplicação bem-sucedida de radiomodificadores atenuaria a exigência de fracionamento e reduziria assim os custos globais do tratamento, os quais, em grande parte, são proporcionais ao número de frações de tratamento por paciente.

Um papel particularmente importante para os radioprotetores emergiu do recente reconhecimento de que o repovoamento acelerado de células tumorais durante a radioterapia pode comprometer seriamente a eficácia do tratamento. As principais consequências disto têm sido as seguintes:

- (i) O desenvolvimento de calendários de tratamento acelerados para reduzir o tempo global do tratamento de radioterapia. Nesses calendários acelerados, as reações agudas são um problema particular; por exemplo, a mucosite oral aguda em pacientes com cancro da cabeça e do pescoço indica a clara necessidade de radioprotetores.
- (ii) O reconhecimento de que a interrupção do tratamento de radioterapia devido a reações de tecidos normais reduzirá a probabilidade de controlo do tumor. O uso de radioprotetores para prevenir a interrupção do tratamento induzida por toxicidade seria claramente benéfico.

As propriedades radioprotetores do ligando que se liga à ranhura menor do DNA, Hoechst 33342, foram descritas pela primeira vez por Smith, P. J. e Anderson, C. O.¹, que

usaram ensaios de sobrevivência clonogénicos de células cultivadas irradiadas. Young, S. D. e Hill, R. P.² relataram efeitos similares em células de cultura, mas estenderam os seus estudos a experiências *in vivo*. Eles concluíram que a falta de radioprotecção nas suas experiências *in vivo* era devida a níveis insuficientes de Hoechst 33342 administrado às células-alvo a seguir a injeção intravenosa. As descobertas de Hill e Young sublinham um requisito importante para radioprotetores eficazes, nomeadamente a potência. Se o radioprotetor for mais potente, então é mais provável que se alcancem as concentrações necessárias num cenário *in vivo*.

Há um outro aspeto a ter em consideração para além da potência. A concentração requerida para radioprotecção tem de ser não tóxica independentemente da potência do radioprotetor. Se o radioprotetor for administrado sistemicamente, então esta exigência de falta de toxicidade inclui não apenas as células e tecidos a serem protegidos da radiação, mas estende-se à toxicidade do sujeito como um todo. No caso do Hoechst 33342, a sua toxicidade limita a extensão na qual ele é útil como radioprotetor.

Existe também um problema conceitual substancial no uso de radioprotetores na radioterapia do cancro. Na tentativa de diminuir o efeito da radiação em tecidos normais por aplicação de radioprotetores, há o medo de que algum do radioprotetor atinja o tumor, comprometendo assim a morte das células tumorais. Os radioprotetores existentes, p. ex. o WR2727, são moléculas difundíveis relativamente pequenas que não se ligam avidamente a componentes dos tecidos e podem, por conseguinte, penetrar eficazmente através de

camadas de células, de modo que podem atingir o tumor através da circulação.

Há necessidade de radioprotetores que tenham uma penetração limitada através das camadas de células. Uma tal propriedade permite que os radioprotetores sejam aplicados localmente ou topicamente a tecidos normais radiosensíveis críticos na vizinhança do tumor. A penetração limitada restringe a extensão em que o radioprotetor atinge o leito capilar e entra em circulação, alcançando assim o tumor por administração sistêmica em concentrações suficientes para conferir uma radioproteção significativa ao tumor.

A difusão limitada de ligandos que se ligam ao DNA, tais como o Hoechst 33342, através de camadas de células é conhecida e foi explorada no mapeamento da localização de células em esferoides multicelulares e *in vivo*. Para além de restringir o acesso ao tumor por absorção sistêmica a seguir à aplicação local ou tópica a tecidos normais, existe uma outra vantagem potencial da penetração limitada no contexto da radioterapia do cancro. Esta vantagem decorre da ideia de que a vasculatura, em particular as células endoteliais, é o alvo crítico que determina os efeitos prejudiciais da radiação. Para além disso, as células mais radorresistentes no tumor são aquelas células viáveis que se encontram mais distantes dos capilares. A radorresistência destas células é devida ao seu estado hipóxico, que por sua vez reflete o seu afastamento dos capilares.

Consequentemente, os radioprotetores com difusão limitada, quando administrados intravenosamente, serão entregues de forma mais eficaz a células radiosensíveis críticas em

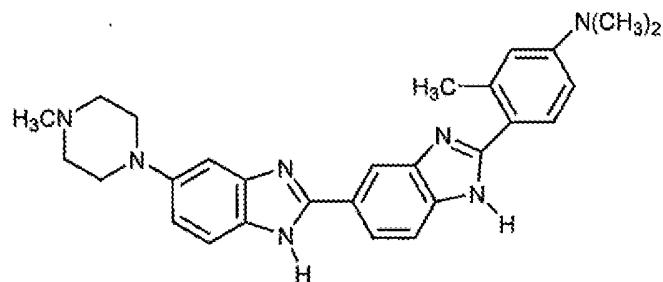
tecidos animais, do que à subpopulação de células em tumores (isto é, células hipóxicas), o que limita em geral a eficácia da radioterapia. Deste modo, o uso de tais radioprotetores permite que se usem doses de radiação superiores, com um aumento da probabilidade de matar as células hipóxicas no tumor.

No entanto, o potencial da combinação destas características radiobiológicas e das características de radioprotetores que se ligam ao DNA pode apenas ser útil na radioterapia do cancro desde que exista uma exigência imperativa e necessária dos radioprotetores, nomeadamente desde que os radioprotetores sejam suficientemente potentes para conferir radioprotecção demonstrável a concentrações não tóxicas, quando aplicados tópicamente ou sistemicamente. Uma outra exigência prática é que a extensão da penetração limitada seja suficiente para prevenir uma absorção sistémica significativa a seguir à aplicação tópica, mas não tão pronunciada que previna concentrações suficientes de atingirem as células que determinam a radiosensibilidade do tecido a ser protegido dos efeitos da radiação ionizante, por aplicação tópica ou local.

Existe conseqüentemente uma necessidade de radioprotetores que tenham uma citotoxicidade reduzida, potência radioprotetora aumentada e uma penetração limitada através das camadas de células, que possam ser usados em radioterapia do cancro, em particular topicamente para proteger tecidos tais como a pele, mucosa oral, mucosa esofágica, mucosa retal, mucosa vaginal e epitélio da bexiga, e parenteralmente para proteger órgãos tais como os pulmões e o cérebro.

A presente invenção fornece:

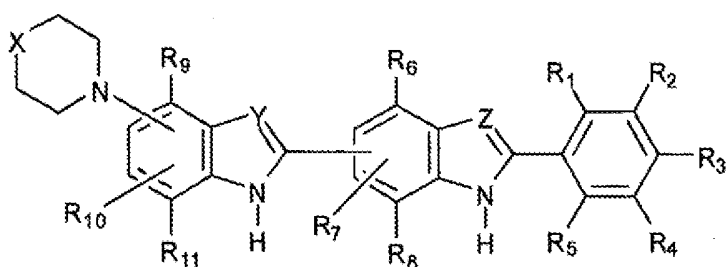
[1] O composto *orto*-metil-*para*-(*N,N*-dimetilamino)-Hoechst, com a fórmula:



[2] Um composto de acordo com [1] para uso em radioterapia do cancro, para minimizar os danos em células e tecidos não tumorais, em que o local do tumor é submetido a uma fonte de radiação ionizante.

[3] Um composto de acordo com [1] para uso na proteção de um sujeito humano ou animal de danos por radiação resultantes da exposição a radiação ionizante.

[4] Um composto de fórmula (Ia):



(Ia)

em que:

X é NCH_3 ;

Y e Z são selecionados entre N ou CH;

R_3 é $\text{N}(\text{R})_2$ ou NHR , em que R é um alquilo C_1 a C_{30} ;

R_1 é um alquilo C_1 a C_{30} , um alcenilo C_2 a C_{30} ou $-\text{OR}$, em que R é um alquilo C_1 a C_{30} ;

R_5 , R_7 e R_{10} são selecionados entre hidrogénio, um alquilo C_1 a C_{30} , um alcenilo C_2 a C_{30} e $-\text{OR}$, em que R é um alquilo C_1 a C_{30} ; e

R_2 , R_4 , R_6 , R_8 , R_9 e R_{11} são hidrogénio;

ou um sal e/ou tautómero do mesmo.

[5] Um composto de acordo com [4] para uso em terapia do cancro, para minimizar os danos em células e tecidos não tumorais, em que o local de um tumor é submetido a uma fonte de radiação ionizante.

[6] Um composto de acordo com [4] para uso na proteção de um sujeito humano ou animal de danos por radiação resultantes da exposição a radiação ionizante.

Ao longo desta especificação, salvo se o contexto exigir o contrário, a palavra "compreendem", ou variações tais como "compreende" ou "compreendendo", será entendida como implicando a inclusão de um número inteiro indicado ou um grupo de números inteiros, mas não a exclusão de qualquer outro número inteiro ou grupo de números inteiros.

O termo "grupo eletrodoador" é utilizado no presente documento no seu sentido mais amplo e inclui um alquilo opcionalmente substituído, alcenilo opcionalmente substituído, NHR ou NR_2 , e OR , em que R é hidrogénio ou um alquilo opcionalmente substituído. De preferência, o grupo eletrodoador é NHR ou NR_2 . Postula-se que a presença de

pelo menos um grupo eletrodoador aumente a atividade radioprotetora.

O termo "grupo de impedimento estereoquímico" é usado no presente documento no seu sentido mais amplo, de modo a incluir qualquer grupo volumoso que restrinja estereoquimicamente, por exemplo, a rotação ou a conformação dos compostos da presente invenção. Exemplos de grupos de impedimento estereoquímico incluem os descritos acima como grupos eletrodoadores, que possam estar localizados, por exemplo, em posição adjacente às ligações simples que ligam os anéis, de modo a restringirem a rotação. Outros grupos de impedimento estereoquímico incluem anéis opcionalmente substituídos que possam conter heteroátomos. Postula-se que a restrição estereoquímica aumente também a atividade radioprotetora ao aumentar a extensão de ligação à ranhura menor do DNA. Este aumento pode ser conseguido diminuindo a extensão de outras formas de ligação do ligando a ele mesmo, ao DNA (modos de ligação diferentes da ligação à ranhura menor) ou a outros componentes celulares. É possível que algumas destas outras formas de ligação possam ser favorecidas por uma conformação coplanar do sistema de anel do radioprotetor.

Sem se querer estar limitado pela teoria, acredita-se que a proteção conferida pelos compostos de acordo com a invenção é conseguida por eletrodoação (redução) por parte do radioprotetor para a radiação transitória induzida por espécies oxidantes no DNA. Uma vez que os radioprotetores podem conter grupos básicos, esperar-se-ia que a protonação destes grupos diminuísse substancialmente esta capacidade eletrodoadora. Neste contexto, um papel do grupo estereoquimicamente impedido, em alguns compostos, pode ser

o de impedir a formação da estrutura de base conjugada, em que a estabilização por ressonância pode ser alcançada por tautômeros em que os sistemas de anel são complanares.

O termo "alquilo" designa um alquilo C_1 a C_{30} de cadeia linear ou ramificada. Exemplos de alquilos de cadeia linear ou ramificada incluem o metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, amilo, isoamilo, sec-amilo, 1,2-dimetilpropilo, 1,1-dimetilpropilo, hexilo, 4-metilpentilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1,1,2-trimetilpropilo, heptilo, 5-metil-hexilo, 1-metil-hexilo, 2,2-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 4,4-dimetilpentilo, 1,2-dimetilpentilo, 1,3-dimetilpentilo, 1,4-dimetilpentilo, 1,2,3-trimetilbutilo, 1,1,2-trimetilbutilo, 1,1,3-trimetilbutilo, octilo, 6-metil-heptilo, 1-metil-heptilo, 1,1,3,3-tetrametilbutilo, nonilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- ou 7-metiloctilo, 1-, 2-, 3-, 4- ou 5-etil-heptilo, 1-, 2- ou 3-propil-hexilo, decilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- ou 8-metilnonilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5- ou 6-etiloctilo, 1-, 2-, 3- ou 4-propil-heptilo, undecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- ou 9-metildecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- ou 7-etilnonilo, 1-, 2-, 3-, 4- ou 5-propiloctilo, 1-, 2- ou 3-butil-heptilo, 1-pentil-hexilo, dodecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- ou 10-metilundecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- ou 8-etildecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5- ou 6-propilnonilo, 1-, 2-, 3- ou 4-butiloctilo, 1- ou 2-pentil-heptilo.

O termo "alcenilo" designa grupos formados por alcenos de cadeia linear ou ramificada, especificamente alcenilos C_2 -

30. Exemplos de alcenilos incluem o vinilo, alilo, 1-metilvinilo, butenilo, iso-butenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-pentenilo, 1-hexenilo, 3-hexenilo, 1-heptenilo, 3-heptenilo, 1-octenilo, 1-nonenilo, 2-nonenilo, 3-nonenilo, 1-decenilo, 3-decenilo, 1,3-butadienilo, 1,4-pentadienilo, 1,3-hexadienilo, 1,4-hexadienilo.

Os sais dos compostos da presente invenção são de preferência farmacologicamente aceitáveis, mas será apreciado que sais farmacologicamente não aceitáveis caíam também dentro do âmbito da presente invenção, uma vez que os mesmos são úteis como intermediários na preparação de sais farmacologicamente aceitáveis. Exemplos de sais farmacologicamente aceitáveis incluem sais de catiões farmacologicamente aceitáveis tais como o sódio, potássio, lítio, cálcio, magnésio, amônio e alquilamônio; sais da adição de ácido de ácidos inorgânicos farmacologicamente aceitáveis tais como os ácidos clorídrico, ortofosfórico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, carbônico, bórico, sulfâmico e bromídrico; ou sais de ácidos orgânicos farmacologicamente aceitáveis tais como os ácidos acético, propiônico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, cítrico, láctico, mícico, glucônico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanossulfônico, trihalometanossulfônico, toluenossulfônico, benzenossulfônico, salicílico, sulfanílico, aspártico, glutâmico, edético, esteárico, palmítico, láurico, pantoténico, tânico, ascórbico e valérico.

O termo "tautômero" é usado no presente documento no seu sentido mais amplo para incluir compostos de fórmula (Ia) que são capazes de existir num estado de equilíbrio entre duas formas isoméricas. Tais compostos podem diferir na

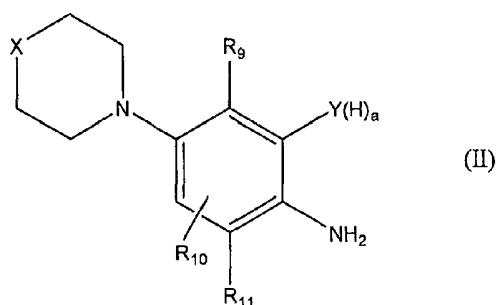
ligação que liga dois átomos ou grupos, e na posição destes grupos no composto.

Os compostos da invenção podem ser eletricamente neutros ou polieletrolitos, com aniões associados para neutralidade elétrica. Os aniões associados adequados incluem o sulfato, tartarato, citrato, cloreto, nitrato, nitrito, fosfato, perclorato, halossulfonato ou trihalometilssulfonato.

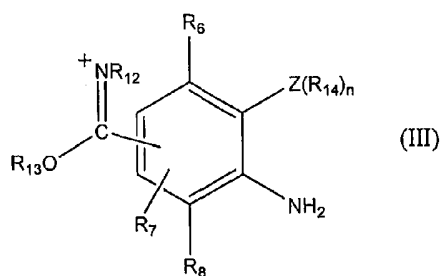
Um composto preferido é o "orto-metil-para-dimetilamino-Hoechst".

Um processo para a preparação de um composto de fórmula (Ia) em que Y e Z são N compreende:

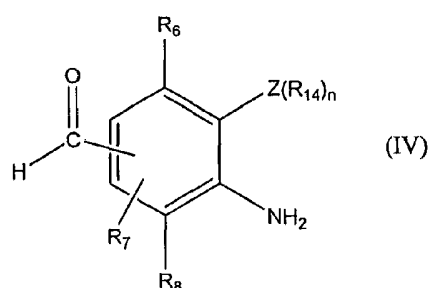
(A) (i) o acoplamento de um composto de fórmula (II):



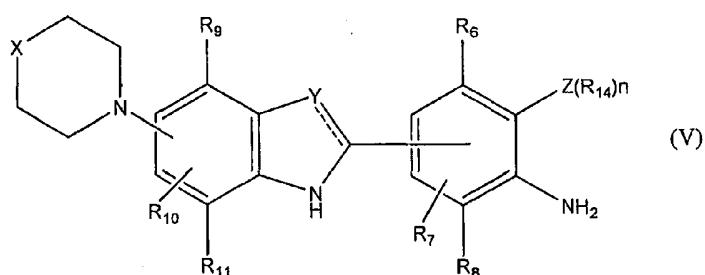
em que X, R₉, R₁₀ e R₁₁ são como definidos acima, Y é N e n é 1 ou 2, com (a) um composto de fórmula (III):



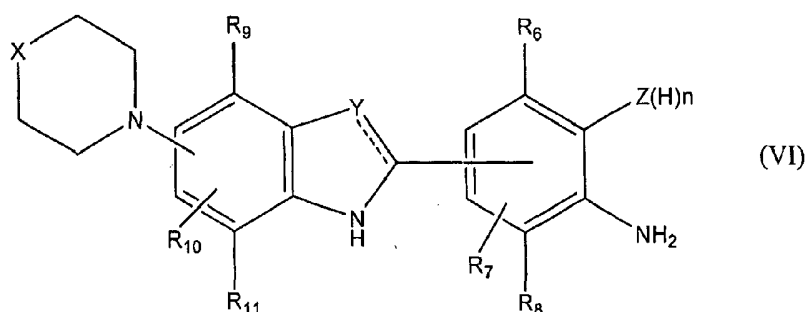
em que Z é N; R_6 , R_7 , R_8 e n são como definidos acima, R_{12} é um halogénio, R_{13} é um alquilo e R_{14} é oxigénio, ou com (b) um composto de fórmula (IV):



em que R_6 , R_7 , R_8 e n são como definidos acima e R_{14} é oxigénio, para formar um composto de fórmula (V):

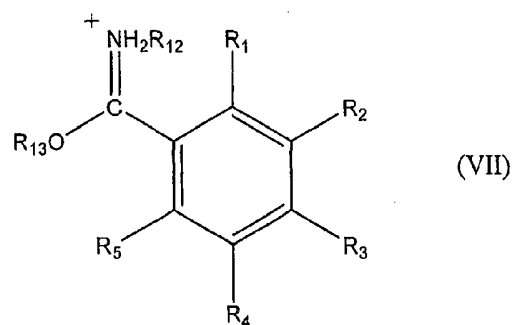


(ii) a redução do composto de fórmula (V) para formar um composto de fórmula (VI):

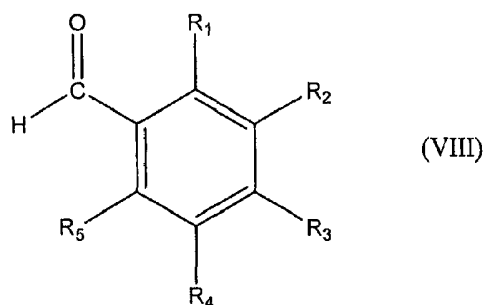


em que X, Y, Z, R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} e n são como definidos acima; e

(iii) o acoplamento do composto de fórmula (VI) com um composto de fórmula (VII):

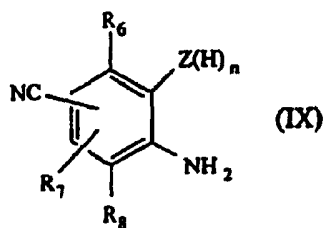


em que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_{12} e R_{13} são como definidos acima, ou um composto de fórmula (VIII):



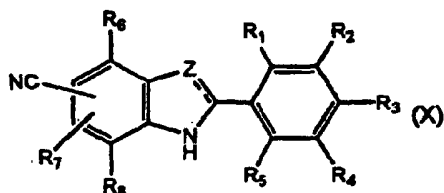
em que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_{12} e R_{13} são como definidos acima; ou

(B) (i) o acoplamento de um composto de fórmula (IX):



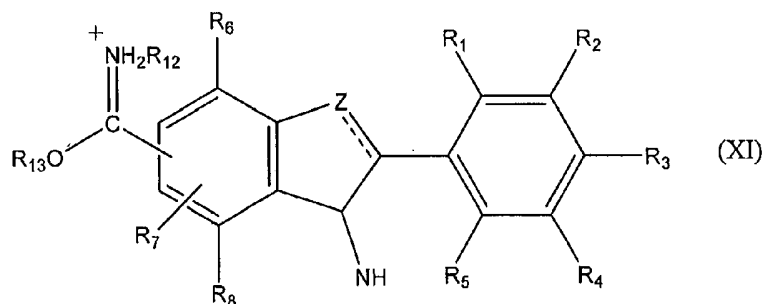
em que R_6 , R_7 , R_8 e n são como definidos acima,

com um composto de fórmula (VIII),
em que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são como definidos acima,
para formar um composto de fórmula (X):



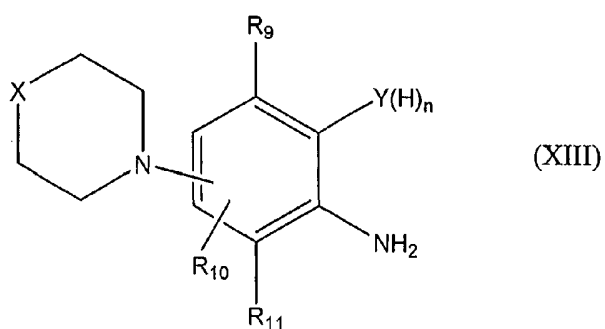
em que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 e R_8 são como definidos acima;

(ii) a conversão do composto de fórmula (X) num composto de fórmula (XI):



em que Z , R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_{12} e R_{13} são como definidos acima;

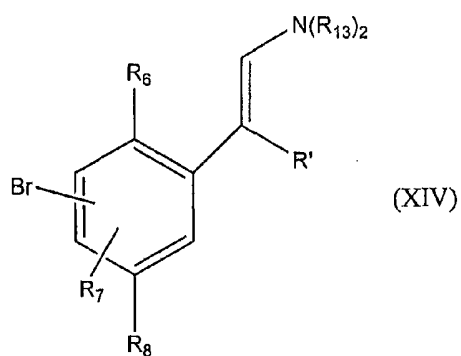
(iii) o acoplamento do composto de fórmula (XI) com um composto de fórmula (XIII)



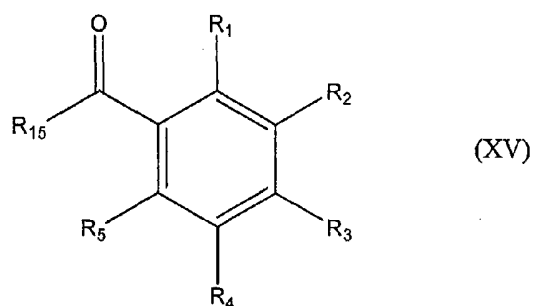
em que X, R_9 , R_{10} , R_{11} e n são como definidos acima.

Um processo para a preparação de um composto de fórmula (Ia) em que um ou ambos os substituintes Y e Z é/são $C(R')$ e em que R' é H, compreende:

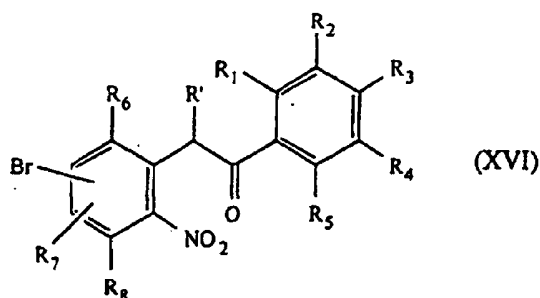
(A) (i) o acoplamento de um composto de fórmula (XIV):



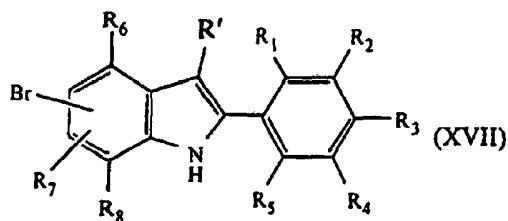
em que R' , R_6 , R_7 , R_8 e R_{13} são como definidos acima, com um composto de fórmula (XV):



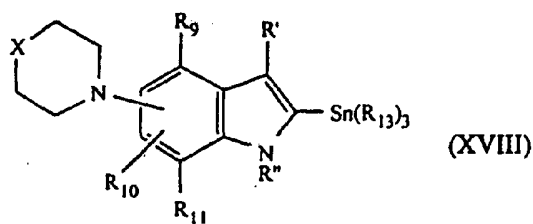
em que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são como definidos acima e R_{15} é um grupo de saída, tal como o cloro, para formar um composto de fórmula (XVI):



(ii) a ciclização do composto de fórmula (XVI) para formar um composto de fórmula (XVII):



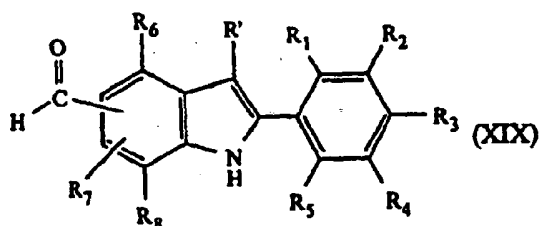
(iii) o acoplamento do composto de fórmula (XVII) com um composto de fórmula (XVIII):



em que R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{13} e R' são como definidos acima e R'' é um grupo de proteção azotado tal como um grupo 2-trimetilsililetoximetilo (SEM), na presença de um catalisador de Pd, seguido de desproteção para formar

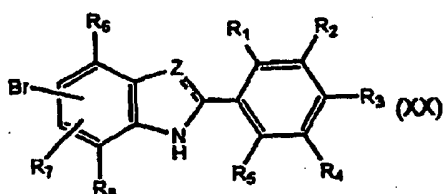
um composto de fórmula (Ia) em que Y é C(R') e Z é C(R');

ou (iv) a formilação do composto de fórmula (XVII) para formar um composto de fórmula (XIX):



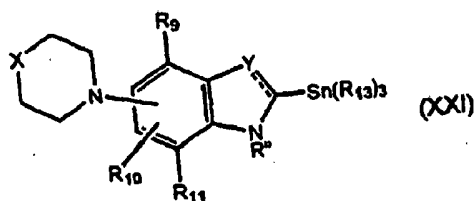
(v) o acoplamento do composto de fórmula (XIX) com um composto de fórmula (II), em que Y é N, para formar um composto de fórmula (Ia) em que Y é N e Z é C(R');

ou (B)(i) o acoplamento de um composto de fórmula (XVIII) com um composto de fórmula (XX):



na presença de um catalisador de Pd, seguido de desproteção para formar um composto de fórmula (Ia) em que Y é C(R');

ou (C)(i) o acoplamento de um composto de fórmula (XXI):



com um composto de fórmula (XVII) na presença de um catalisador de Pd para formar um composto de fórmula (Ia) em que Z é C(R').

A presente invenção refere-se a um radioprotetor que compreende o *orto*-metil-*para*-dimetilamino-Hoechst.

A presente invenção também se refere a um método de proteger um sujeito dos danos por radiação, que compreende a administração de uma quantidade eficaz de *orto*-metil-*para*-dimetilamino-Hoechst ao sujeito.

A presente invenção refere-se ainda adicionalmente a um método de radioterapia do cancro que compreende a administração a um sujeito com necessidade de uma tal terapia, de uma quantidade eficaz do composto *orto*-metil-*para*-dimetilamino-Hoechst e a submissão do local do tumor a uma fonte de radiação.

O sujeito que é protegido dos danos por radiação pode ser um ser humano ou um animal tal como um animal doméstico ou selvagem, em particular um animal de importância económica.

Tal como se usa no presente documento, uma fonte de radiação designa uma fonte de radiação ionizante. Os danos por radiação resultam da exposição a radiação ionizante. O termo "radiação ionizante", tal como usado no presente documento, refere-se a fotões com energia suficiente para

ionizar uma ligação, tais como raios α , β e γ de núcleos radioativos e Raios-X.

O termo "radioterapia do cancro" é usado no presente documento no seu sentido mais amplo, e inclui a radioterapia envolvendo tumores que podem ser tanto benignos como malignos.

O termo "Fator Modificador da Dose" (DMF), tal como usado no presente documento, refere-se à razão entre a dose de radiação necessária para produzir um dado efeito na presença de protetor e a necessária para produzir o efeito equivalente na ausência de protetor.

O presente pedido divulga também uma composição radioprotetora que compreende um composto de fórmula (Ia) tal como definido acima, em associação com um veículo farmacêutica ou veterinariamente aceitável.

Os compostos da invenção podem ser vantajosamente usados em terapia, em combinação com outros medicamentos, tais como, por exemplo, agentes quimioterápicos, por exemplo, agentes radiomiméticos, agentes que são agentes citotóxicos que danificam o DNA de tal modo que as lesões produzidas no DNA sejam semelhantes às resultantes da radiação ionizante. Exemplos de agentes radiomiméticos que causam quebras nas cadeias de DNA incluem a bleomicina, doxorubicina, adriamicina, 5FU, neocarzinostatina, agentes alquilantes e outros agentes que produzem adutos com o DNA. Antecipa-se que os radioprotetores da presente invenção protegerão o DNA de danos por parte de alguns destes agentes, do mesmo modo que o protegem contra os efeitos da radiação ionizante. Em aplicações clínicas, é improvável que o

radioprotetor seja administrado sistemicamente conjuntamente com o agente quimioterápico, uma vez que isto poderia comprometer a ação deste agente no tumor. No entanto, há circunstâncias em que a aplicação tópica a tecidos problemáticos pode ser vantajosa. Por exemplo, a mucosite oral é um efeito colateral problemático para agentes citotóxicos tais como a doxorrubicina, e a administração do presente radioprotetor como um colutório antes da administração do agente quimioterápico pode melhorar este efeito secundário sem comprometer a ação deste agente num tumor não localizado na cavidade oral. De modo semelhante, o trato gastrointestinal pode ser protegido por administração oral, os pulmões por inalação de aerossóis ou a bexiga por administração intravesical, por exemplo, através de um cateter do radioprotetor. Deste modo, um método preferido utiliza o composto de fórmula (Ia) em conjunto com um outro medicamento, tal como um agente radiomimético.

Os compostos da invenção podem ser conjugados a agentes, por exemplo, por meio do grupo interativo, que os irão libertar especificamente num sítio tumoral desejado. Agentes apropriados podem incluir anticorpos ou proteínas tais como fatores de crescimento, por exemplo um fator de crescimento hematopoiético que irá permitir que a radioproteção preferencial de células estaminais hematopoiéticas ocorra no contexto da irradiação total do corpo e de transplante da medula óssea.

Existe também uma aplicação *ex vivo* para os conjugados dos compostos da invenção no contexto do transplante da medula óssea. O transplante da medula óssea envolve geralmente a obtenção e armazenamento de amostras da medula óssea de um

sujeito antes da deterioração da sua condição. Uma forma bastante drástica de quimioterapia (isto é, uma dose elevada) é então administrada. Esta quimioterapia é tal que seria normalmente letal devido à destruição das células estaminais normais, mas o sujeito é resgatado pela administração das suas próprias células estaminais hematopoiéticas. O problema com este procedimento é que é provável que a amostra inicial de células estaminais esteja contaminada com células tumorais, e são por conseguinte utilizados vários procedimentos para purgar as preparações de medula óssea das células tumorais. Os radioprotetores conjugados com um fator de crescimento hematopoiético podem ser usados neste contexto, sendo adicionados a uma suspensão de células da medula óssea. A suspensão pode então ser irradiada com a esperança de que as células normais da medula óssea, mas não as células tumorais, sejam preferencialmente protegidas dos efeitos destruidores das células por parte da radiação.

O composto de fórmula (Ia), doravante referido como o "princípio ativo", pode ser administrado para terapia por meio de qualquer via apropriada, incluindo a oral, retal, nasal, tópica (incluindo a bucal e sublingual), vaginal, intravesical e parenteral (incluindo a subcutânea, intramuscular, intravenosa, intraesternal e intradérmica). De preferência, a administração será por via retal, tópica, vaginal ou parenteral, no entanto, será apreciado que a via preferida varie com a condição patológica e a idade do sujeito, o tecido/tumor a ser tratado, a sua localização no sujeito e a opinião do médico ou do veterinário. O composto de fórmula (Ia) pode ser administrado diretamente nos tecidos que circundam ou que estão próximos dos tumores a serem irradiados.

As composições divulgadas no presente documento compreendem pelo menos um composto de fórmula (Ia), conjuntamente com um ou mais veículos, diluentes, adjuvantes e/ou excipientes farmacologicamente aceitáveis, e, opcionalmente, outros medicamentos. Cada veículo, diluente, adjuvante e/ou excipiente deve ser farmacologicamente "aceitável" no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da composição e não prejudicial para o sujeito. As composições incluem as adequadas para administração oral, retal, nasal, tópica (incluindo a bucal e sublingual), vaginal, intravesical ou parenteral (incluindo a subcutânea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). As composições podem ser apresentadas convenientemente na forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por métodos bem conhecidos na técnica farmacêutica. Tais métodos incluem a etapa de associar o princípio ativo ao veículo que constitui um ou mais dos ingredientes acessórios. Em geral, as composições são preparadas por associação uniforme e íntima do princípio ativo com veículos líquidos, diluentes, adjuvantes e/ou excipientes, ou veículos sólidos finamente divididos, ou ambos, e depois, se necessário, dando forma ao produto.

As composições da presente invenção adequadas para administração oral podem ser apresentadas como unidades discretas tais como cápsulas, saquetas ou comprimidos, cada uma contendo uma quantidade pré-determinada do princípio ativo; como um pó ou grânulos; como uma solução ou uma suspensão num líquido aquoso ou não aquoso; ou como uma emulsão líquida óleo-em-água ou uma emulsão líquida água-em-óleo. O ingrediente ativo pode também ser apresentado como um bólus, eletuário ou pasta.

Um comprimido pode ser feito por compressão ou modelagem, opcionalmente com um ou mais ingredientes acessórios. Os comprimidos compactados podem ser preparados por compressão, numa máquina apropriada, do princípio ativo numa forma de fluxo livre tal como um pó ou grânulos, opcionalmente misturado com um agente ligante (p. ex. um diluente inerte, conservante, desintegrante (p. ex. glicolato sódico de amido, povidona reticulada, carboximetilcelulose sódica reticulada), tensioativo ou dispersante. Os comprimidos modelados podem ser feitos por modelagem, numa máquina apropriada, de uma mistura do composto em pó, humedecido com um diluente líquido inerte. Os comprimidos podem ser opcionalmente revestidos ou sulcados, e podem ser formulados de modo a fornecerem uma libertação lenta ou controlada do princípio ativo usando, por exemplo, hidroxipropilmetilcelulose em proporções variáveis para proporcionar o perfil de libertação desejado. Os comprimidos podem opcionalmente ser fornecidos com um revestimento entérico para proporcionar a libertação em partes do intestino que não no estômago.

As composições adequadas para administração tópica na boca incluem rebuçados que compreendem o ingrediente ativo numa base aromatizada, normalmente sacarose e goma de acácia ou de tragacanto; pastilhas que compreendem o princípio ativo numa base inerte tal como a gelatina e a glicerina, ou sacarose e goma de acácia; e colutórios ou *sprays* que compreendem o princípio ativo num veículo líquido apropriado.

Para aplicação tópica à pele, o ingrediente ativo pode estar na forma de um creme, pomada, geleia, solução ou suspensão.

Para aplicação tópica na vista, o princípio ativo pode estar na forma de uma solução ou suspensão num veículo aquoso ou não aquoso estéril apropriado. Podem ser também incluídos aditivos, por exemplo tampões, conservantes incluindo agentes bactericidas e fungicidas tais como acetato ou nitrato fenilmercúrico, cloreto de benzalcónio ou clorohexidina e agentes espessantes tais como a hipromelose.

As composições para administração retal podem ser apresentadas como supositórios com um excipiente apropriado não irritante que é sólido à temperatura normal, mas líquido à temperatura retal e irá, por conseguinte, fundir no reto para libertar o ingrediente ativo. Tais excipientes incluem a manteiga de cacau ou um salicilato.

As composições nasais podem ser apresentadas topicamente como gotas ou *sprays* nasais, ou sistemicamente numa forma apropriada para absorção através da mucosa nasal e/ou células alveolares nos pulmões.

As composições apropriadas para administração vaginal podem ser apresentadas como pessários, tampões, cremes, géis, pastas, formulações de espumas ou *sprays* contendo para além do princípio ativo, veículos tais como os que são conhecidos na técnica como sendo apropriados.

As composições adequadas para administração parenteral incluem soluções injetáveis estéreis isotónicas aquosas e não aquosas que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostatos e solutos que tornam a composição isotónica com o sangue do sujeito pretendido; e suspensões estéreis aquosas e não aquosas que podem incluir agentes de

suspensão e agentes espessantes. As composições podem ser apresentadas em recipientes selados de dose única ou multidoses, por exemplo, ampôlas e frascos, e podem ser armazenadas numa condição liofilizada, requerendo apenas a adição do veículo líquido estéril, por exemplo água para injeção, imediatamente antes do uso. As soluções e suspensões injetáveis extemporâneas podem ser preparadas a partir de pós estéreis, grânulos e comprimidos do tipo anteriormente descrito.

As composições de dosagem unitária preferidas são as que contêm uma dose ou unidade diária, subdose diária, tal como descrita acima, ou uma fração apropriada das mesmas, de um princípio ativo.

O composto de fórmula (Ia) pode também ser apresentado para uso na forma de composições veterinárias, que podem ser preparadas, por exemplo, por métodos que são convencionais na técnica. Exemplos de tais composições veterinárias incluem as adaptadas para:

- (a) administração oral, aplicação externa, por exemplo banhos (p. ex. soluções ou suspensões aquosas ou não aquosas); comprimidos ou bólus; pós, grânulos ou pelotas para mistura com rações; pastas para aplicação na língua;
- (b) administração parenteral, por exemplo por injeção subcutânea, intramuscular ou intravenosa, p. ex. como uma solução ou suspensão estéril; ou (quando apropriado) por injeção intramamária em que uma suspensão ou solução é introduzida no úbere através da teta;
- (c) aplicação tópica, p. ex. como um creme, pomada ou spray aplicado na pele; ou
- (d) intravaginalmente, p. ex. como um pessário, creme ou espuma.

Deve entender-se que, para além dos ingredientes particularmente mencionados acima, as composições desta invenção podem incluir outros agentes convencionais na técnica tendo em conta o tipo de composição em questão, por exemplo, os adequados para administração oral podem incluir esses outros agentes tais como agente ligantes, adoçantes, espessantes, agentes aromatizantes, agentes desintegrantes, agentes de revestimento, conservantes, lubrificantes e/ou agentes de atraso temporal.

Os adoçantes adequados incluem a sacarose, lactose, glicose, aspartame ou sacarina. Os agentes desintegrantes adequados incluem o amido de milho, metilcelulose, polivinilpirrolidona, goma xantana, bentonite, ácido algínico ou o agar. Os agentes aromatizantes adequados incluem o óleo de menta, óleo de gaultéria, aroma de cereja, laranja ou framboesa. Os agentes de revestimento adequados incluem polímeros ou copolímeros de ácido acrílico e/ou ácido metacrílico e/ou os seus ésteres, ceras, álcoois gordos, zeína, goma-laca ou glúten. Os conservantes apropriados incluem o benzoato de sódio, vitamina E, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno ou o bissulfito de sódio. Os lubrificantes adequados incluem o estearato de magnésio, ácido estérico, oleato de sódio, cloreto de sódio ou o talco. Os agentes de atraso temporal apropriados incluem o monoestearato de glicerilo ou o diestearato de glicerilo.

A aplicação primária do radioprotetor da presente invenção é na radioterapia do cancro. Muitos dos tecidos normais que são um problema em radioterapia, tais como a pele, mucosa oral, mucosa esofágica, mucosa retal, mucosa vaginal e o

epitélio da bexiga, podem ser protegidos topicamente pelos radioprotetores da presente invenção.

Existem dois ajustamentos diferentes para tais radioprotetores tópicos. Em primeiro lugar, há potencial para diminuir as reações agudas angustiantes que ocorrem frequentemente nestes tecidos. Embora estas reações agudas possam ser transitórias, a sua melhoria seria obviamente benéfica para um sujeito. Um ajustamento diferente é a situação em que as reações agudas limitam a dose de radiação que pode ser administrada ao tumor. Um exemplo é no regime de fracionamento acelerado, em que as reações agudas podem limitar a dose. Deste modo, a aplicação de radioprotetores pode possibilitar o uso de doses mais elevadas de radiação, e assim aumentar as perspectivas de cura.

Para além da aplicação tópica, as propriedades de farmacodistribuição dos radioprotetores da presente invenção oferecem outras vias potenciais de se alcançar uma melhoria da razão terapêutica. Exemplos incluem tumores no cérebro e pulmões.

No caso do cérebro, pensa-se que as células endoteliais são um alvo radiossensível importante em termos dos efeitos prejudiciais da radiação nos tecidos normais do cérebro. A administração do radioprotetor da presente invenção protegeria as importantes células endoteliais no cérebro normal. As células correspondentes no tumor seriam também protegidas, mas estas células são bem oxigenadas e são, por conseguinte, as células mais radiossensíveis no tumor. As células mais distantes no tumor, que são hipóxicas, estariam assim fora do alcance do radioprotetor. Isto

significa que as células endoteliais normais e as células óxicas (radiossensíveis) do tumor estariam protegidas igualmente. Esta radioproteção permitiria então o uso de uma dose mais elevada de radiação, o que aumentaria a hipótese de matar as células hipóxicas no tumor. O facto das células endoteliais tanto do tumor como dos tecidos normais serem afetadas igualmente não tem qualquer impacto na razão terapêutica. Ocorre um aumento na razão terapêutica por causa do aumento na morte das células tumorais hipóxicas, sem qualquer débito em termos de danos nos tecidos normais.

No caso de tumores nos pulmões, o radioprotetor da presente invenção seria administrado às células alveolares. Embora as células endoteliais do tumor pulmonar possam também ser protegidas, as células mais distantes no tumor não seriam. Para além disso, a circulação de alguns tumores pulmonares é proporcionada não pela artéria pulmonar mas pela circulação brônquica, que não será acessada antes da passagem seguinte do radioprotetor em circulação, e assim exposta a concentrações mais baixas.

O direccionamento dos radioprotetores pode também conseguir melhores razões terapêuticas em radioterapia. Um exemplo apropriado é a conjugação do radioprotetor da presente invenção com o fator de crescimento hematopoiético para se conseguir uma radioproteção preferencial das células estaminais hematopoiéticas no contexto da irradiação total do corpo e do transplante da medula óssea.

Fora do contexto da radioterapia do cancro, os radioprotetores da presente invenção poderiam ser usados profilaticamente em situações de elevado risco de radiação.

Por exemplo, o conjugado do fator de crescimento hemaopoiético descrito acima poderia ser administrado com esta finalidade.

A invenção irá agora ser descrita com referência aos Exemplos que se seguem.

Nos Exemplos, será feita referência às figuras em anexo, em que:

A Figura 1 é um gráfico que mostra o efeito da concentração do Hoechst 33258 (\diamond), Hoechst 33342 (∇) e *para*-dimetilamino-Hoechst (O) na sobrevivência das células V79, quer isoladamente quer em combinação com uma irradiação de 12 Gy;

A Figura 2 é um gráfico que mostra a sobrevivência das células V79 após tratamento com o Hoechst 33258 (\diamond), Hoechst 33342 (∇) e *para*-dimetilamino-Hoechst (O), com irradiação (12 Gy), e o efeito da concentração nuclear do radioprotetor;

A Figura 3 é um gráfico que mostra as curvas de sobrevivência após o tratamento com Hoechst 33342 (21 μ M - \square), *para*-N,N-dimetilamino-Hoechst (84 μ M - Δ), *orto*-metil-*para*-N,N-dimetilamino-Hoechst (30 μ M - \bullet) e dos controles não tratados (\circ);

A Figura 4 é um gráfico da dose de radiação em função das mortes acumuladas após irradiação bilateral de pulmões de ratinhos para o Hoechst 33342 (\square), *orto*-metil-*para*-dimetilamino-Hoechst (\blacktriangle) e controles não tratados (\blacksquare);

A Figura 5 é um gráfico da dose de radiação em função da frequência respiratória máxima para o *orto*-metil-para-dimetilamino-Hoechst (●) e controles não tratados (○); e

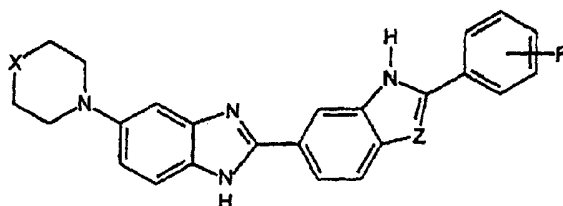
A Figura 6 é um gráfico da dose em função da densidade celular (células endoteliais de cérebros de ratinhos) para o Hoechst 33342 (○) e controles apenas com irradiação (□).

São também usadas as seguintes abreviaturas nos Exemplos:

Hoechst 33258 - 4-hidroxi-1-{5'[5'''-(4'''-metilpiperazin-1'''-il)benzimidazol-2'''-il]benzimidazol-2'-il}benzeno; e

Hoechst 33342 - 4-etoxi-1-{5'[5'''-(4'''-metilpiperazin-1'''-il)benzimidazol-2'''-il]benzimidazol-2'-il}benzeno.

Foi preparado o seguinte composto nos Exemplos:



Composto N°	Z	R	X
1	N	2-Me, 4-NMe ₂	NMe

Exemplo de Referência 1 - Preparação do 4-dimetilamino-2-metilbenzaldeído (Composto de Referência 1)

O Composto de Referência 1 foi obtido através do procedimento de Campaigne et al⁵. Adicionou-se cuidadosamente oxicloreto de fósforo (4,17 g, 27,22 mmol) a uma solução arrefecida de DMF (7,24 g, 99 mmol). Juntou-se 3-dimetilaminotolueno² (3,66 g, 27,22 mmol) em DMF gota-a-gota, e aqueceu-se a mistura a 80-90°C durante 2 horas. A solução foi arrefecida, vertida para dentro de gelo e neutralizada a pH 6-8 com acetato de sódio. O sólido foi separado por filtração, lavado com água e seco para dar origem ao Composto de Referência 1 como um sólido amarelo claro (2,58 g, 58%) p.f. 66-68°C. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,62, s, 3H; 3,06, s, 6H; 6,425, d, *J* 2,53 Hz, 1H; 6,56, dd, *J* 2,53, 8,67 Hz, 1H; 8,65, d, *J* 8,67 Hz, 1H; 9,97, s, 1H.

Exemplo 1 - Preparação do orto-metil-para-dimetilamino-Hoechst (Composto 1)

Acoplou-se uma diamina aromática com um substituinte N-metilpiperazina, com um iminoéter para dar origem a uma benzimidazolnitroamina. A redução da benzimidazolnitroamina foi levada a cabo imediatamente antes da utilização em hidrogenação catalítica com paládio suportado em carvão. Uma mistura de metanol/acetato de etilo a 30% provou ser um sistema de solventes ótimo para esta redução, uma vez que o álcool isoladamente resultou na formação de quantidades excessivas de produtos de oxidação/decomposição, enquanto que o uso do acetato de etilo resultou em tempos reacionais excessivamente longos e fraca solubilidade. A

benzimidazoldiamina foi então acoplada ao Composto de Referência 1 para dar origem ao Composto 1.

À 2-amino-4-[5'-(4''-metilpiperazin-1'-il)benzimidazol-2'-il]anilina (915 mg, 2,84 mmol) preparada de fresco em etanol seco (13 mL) foi adicionada uma solução de complexo de tiosulfato-aldeído (preparado por adição de tiosulfato de sódio (810 mg, 4,26 mmol) em etanol/água (4,5:4,5 mL) a uma solução ao refluxo de 4-N,N-dimetil-2-metilbenzaldeído (695 mg, 0,208 mmol) em etanol (13,7 mL)). A solução resultante foi aquecida ao refluxo durante 24 horas. A solução foi arrefecida, basificada com hidróxido de amônio e colocada no congelador durante várias horas. A solução foi filtrada e o sólido lavado com água, éter dietílico, e o produto seco em vácuo. O material impuro foi submetido a cromatografia de exclusão de tamanhos (Sephadex LH-20, metanol/ácido acético, 98:2) para dar origem ao composto em epígrafe como um sólido amarelo depois de secagem (1,05 mg, 79%) p.f. 198 °C (decomp.). RMN de ^1H [400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$] δ 8,55, d, J 1,5 Hz, 1H, H4'; 8,245, dd, J 8,6, 1,65 Hz, 1H, H6'; 8,05, d, J 8,7 Hz, 1H, H7'; 7,765, d, J 9 Hz, 1H, H7"; 7,715, d, J 8,6 Hz, 1H, H5; 7,45, dd, J 9,1, 2,2 Hz, 1H, H6"; 7,365, d, J 2,2 Hz, 1H, H4"; 6,835, dd, J 8,85, 2,45 Hz, 1H, H4; 6,805, d, J 2,2 Hz, 1H, H3; 3,975, br d, J 13,5 Hz, 2H; 3,685, br d, J 12 Hz, 2H; 3,345, br dt, J 12,25, 2,35 Hz, 2H; 3,21, br dt, J 12,775, 2,3 Hz, 2H; 3,12, s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$; 3,0, s, 3H, NCH_3 ; 2,66, s, 3H, ArCH_3 .

Exemplo 2 - Estudos de culturas celulares

(i) Estudos de Citotoxicidade

Mantiveram-se monocamadas de células V79 em frascos de plástico de Falcon de 25 cm² em meio alfa-MEM com 10% de soro fetal de vitelo (FCS). Trataram-se culturas em fase logarítmica pela adição da quantidade necessária de Hoechst 33258, Hoechst 33342 ou *para*-dimetilamino-Hoechst (25-500 nmoles) dissolvido em 50 µL de ácido acético 10 µM em metanol a 50%. Inverteram-se os frascos imediatamente antes da adição do composto para assegurar a mistura completa do composto com o meio, antes do contacto com a monocamada.

Após 2 horas de incubação a 37 °C, as células foram recolhidas e ensaiadas quanto à sobrevivência clonogénica. A eficiência do plaqueamento para controlo, células não tratadas, foi de 70-80%. Todos os resultados de sobrevivência clonogénica são expressos em relação aos controlos não tratados.

(ii) Irradiações

As culturas foram irradiadas num aparelho ¹³⁷Cs Gammacell-40 (Atomic Energy of Canada Ltd.) a uma dosagem de 0,84 Gy/min. As células tratadas com ligando foram irradiadas durante duas horas após o início da exposição ao ligando. Em todos os casos, a sobrevivência clonogénica foi retardada até uma hora após a conclusão da irradiação.

(iii) Medição da concentração do ligando nos núcleos

Duas horas após a adição do ligando, as monocamadas foram tratadas com pronase. O tratamento com pronase foi terminado por diluição em meio arrefecido em gelo com FCS a 10%, e as células lavadas uma vez com PBS/EDTA a frio, e novamente com tampão nuclear frio (MgCl_2 5 μM , tampão Tris 10 μM , pH 7,4, NaCl 0,14 M).

Os núcleos foram preparados por suspensão das células em tampão nuclear frio contendo 1% de Triton x100. Os núcleos sedimentados foram novamente suspensos em 1 mL de tampão de sonicação (KCI 20 μM , TRIS 20 μM , pH 7,4, NaCl 0,14 M), sonicados (Branson Sonifier Cell Disruptor Modelo B 15; 10 segundos, a uma configuração de controlo de saída de 3,5) e adicionaram-se 40 mL de SDS a 20%. A concentração do ligando foi determinada por espectrofotometria usando um sonificado lisado de células não tratadas como branco. Prepararam-se padrões a partir de lisados de controlo, por adição de uma quantidade conhecida do ligando.

(iv) Parte Experimental**(a) Efeito da concentração do fármaco na sobrevivência das células V79, quer isoladamente, quer em combinação com uma irradiação de 12 Gy**

O composto Hoechst 33258, Hoechst 33342 ou para-dimetilamino-Hoechst foi adicionado aos meios de monocamadas de células V79 nas concentrações finais indicadas. Algumas culturas (curvas inferiores) foram irradiadas durante 2 horas depois da adição do fármaco;

outras não foram irradiadas (curvas superiores). Todas as culturas foram mantidas durante mais uma hora antes do plaqueamento para estudo da sobrevivência clonogénica. Os resultados são mostrados na Figura 1.

(b) Sobrevivência das células V79 após tratamento com fármaco, com irradiação (12 Gy), e efeito da concentração nuclear do radioprotetor

Culturas de monocamada de células V79 foram expostas a várias concentrações dos três radioprotetores, tal como se descreve acima em (a). Após duas horas, as células foram refrigeradas e mantidas no frio durante o isolamento dos núcleos, usando 0,08% p/v de Triton X-100. Após a contagem de uma alíquota da suspensão nuclear, os ligandos foram extraídos e quantificados por espectrofotometria, tendo-se calculado o teor nuclear. Os resultados de sobrevivência apresentados na parte inferior da Figura 1 foram novamente traçados usando os dados de absorção nuclear, e os resultados são apresentados na Figura 2.

(C) Curvas de sobrevivência

As culturas de células V79, que tinham sido tratadas tal como descrito acima em (a) com Hoechst 33342 21 μM , para-dimetilamino-Hoechst 84 μM e orto-metil-para-dimetilamino-Hoechst 30 μM , e controlos não tratados, foram irradiados às doses indicadas ($^{137}\text{Cs}-\gamma$) tendo-se determinado a sobrevivência clonogénica.

Resultados

A Figura 1 mostra os efeitos da concentração adicionada do protetor na citotoxicidade (porção superior) e na sobrevivência após uma única dose de 12 Gy ($^{137}\text{Cs-}\gamma$). O Hoechst 33342 torna-se claramente citotóxico a concentrações acima de 20-30 μM , enquanto que o dimetilamino-Hoechst não tem qualquer efeito na sobrevivência a concentrações até aos 100 μM . Para as culturas que foram irradiadas com 12 Gy, o aumento das concentrações dos ligandos resulta num aumento da radioproteção até que se encontrem concentrações citotóxicas.

Para se comparar a potência radioprotetora dos ligandos, fez-se uma tentativa de medir as concentrações dos ligandos nos núcleos das células na altura da irradiação. As células tratadas com ligando foram tratadas com pronase e tratadas com um detergente arrefecido em gelo para preparar os núcleos isolados. Os ligandos foram extraídos dos núcleos e ensaiados espectralmente, e os resultados expressos em termos de absorção por 10^6 núcleos. Isto permitiu então que a sobrevivência após 12 Gy fosse expressa em termos de teor nuclear dos radioprotetores. Os resultados são apresentados na Figura 2 e sugerem que o *para*-dimetilamino-Hoechst é um radioprotetor mais potente.

As curvas de sobrevivência na Figura 3 mostram a melhoria progressiva na atividade radioprotetora, em termos dos fatores modificadores da dose (DMF), de:

- Hoechst 33342 (DMF 1,3), para
- *para*-N,N-dimetilamino-Hoechst (DMF 1,7), para
- *orto*-metil-*para*-N,N-dimetilamino-Hoechst (DMF 2,1).

Em particular, a potência do *orto*-metil-*para*-N,N-dimetilamino-Hoechst destaca-se em comparação com o Hoechst 33342, dada a semelhança das concentrações usadas (30 μM e 21 μM , respetivamente).

Esta potência dos novos radioprotetores comparada com a de radioprotetores existentes é demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1

Linha celular	Radioprotetor	Concentração	DMF
HT29	Hoechst 33342	8,7 μM	1,5
V79	Hoechst 33342	21 μM	1,3
V79	<i>para</i> -N,N-dimetilamino-Hoechst	84 μM	1,7
V79	<i>orto</i> -metil- <i>para</i> -N,N-dimetilamino-Hoechst	30 μM	2,1
CHO	WR1065	4 mM	1,9

Exemplo 3 - Estudos de Culturas Celulares

A atividade radioprotetora do *orto*-metil-*para*-dimetilamino-Hoechst (composto 1) foi comparada com o composto Hoechst 33342 de modo semelhante ao descrito no Exemplo 5 acima. Os resultados são apresentados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2

Protetor apenas (sem irradiação)	Irradiação apenas (12 Gy)	Protetor mais irradiação (12 Gy)	Fator de Proteção
Composto 1 (20 µM) :			
0,63	0,036	0,145	4,0
0,88	0,028	0,12	4,3
0,71	0,034	0,15	4,4
Hoechst 33342 (21 µM) :			
0,80	[0,022]	0,05	2,3
0,87	[0,022]	0,06	2,7
0,76	[0,022]	0,051	2,3
para-nitro-Hoechst (20 µM) :			
0,89	[0,022]	0,011	[0,5]*
* Um fator de proteção de <1 denota sensibilização em vez de proteção.			

As três primeiras colunas mostram a fração sobrevivente em relação à das células de controlo não tratadas. Cada linha representa uma experiência separada e os valores são as médias de experiências em duplicado. Os valores entre parênteses retos são a média de um número de resultados de um número de experiências efetuadas durante o período relevante. O fator de proteção é a razão entre a fração sobrevivente para células irradiadas, com e sem protetor.

Os resultados na Tabela 2 demonstram o aumento da atividade radioprotetora do composto com rotação restringida pelo grupo orto-metilo. Esta característica estrutural de restrição estereoquímica, para além de favorecer o modo de ligação à ranhura menor, pode também ter a vantagem de

reduzir a ligação dos protetores a componentes que não do DNA da célula, tal como a proteínas e lípidos.

A Tabela 2 mostra também a atividade radiosensibilizadora do *para*-nitro-Hoechst. Decorre deste resultado que a incorporação de substituintes eletrodoadores tais como grupos dimetilamino aumenta a atividade radioprotetora e que, reciprocamente, a incorporação de substituintes eletroatratores (tais como um grupo nitro) diminuirá a atividade radioprotetora.

Exemplo 4 - Modelo pulmonar de ratinhos

Esboço do modelo

A irradiação dos pulmões de ratinhos, em doses apropriadas, resulta na perda fatal da função pulmonar. O surgimento dos danos é sinalizado por um aumento na frequência respiratória. A resposta à dose e a cinética de perda da função pulmonar no seguimento de irradiação de ambos os pulmões varia entre diferentes estirpes de ratinhos.

Detalhes experimentais

Os procedimentos para irradiação e medição da frequência respiratória foram essencialmente como descritos por Travis *et al*³. Grupos de 5-6 ratinhos-macho DBA/2J foram anestesiados e irradiados com 250 kV de Raios-X (dose única) usando uma montagem que blindava todo o corpo exceto os dois pulmões. Usou-se uma fina tira de chumbo na linha média para blindar a medula espinal entre os pulmões. Alguns ratinhos receberam uma injeção intravenosa (veia da cauda) de Hoechst 33342 ou *orto*-metil-*para*-N,N-

dimetilamino-Hoechst (2 mg/25 g), 30 minutos antes da irradiação.

A intervalos semanais, de 4 a 6 semanas após a irradiação, mediu-se a frequência respiratória para cada ratinho. O ratinho foi mantido numa pequena câmara equipada com um microfone e a frequência respiratória analisada num PC. Determinou-se a frequência respiratória média para cada um de 3 períodos de 2 segundos e registou-se a média destas leituras como a frequência respiratória. Calcularam-se as médias das frequências respiratórias registadas para cada grupo de ratinhos e determinaram-se os erros-padrão.

Todos os ratinhos foram monitorizados diariamente quanto a sinais de angústia respiratória (aparência curvada, pelo no ar), sendo prestada particular atenção aos ratinhos que apresentavam uma frequência respiratória elevada.

A atividade radioprotetora *in vivo* do Hoechst 33342 e do orto-metil-para-dimetilamino-Hoechst foi mostrada num modelo pulmonar de ratinhos. Isto demonstra claramente que um radioprotetor pode ser administrado em concentrações suficientes para as células críticas no pulmão (isto é, aquelas células que determinam a radiosensibilização da função pulmonar) através de injeção intravenosa.

Os resultados obtidos estão sumariados na Figura 4, que mostra as mortes acumuladas às 15 semanas após a irradiação bilateral dos pulmões de ratinhos. O radioprotetor (2 mg/25 g de ratinho) foi administrado 30 minutos antes da dose única de irradiação.

Este deslocamento (para a direita) das curvas de resposta à dose para ratinhos tratados com o composto Hoechst 33342 é uma demonstração clara de radioproteção. Com base na comparação de valores de ED_{50} , o fator modificador da dose é aproximadamente de 1,2. É também claro que o orto-metil-para-N,N-dimetilamino-Hoechst é ainda mais eficaz (fator modificador da dose de 1,35).

Os resultados da frequência respiratória para uma experiência separada são apresentados na Figura 5. Para esta experiência, a frequência respiratória máxima registada para cada animal até 24 semanas foi usada para calcular a média para cada grupo. Esta figura mostra um DMF de 1,4 para o orto-metil-para-N,N-dimetilamino-Hoechst.

Exemplo 5 - Estudos da Pele em Porcos

O modelo da pele em porcos é descrito por J. W. Hopewell⁴. As semelhanças estruturais entre a pele humana e a dos porcos estão na base da relevância do modelo.

Embora alguns estudos da pele em porcos envolvam irradiação externa com feixes, uma fonte de radiação particularmente conveniente são os discos que contêm isótopos emissores β , tipicamente ^{90}Sr . As fontes podem ser mantidas na pele, ou para doses mais elevadas, coladas ao animal durante períodos apropriados de tempo para a dose necessária ser administrada. Os discos têm tipicamente cerca de 2 cm de diâmetro, de tal modo que se possa dispor uma série de diferentes doses nos flancos de um único animal.

As reações "agudas" (3 a 9 semanas após a irradiação) resultam de danos por radiação nas células basais da

epiderme, e manifestam-se como eritema e descamação seca e húmida. As reações "tardias" (10 a 16 semanas) resultam de efeitos da radiação no tecido conjuntivo vascular dérmico, caracterizadas por um eritema lilás escuro e necrose. O sistema de classificação está bem descrito.

Os radioprotetores foram formulados num creme de propilenoglicol contendo 10% de DMSO. A extensão e a cinética de penetração foram seguidas por microscopia de fluorescência de secções congeladas da pele, para permitir a optimização da administração.

As curvas de resposta à dose de radiação foram construídas para campos apenas de radiação. Os resultados de campos com cremes radioprotetores são apresentados na Tabela 3 abaixo, com os respetivos controlos apenas de creme (veículo). A diminuição na extensão da reação da pele para os campos de teste é evidente.

Tabela 3

Dose (Gy)	Creme* (0,15 g/campo) Princípio Ativo	Conc. (µg/g)	Campos que mostram a descamação húmida (10 semanas após irradiação)	
			#	%
36	branco	-	5/7	71%
36	Hoechst 33342	5000	3/7	43%
36	para-dimetilamino- Hoechst	5000	4/7	57%
40	branco	-	7/7	100%
40	Hoechst 33342	500	4/6	83%
40	sem creme	-	7/8	88%
40	metil-para- dimetilamino-Hoechst	5000	4/8	50%

Dose (Gy)	Creme* (0,15 g/campo) Princípio Ativo	Conc. (µg/g)	Campos que mostram a descamação húmida (10 semanas após irradiação)	
			#	%
44	"	5000	4/8	50%

* O creme foi preparado a partir dos seguintes ingredientes, tal como indicado:

Creme Cetomacrogol Aquoso

Creme não iônico

Creme Sorboleno

Cera Emulsionante Cetomacrogol	15
Parafina Líquida (por peso)	10
Parafina Branca Macia	10
Clorocresol	0,1
Propilenoglicol	5
Água purificada, recém-fervida e arrefecida..... para	100

A cera emulsionante Cetomacrogol é fundida com as parafinas a cerca de 70 °C. O clorocresol e o propilenoglicol são dissolvidos em cerca de 50 partes de água purificada aquecida a cerca da mesma temperatura. Os componentes são então misturados, ajustados ao peso, e agitados até arrefecerem.

Exemplo 6 - Proteção das células endoteliais do cérebro de ratinhos

A irradiação de cérebros de roedores resulta na perda de um subconjunto de células endoteliais do cérebro dentro de 24 horas após a irradiação. A Figura 6 mostra a extensão da perda de células endoteliais do cérebro de ratinhos com o aumento da dose de radiação (dose única), e compara controles apenas irradiados (\square) com os resultados para ratinhos que foram protegidos por injeção intravenosa do composto Hoechst 33342 (80 mg/kg) 10 minutos antes da radiação (\circ).

Os números de células endoteliais foram classificados tal como descrito por Lyubimova *et al.*. Cada ponto representa a média para 3-4 ratinhos; foram classificadas 3 secções para cada animal, foi classificado um total de 30 campos para cada secção, e a figura indica o número médio de células por campo. As barras de erros indicam os erros-padrão.

Dada a rapidez da perda de células (em 24 horas), postula-se que um subconjunto particularmente radiosensível de células endoteliais sofra apoptose em resposta à irradiação e que o tratamento com radioprotetor diminua substancialmente a radiosensibilidade desse subconjunto.

REFERÊNCIAS

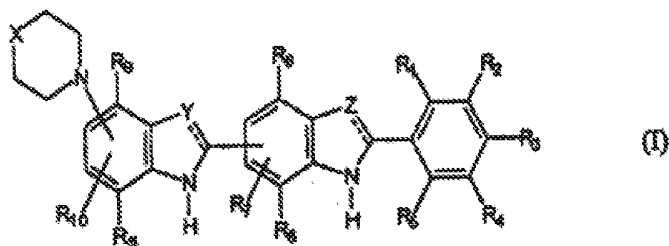
1. Smith, P. J. e Anderson, C. O., *Int. J. Radial. Biol.*, 46, 331 (1984).
2. Young, S. D. e Hill, R. P., *Brit. J. Cancer*, 60, 715-721 (1989).

3. Travis, E. L., Down I. D., Holmes S. J. e Hobson B., "Radiation pneumonitis and fibrosis in mouse lung assayed by respiratory frequency and histology", Radiat. Res. 84, 133-143 (1980).
4. van den Aardweg G. J. M. J., Hopewell J. W. e Simmonds R. H., Radiother. Oncol. 11, 73-82 (1988).
5. Campaigne, E., Archer, W. L., Org. Synth. Coll., Vol. 4, 331.
6. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, Longman Scientific and Technical, Quinta edição, 1989, 905.
7. Moyer, M. P., Shiurba, J. F., Rapoport, H., J. Org. Chem., 1986, 51, 5106.
8. Kosuge, T., Ishida, A., Inaba, A., Nukaya, H., Chem. Pharm. Bull., 1985, 33, 1414.
9. Garcia, E. E., Fryer, R. I., J. Heterocyclic Chem., 1974, 11, 219.
10. Kelly, D. P., Bateman, S. A., Martin, R. F., Reum, M. E., Rose, M., Whittaker, A. R. D., Aust. J. Chem., 1994, 47, 247.
11. Withers H. R. e Elkind M. M., "Microcolony survival assay for cells of the intestinal mucosa exposed to radiation".
12. Lyubimova N. V., M. K. Levitman, E. D. Plotnikova e L. K. Eidus, Brit. J. Radio. 64 934-40 (1991)].

Lisboa, 14 de Maio de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um composto de fórmula (Ia):



em que

X é NCH₃;

Y e Z são selecionados entre N ou CH;

R₃ é N(R)₂ ou NHR, em que R é um alquilo C₁ a C₃₀;

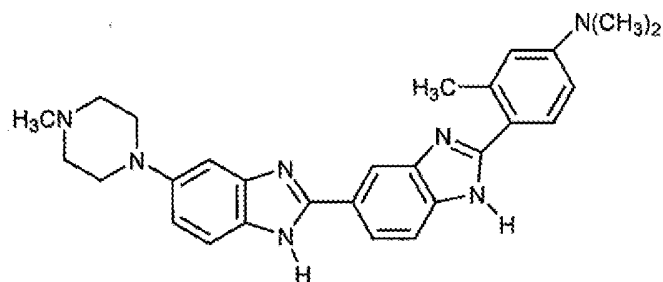
R₁ é um alquilo C₁ a C₃₀, um alcenilo C₂ a C₃₀ ou -OR, em que R é um alquilo C₁ a C₃₀;

R₅, R₇ e R₁₀ são selecionados entre hidrogénio, um alquilo C₁ a C₃₀, um alcenilo C₂ a C₃₀ e -OR, em que R é um alquilo C₁ a C₃₀; e

R₂, R₄, R₆, R₈, R₉ e R₁₁ são hidrogénio;

ou um sal e/ou tautómero do mesmo.

2. Um composto de acordo com a reivindicação 1, que é o *orto*-metil-*para*-(N,N-dimetilamino)-Hoechst, com a fórmula:



3. Um composto de acordo com as reivindicações 1 ou 2 para uso em radioterapia do cancro, para minimizar os danos em células e tecidos não tumorais, em que o local de um tumor é submetido a uma fonte de radiação ionizante.
4. Um composto de acordo com as reivindicações 1 ou 2 para uso na proteção de um sujeito humano ou animal de danos por radiação resultantes da exposição a radiação ionizante.

Lisboa, 14 de Maio de 2015

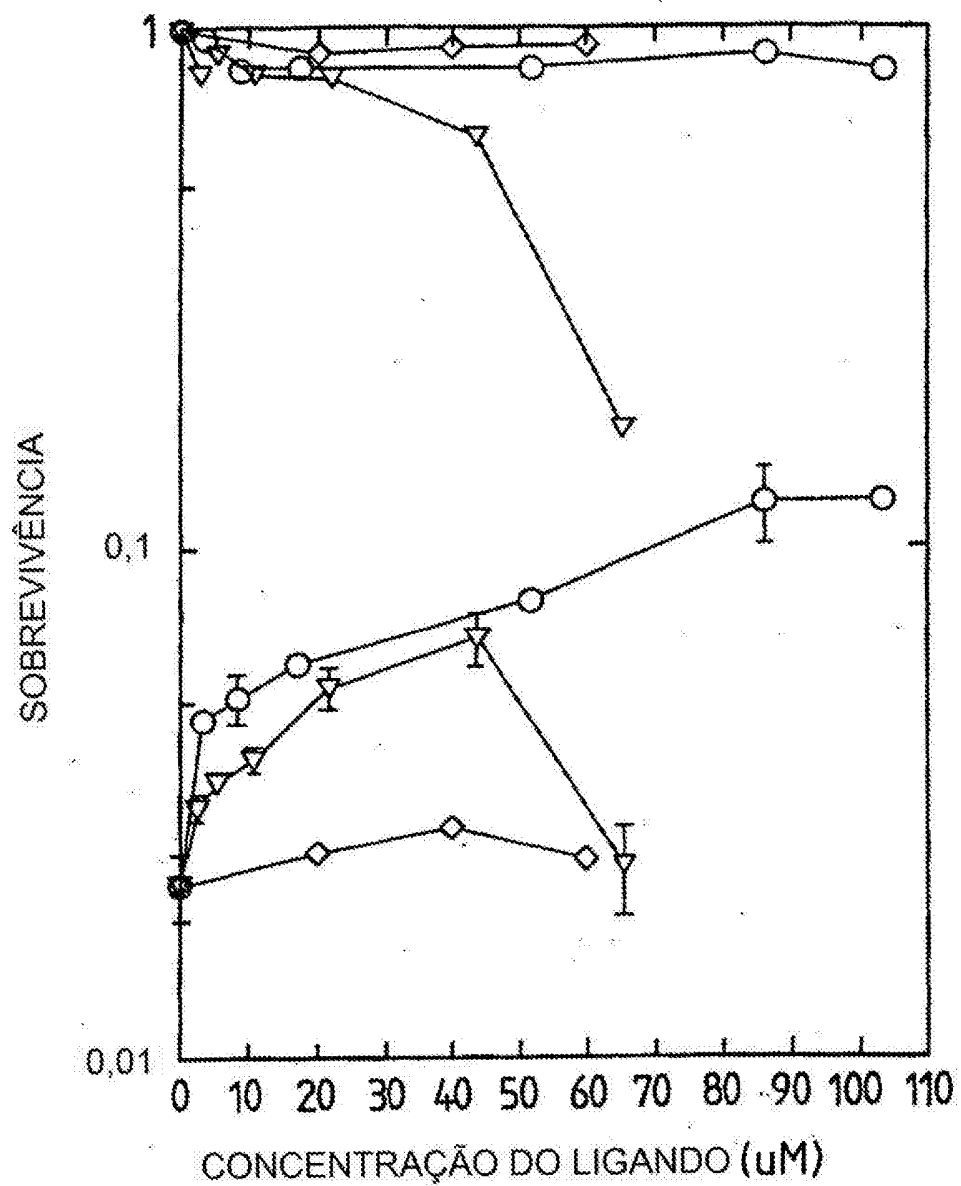
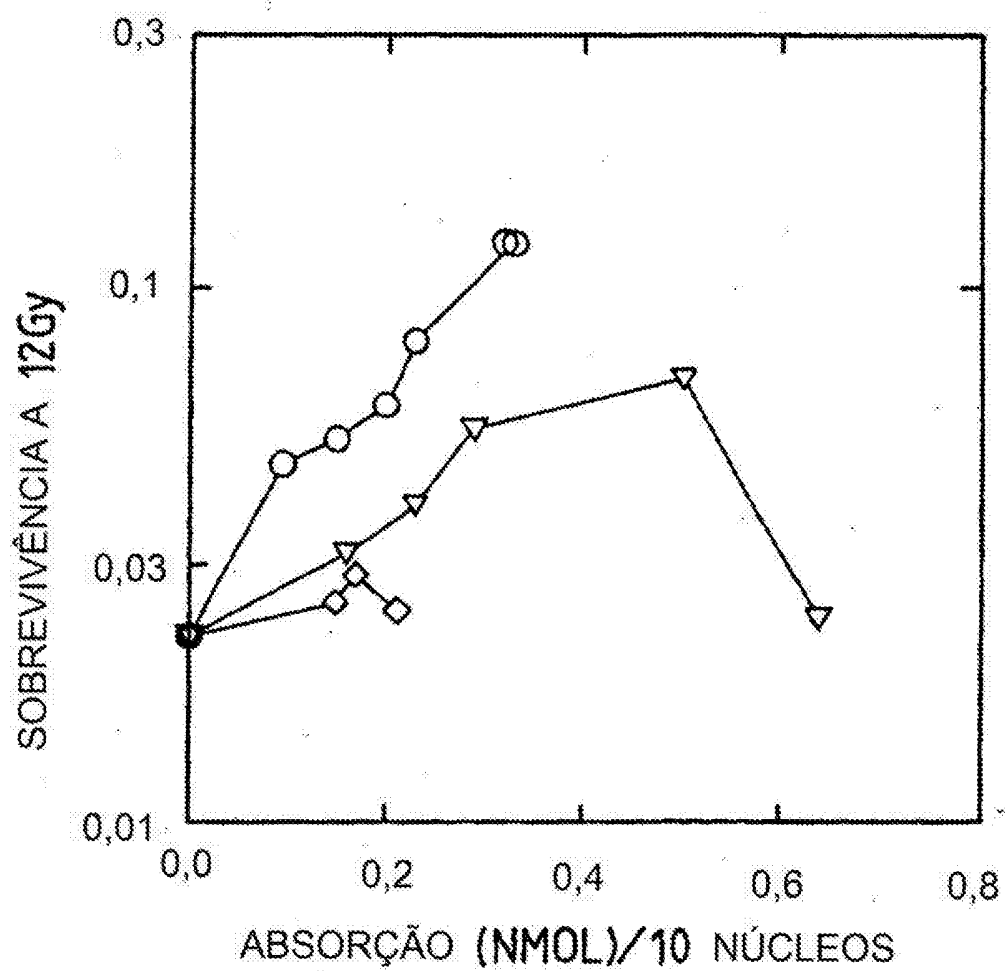
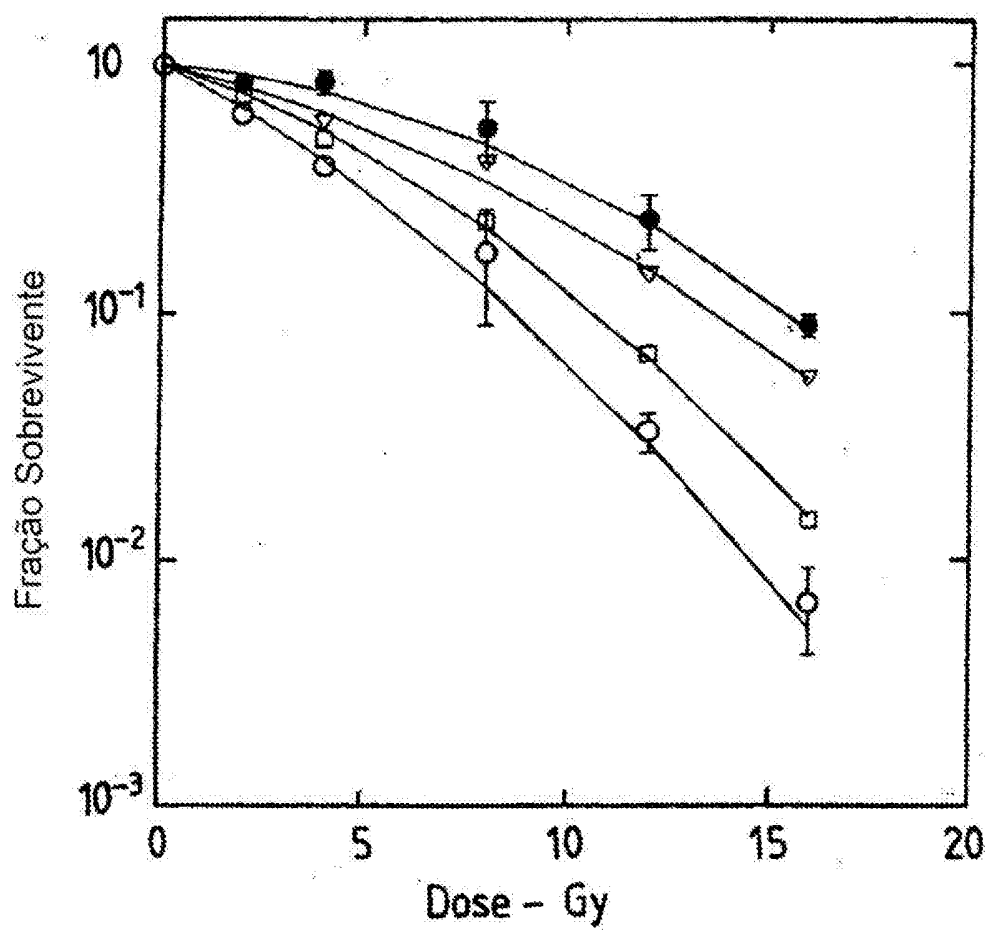


FIG 1

FIG 2

FIG 3

