

(11) Número de Publicação: **PT 1591437 E**

(51) Classificação Internacional:

C07C 61/35 (2007.10) **C07C 61/29** (2007.10)
C07C 69/753 (2007.10) **C07C 69/757** (2007.10)
C07C 69/07 (2007.10) **C07C 69/00** (2007.10)
C07C 33/14 (2007.10) **C07C 13/60** (2007.10)
A61K 31/22 (2007.10) **A61K 31/215** (2007.10)
A61K 31/19 (2007.10) **A61K 31/45** (2007.10)
A61K 31/15 (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2000.05.12**

(30) Prioridade(s): **1999.05.14 US 134295**
2000.03.03 US 186853

(43) Data de publicação do pedido: **2005.11.02**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.11.25**
043/2010

(73) Titular(es):

NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.
SUITE 210, 9393 TOWNE CENTER DRIVE SAN
DIEGO, CA 92121 US
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA, OFFICE OF TECHNOLOGY
TRANSFER, UNIVERSITY OF CALIFORNIA US

(72) Inventor(es):

MICHAEL PALLADINO US
EMMANUEL A THEODORAKIS US

(74) Mandatário:

ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO
RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA PT

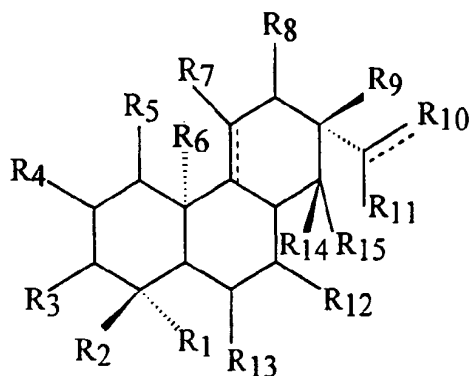
(54) Epígrafe: **MODULADORES DA INTERLEUCINA-1 E DO FACTOR ALFA DE NECROSE TUMORAL, SÍNTESE DOS REFERIDOS MODULADORES E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DOS REFERIDOS MODULADORES**

(57) Resumo:

RESUMO

"MODULADORES DA INTERLEUCINA-1 E DO FACTOR ALFA DE NECROSE TUMORAL, SÍNTESE DOS REFERIDOS MODULADORES E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DOS REFERIDOS MODULADORES"

Composto tendo a estrutura química seguinte:



os seus ésteres profármacos e sais de adição de ácido que são úteis como moduladores da Interleucina-1 e do Factor de Necrose Tumoral- α , em que os grupos R são definidos nas reivindicações.

DESCRIÇÃO

"MODULADORES DA INTERLEUCINA-1 E DO FACTOR ALFA DE NECROSE TUMORAL, SÍNTESE DOS REFERIDOS MODULADORES E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DOS REFERIDOS MODULADORES"

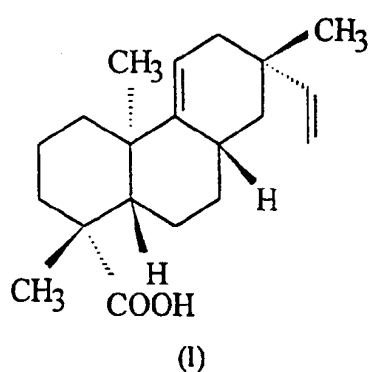
Campo da Invenção

A invenção refere-se a compostos químicos e composições farmacêuticas, incluindo novos compostos químicos e suas composições farmacêuticas, úteis para o tratamento de diversas doenças e estados patológicos. A invenção também se refere a métodos de síntese de produtos naturais e de novos compostos químicos estruturalmente relacionados. Mais particularmente, a presente invenção refere-se a novos análogos dos compostos e a processos de preparação de compostos e suas composições farmacêuticas, úteis no tratamento de, por exemplo, inflamação, cancro, caquexia, doença cardiovascular, diabetes, otite do ouvido médio, sinusite e rejeição de transplantes.

Antecedentes da Invenção

O *Acanthopanax koreanum* Nakai (*Araliaceae*), o qual é endêmica na ilha de Cheju, República da Coreia, é tradicionalmente utilizado como um remédio para, por exemplo, nevralgia, paralisia e lumbago. Vários componentes úteis, incluindo o ácido acantóico, um composto possuindo a estrutura química de Fórmula (I), foram isolados a partir da casca da raiz desta árvore. Adicionalmente, determinados análogos do composto

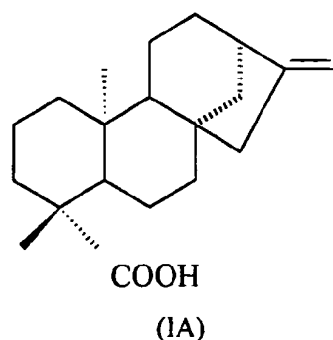
de Fórmula (I), por exemplo, em que o grupo COOH está substituído por um grupo metanólico, por um éter metil-acetílico, por um grupo metilo e por um éster metílico, também foram, cada, isolados a partir da casca da raiz de *Acanthopanax koreanum* Nakai (*Araliaceae*). Ver Kim, YH. e Chung, B.S., J. Nat. Pro., 51, 1080-83 (1988). (Os nomes químicos correctos destes análogos são proporcionados nesta referência.)



O composto de Fórmula (I), também conhecido como ácido acantóico, tem sido descrito como tendo determinados efeitos farmacológicos, incluindo, por exemplo, actividades analgésica e anti-inflamatória. O composto de Fórmula (I), também, apresenta toxicidade muito baixa; 1000 mg/kg é a dose letal mínima (MLD) quando ministrada a um rato. Ver Lee, Y.S., "Pharmacological Study for (-)-Pimara-9(11),15-Diene-19-oic Acid, A Component of *Acanthopanax koreanum* Nakai" Tese de Douoramento, Dept. of Pharmacy, Seoul National University, Korea (1990). O composto de Fórmula (I) e/ou os seus análogos naturais, podem exhibir estes efeitos farmacológicos conhecidos inibindo a migração de leucócitos e a síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) e é um determinante suspeito da produção de ambos, interleucina-1 (IL-1) e Factor de Necrose Tumoral-α (TNF-α). Adicionalmente, um processo de preparação de ácido acantóico e a utilização do

ácido acantóico para o tratamento de doenças imunes são descritos na Publicação de Patente Internacional WO 95/34300 (21 de Dezembro de 1995).

Da mesma forma, o composto de Fórmula (IA), ácido cauranóico e o correspondente éster metílico análogo do composto de Fórmula (IA), bem como os análogos de redução metanólica do composto de Fórmula (IA) foram isolados a partir da casca da raiz de *Acanthopanax koreanm* Nakai (*Araliaceae*). Ver Kim Y.H. e Chung, B.S., J. Nat. Pro., 51, 1080 (1988). (O nome químico correcto do ácido cauranóico, ácido (-)-caur-16-en-19-óico e dos análogos conhecidos de ácido cauranóico são proporcionados nesta referência).



O Factor de Necrose Tumoral- α (aqui "TNF- α " ou "TNF") e/ou Interleucina-1 (aqui "IL-1") estão envolvidos em diversas vias bioquímicas e, desta forma, são moduladores da actividade ou produção de TNF- α e/ou IL-1 extremamente desejados, em especial novos moduladores da actividade de TNF- α e/ou IL-1 ou novos compostos que influenciem a produção de IL-1 ou TNF- α , ou ambos. Tais compostos e classes de compostos seriam valiosos na manutenção do sistema imunológico humano e no tratamento de doenças tais como, por exemplo, pleurisia tuberculosa, pleurisia reumatóide e doenças não convencionalmente consideradas doenças

imunes, tais como cancro, doença cardiovascular, vermelhidão da pele, infecção viral, diabetes e rejeição de transplantes.

Embora seja conhecido um grande número de abordagens para regular a produção do Factor de Necrose Tumoral- α e das Interleucinas, novas abordagens, compostos e formulações farmacêuticas para regular a produção do Factor de Necrose Tumoral- α e Interleucinas são extremamente desejáveis e têm sido procuradas desde há longa data pelos especialistas na técnica.

O documento WO 95/34300 descreve um processo para a preparação de ácido acantóico e composições farmacêuticas compreendendo este composto.

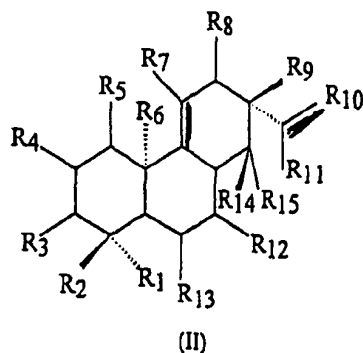
FS. Knudsen et al., Phytochemistry 1986, Vol. 25, 1240-1242 descrevem diterpenos de pimaradieno de *Mikania Triangulavis*.

Y.M. Kim e B.S. Chung, Journal of Natural Products 1988, Vol. 51, Nº 6, 1080-1083 descrevem diterpenos de pimaradieno de *Acanthopanax Koreanum*.

O documento WO 99/37600 descreve derivados de diterpeno e agentes analgésicos anti-inflamatórios compreendendo os mesmos.

Sumário da Invenção

Os compostos da presente invenção incluem, compostos possuindo a estrutura química de Fórmula (II). Com referência aos compostos com a estrutura química de Fórmula (II), a invenção é:



em que os grupos R são definidos como na reivindicação 1.

Os compostos da invenção incluem composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz dos compostos descritos, opcionalmente, em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável. Tais composições são úteis como, por exemplo, analgésicos anti-inflamatórios, no tratamento de doenças imunes e autoimunes, como agentes anticancerígenos ou antitumorais e são úteis no tratamento de doenças cardiovasculares, vermelhidão da pele, infecção viral, diabetes, otite do ouvido médio, sinusite e/ou rejeição de transplantes. Particularmente, uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de Fórmula (II), podem ser utilizados como um agente anticancerígeno, agente antitumoral, agente antiviral e podem ser úteis no tratamento de doença cardiovascular, vermelhidão da pele, infecção viral, diabetes, otite do ouvido médio, sinusite e/ou rejeição de transplantes.

A presente invenção também proporciona novos métodos de síntese dos compostos acima descritos e dos seus análogos, compreendendo a etapa de realizar uma reação de Diels-Alder fazendo reagir um dieno possuindo dois ou mais anéis com um

composto dienófilo para proporcionar um composto resultante possuindo três ou mais anéis; e produzir um composto sintético desejado. A reacção de Diels-Alder, juntamente com a selecção do dieno e do dienófilo proporciona flexibilidade na síntese de uma variedade de compostos da invenção e permite a utilização de bibliotecas combinatórias químicas de compostos da invenção, para utilização em ensaios biológicos, incluindo ensaios clínicos.

Breve Descrição das Figuras

A FIG. 1 mostra a estrutura do ácido acantóico e o éster metílico do ácido acantóico, uma projecção estereoquímica do ácido acantóico e uma projecção de tipo esqueleto de determinados compostos.

A FIG. 2 mostra a análise retro-sintética e associações de ligações estratégicas de determinados compostos.

A FIG. 3 mostra abordagens seleccionadas para a construção do anel AB de determinados compostos, incluindo: a abordagem de Wenkert para a síntese de ácido (+)podocáprico; a abordagem de Welch para a síntese de ácido (+)podocáprico; e a abordagem de DeGrot para a síntese de ácido (+)podocáprico.

A FIG. 4 mostra um esquema esquemático de síntese (Esquema 1) da síntese do sistema de anel AB de ácido acantóico e determinados compostos.

A FIG. 5 mostra um esquema de síntese (Esquema 2) através do qual pode ser concluída a síntese de ácido acantóico e determinados compostos.

A FIG. 6 mostra o modelo minimizado, tridimensional do dieno 42, como descrito na descrição detalhada.

A FIG. 7 mostra um esquema de síntese (Esquema 3) para o desenvolvimento e aplicação do catalisador 49, como descrito na descrição detalhada, uma reacção de Diels-Alder assimétrica.

A FIG. 8 mostra um esquema de síntese (Esquema 4) para a síntese do composto de Fórmula (I) e determinados compostos com base numa metodologia de Diels-Alder assimétrica.

A FIG. 9 mostra a relação entre estrutura e actividade e o enfoque dos estudos de relação entre estrutura e actividade do ácido oleanólico e os seus derivados e determinados compostos.

A FIG. 10 mostra locais identificados para modificação e os estudos de relação entre estrutura e actividade do Composto 1.

A FIG. 12 mostra determinados derivados representativos preferidos do Composto 1 para estudos de marcação de fotoafinidade.

A FIG. 13 mostra determinados exemplos preferidos, representativos de dímeros e/ou conjugados do Composto 1.

A FIG. 14 mostra a uma síntese química completa de determinados compostos, identificados aqui a seguir como TTL1 e TTL3 na Figura 17.

A FIG. 15 mostra uma síntese química de um composto preferido marcado com ^{14}C , identificado como TTL3 na Figura 17.

A FIG. 16 mostra a síntese química completa do composto de Fórmula (I).

A FIG. 17 mostra um resumo das sínteses de determinados compostos e as propriedades físicas destes compostos. Os compostos TTL1, TTL2, TTL3 e TTL4 são definidos como representados nesta Figura.

A FIG. 18 mostra um resumo das sínteses do Exemplo 1.

A FIG. 19 mostra as estruturas do ácido (-)acantóico e ácido (+)pimárico.

A FIG. 20 mostra a análise retro-sintética do ácido (-)acantóico do Exemplo 1.

A FIG. 21 mostra o esquema de síntese (Esquema 5) de compostos, como descritos no Exemplo 1. Os reagentes, condições e rendimentos em percentagem de cada etapa foram como se segue: (a) 0,1 equivalentes de PTSA $(\text{CH}_2\text{OH})_2$, benzeno, 80 °C, 4 h, 90%; (b) 2,2 equivalentes de Li, NH_3 líquido, 1,0 equivalentes de *t*BuOH, -78 até -30 °C, 30 minutos seguido de isopreno (excesso), -78 até 50 °C; 1,1 equivalentes de NC-CO₂Me, Et₂O, -78 até 0 °C, 2 h, 55%;

(c) 1,1 equivalentes de NaH, HMPA, 25 °C, 3 h; 1,1 equivalentes de MoMCl, 25 °C, 2 h, 95%; (d) 7,0 equivalentes de Li, NH₃ líquido, -78 até -30 °C, 20 min; CH₃I (excesso), -78 até -30 °C, 1 h, 61%; (e) HCl 1 N, THF, 25 °C, 15 min, 95%; (f) 1,6 equivalentes de acetileto de Li, Et₂O, 25 °C, 1 h, 91%; (g) Catalisador de Lindlar (20% em peso), H₂, dioxano/piridina 10/1, 25°, 10 min 95%; (h) 4,4 equivalentes de BF₃•Et₂O, benzeno/THF 4/1, 80 °C, 5 h, 95%; (i) 13 equivalentes de composto 103, puro, 8 h, 25 °C, 100%; (j) 1,4 equivalentes de NaBH₄, THF MeOH: 10/1, 30 min, 25 °C, 94%; (k) 1,1 equivalentes de *p*-Br-C₆H₄COCl, 1,5 equivalentes de piridina, 0,1 equivalentes de DMAP, CH₂Cl₂, 25, 2 h, 95% para o composto **116**, 97% para o composto **117**.

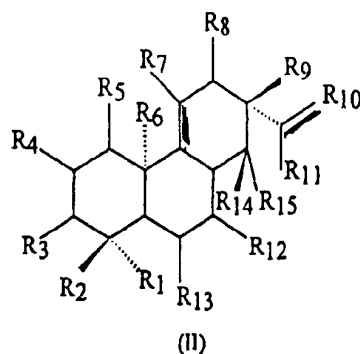
A FIG. 22 mostra a representação Chem3D de desenhos ORTEP do composto 116 e 117, mostrando apenas átomos de hidrogénio seleccionados, por razões de clareza.

A FIG. 23 mostra o esquema sintético (Esquema 6) do núcleo tricíclico do ácido (-)acantóico do Exemplo 1, Os reagentes, condições e rendimentos em percentagem de cada etapa foram como se segue: (a) 3,0 equivalentes de PhSH, 0,05 equivalentes de AIBN, xilenos, 120 °C, 18 h, 86%, (b) 1,1 equivalentes de POCl₃, HMPA, 25 °C, 1 h; 1,1 equivalentes de piridina, 150 °C, 18 h 81%; (c) 3,0 equivalentes de composto 103, 0,2 equivalentes de SnCl₄ (1 M em CH₂Cl₂), CH₂Cl₂, -20 até 0 °C, 20 h, 84%; (d) 1,4 equivalentes de NaBH₄, EtOH, 25 °C, 30 min; (e) Ni de Raney (excesso), THF, 65 °C, 10 min 91% (nas duas etapas); (f) 1,3 equivalentes de periodinano de Dess-Martin, CH₂Cl₂, 10 25 °C, 30 min; (g) 2,7 equivalentes de P₃PhCH₃Br,

2,2 equivalentes de NaHMS (1,0 em THF), THF, 25 °C, 18 h, 86% (nas duas etapas); (h) 3,0 LiBr, DMF, 160 °C, 3 h, 93%.

Descrição Detalhada

Os compostos da presente invenção têm a estrutura química mostrada na Fórmula (II)



Os grupos R do composto de Fórmula (II) são seleccionados de acordo com a reivindicação 1.

Definições

Conforme aqui utilizado, o termo “alquilo” significa qualquer hidrocarboneto saturado, linear ou ramificado, sendo preferidos os hidrocarbonetos C₁-C₆ não substituídos, saturados, lineares e sendo muito preferidos os metilo, etilo, isobutilo e terc-butilo. Entre os hidrocarbonetos saturados, substituídos são preferidos os hidrocarbonetos C₁-C₆ saturados, substituídos, mono- e di- e pré-halogéneo e hidrocarbonetos substituídos com amino, sendo muito preferidos os perfluorometilo, perclorometilo, perfluoro-terc-butilo e percloro-terc-butilo. O

termo "alquilo substituído" significa qualquer hidrocarboneto saturado substituído, linear ou ramificado, estando na definição de "alquilo substituído" as amins secundárias de alquilo C₁-C₆ linear, alquilaminas secundárias C₁-C₆ substituídas e amins terciárias de alquilo C₁-C₈ linear, mas não são preferidas. O termo "alquilo substituído" significa qualquer hidrocarboneto saturado substituído, linear ou ramificado. Os compostos cíclicos, tanto os hidrocarbonetos cíclicos como os compostos cíclicos possuindo heteroátomos, estão dentro do significado de "alquilo".

Conforme aqui utilizado, o termo "substituído" significa qualquer substituição de um átomo de hidrogénio por um grupo funcional.

Conforme aqui utilizado, o termo "grupo funcional" tem a sua definição comum e refere-se a meios químicos, de um modo preferido, seleccionados a partir do grupo consistindo de um átomo de halogéneo, alquilo C₁-C₂₀, alquilo substituído C₁-C₂₀, alquilo per-halogenado, cicloalquilo, cicloalquilo substituído, arilo, arilo substituído, benzilo, heteroarilo, heteroarilo substituído, ciano e nitro. Os grupos funcionais também podem ser seleccionados a partir do grupo consistindo de -SR_s, -OR_o, -NR_{n1}R_{n2}, -N⁺R_{n1}R_{n2}R_{n3}, -N=N-R_{n1}, P⁺R_{n1}R_{n2}R_{n3}, -COR_c, -C(=NOR_o)R_c, -CSR_c, -OCOR_c, -OCONR_{n1}R_{n2}, -OCO₂R_c-, -CONR_{n1}R_{n2}, -C(=N)NR_{n1}R_{n2}, -CO₂R_o, -SO₂NR_{n1}R_{n2}' -SO₃R_o, -SO₂R_o, -PO(OR_o)₂, -NR_{n1}CSNR_{n2}R_{n2}, Os substituintes destes grupos funcionais R_{n1}, R_{n2}, R_{n3}, R_o e R_c são, de um modo preferido, cada, separadamente seleccionado a partir do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, alquilo C₁-C₂₀, alquilo substituído C₁-C₂₀, cicloalquilo, cicloalquilo substituído, arilo, arilo substituído, benzilo, heteroarilo, heteroarilo substituído e podem constituir partes de um

heterocíclico alifático ou aromático. Os R_c são, de um modo preferido, seleccionados a partir do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, alquilo C_1-C_{20} , alquilo substituído C_1-C_{20} , alquilo per-halogenado, cicloalquilo, cicloalquilo substituído, arilo, arilo substituído, benzilo, heteroarilo, heteroarilo substituído e ciano.

Conforme aqui utilizados aqui a seguir, os termos “halogéneo” e “átomo de halogéneo” referem-se a qualquer um dos átomos radioestáveis da coluna 17 da Tabela Periódica de Elementos, de um modo preferido, flúor, cloro, bromo ou iodo, sendo particularmente preferidos o flúor e o cloro.

Conforme aqui utilizado, o termo “alcenilo” significa qualquer hidrocarboneto não saturado, substituído ou não substituído, linear ou ramificado, sendo mais preferidos os hidrocarbonetos C_1-C_6 não substituídos mono-insaturados e di-insaturados, lineares e os hidrocarbonetos substituídos mono-insaturados di-halogenados. O termo “alcenilo substituído” significa qualquer hidrocarboneto insaturado, substituído, linear ou ramificado, substituído com um ou mais grupos funcionais, estando incluídas na definição de “alquilo substituído” as amins secundárias de alcenilo C_2-C_6 linear, as amins secundárias com alcenilo C_2-C_6 substituídas e as amins terciárias de alcenilo C_2-C_6 lineares. O termo “alcenilo substituído” significa qualquer hidrocarboneto insaturado, substituído, linear ou ramificado. Os compostos cíclicos, tanto os hidrocarbonetos cíclicos insaturados como os compostos cíclicos possuindo heteroátomos, estão dentro do significado de “alcenilo.”

Conforme aqui utilizado, o termo "álcool" significa qualquer álcool saturado ou insaturado, linear ou ramificado, sendo preferidos os álcoois C_1-C_6 saturados, não substituídos, lineares, sendo preferidos e sendo muito preferidos os álcoois metílico, etílico, isobutílico e terc-butílico. Entre os álcoois saturados, substituídos, são preferidos os álcoois saturados C_1-C_6 mono- e dissustituídos. O termo "álcool" inclui álcoois de alquilo substituído e álcoois de alcenilo substituído.

Conforme aqui utilizado, o termo "arilo" abrange as expressões "arilo substituído", "heteroarilo" e "heteroarilo substituído", as quais se referem a anéis de hidrocarbonetos aromáticos, de um modo preferido, possuindo cinco ou seis átomos a constituir o anel. As expressões "heteroarilo" e "heteroarilo substituído" referem-se a anéis de hidrocarbonetos aromáticos, nos quais pelo menos um heteroátomo, por exemplo, um átomo de oxigénio, enxofre ou azoto, está no anel juntamente com pelo menos um átomo de carbono. "Arilo" em termos gerais e "arilo substituído" "heteroarilo" e "heteroarilo substituído" mais particularmente, referem-se a anéis de hidrocarbonetos aromáticos, de um modo preferido possuindo cinco ou seis átomos e de um modo muito preferido possuindo seis átomos a constituir o anel. O termo "arilo substituído" inclui arilos mono e polissustituídos, substituídos com, por exemplo, grupos alquilo, arilo, alcoxilo, azida, amina e amino. "Heteroarilo" e "heteroarilo substituído" se utilizados separadamente, referem-se de modo específico a anéis de hidrocarbonetos aromáticos, nos quais, pelo menos, um heteroátomo, por exemplo, átomo de oxigénio, enxofre ou azoto, está no anel juntamente com, pelo menos, um átomo de carbono.

Os termos "éter" e "alcoxilo" referem-se a qualquer éter saturado ou insaturado, substituído ou não substituído, linear ou ramificado, sendo preferidos os éteres C_1-C_6 não substituídos, saturados, lineares, sendo muito preferidos os éteres de dimetilo, dietilo, metil-isobutilo e metil-terc-butilo. Os termos "éter" e "alcoxilo" em termos gerais e "cicloalcoxilo" e "éter cíclico" mais em particular, referem-se a qualquer anel de hidrocarboneto não aromático, de um modo preferido possuindo cinco a doze átomos compreendendo o anel.

O termo "éster" refere-se a qualquer éster saturado ou insaturado, substituído ou não substituído, linear ou ramificado, sendo preferidos os ésteres C_1-C_6 não substituídos, saturados, lineares, sendo muito preferidos o éster de metilo e o éster de isobutilo.

O termo "sal farmaceuticamente aceitável", especialmente quando em referência a um sal farmaceuticamente aceitável do composto de Fórmula (I), refere-se a quaisquer sais farmaceuticamente aceitáveis de um composto e, de um modo preferido, refere-se a um sal de adição de ácido de um composto. Os exemplos preferidos de sal farmaceuticamente aceitável são sais de metal alcalino (sódio ou potássio), sais de metal alcalino-terroso (cálcio ou magnésio) ou sais de amónio derivados de amónia ou de aminas orgânicas farmaceuticamente aceitáveis, por exemplo, alquilamina C_1-C_7 , ciclo-hexilamina, trietanolamina, etilenodiamina ou tris-(hidroximetil)-aminometano. Relativamente aos compostos da invenção que são aminas básicas, os exemplos preferidos de sais farmaceuticamente aceitáveis são sais de adição de ácido de ácidos orgânicos ou inorgânicos farmaceuticamente aceitáveis, por exemplo, ácido hidro-hálico, sulfúrico, fosfórico ou ácido carboxílico ou

sulfônico alifático ou aromático, por exemplo ácido acético, succínico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, nicotínico, metanossulfônico, p-toluenossulfônico ou naftalenossulfônico. As composições farmacêuticas preferidas da presente invenção incluem sais farmaceuticamente aceitáveis do composto de Fórmula (II).

Os termos "purificado", "substancialmente purificado" e "isolado" como aqui utilizados referem-se ao composto da invenção que está livre de outros, compostos dissimilares com os quais o composto da presente invenção está, normalmente, associado no seu estado natural, de tal forma que o composto da invenção compreende, pelo menos, 0,5%, 1%, 5%, 10%, ou 20% e de um modo mais preferido, pelo menos, 50% ou 75% da massa em peso de uma dada amostra. Numa forma de realização preferida, estes termos referem-se ao composto da invenção compreendendo, pelo menos, 95% da massa em peso de uma dada amostra.

Os termos "anticancerígeno", "antitumoral" e "inibidor do crescimento de tumor", quando estão a modificar o termo "composto" e os termos "inibição" e "redução", quando estão a modificar os termos "composto" e/ou o termo "tumor", significam que a presença do composto em questão está correlacionada com, pelo menos, uma redução da taxa de crescimento do tumor ou da massa cancerosa. De um modo mais preferido, os termos "anticancerígeno", "antitumoral", "inibidor de crescimento de tumor", "inibição" e "redução" referem-se à correlação entre a presença do composto em questão e pelo menos a cessação temporária do crescimento do tumor ou crescimento da massa cancerosa. Os termos "anticancerígeno", "antitumoral", "inibidor de crescimento de tumor", "inibição" e "redução" também se referem, em particular na forma de realização muito preferida da

invenção, a uma correlação entre a presença do composto em questão e, pelo menos, uma redução temporária da *massa* do tumor. Estes termos referem-se ao cancro e diversos outros tipos de tumores malignos em animais, especificamente em mamíferos e, mais especificamente em humanos.

O termo “vermelhidão da pele” significa qualquer vermelhidão da pele, especialmente uma vermelhidão da pele crónica possuindo uma origem neurogénica, consistente com, mas que não está limitada pelo seu significado no documento EP 7744250.

O termo “infecção viral” significa qualquer infecção de uma origem viral incluindo rinovírus e de um modo preferido, mas não exclusivamente, refere-se ao vírus de imunodeficiência humana (HIV), citomegalovírus e vírus da hepatite A, hepatite B e hepatite C.

O termo “doença cardiovascular” refere-se a diversas doenças do coração e sistema vascular, incluindo mas não limitando a insuficiência cardíaca congestiva, disfunção cardíaca, lesão de reperfusão e diversas anomalias circulatórias periféricas conhecidas. “Doença cardiovascular” refere-se a tais doenças em animais, especificamente em mamíferos e, muito especificamente, em humanos.

Conforme aqui utilizado, o termo “diabetes” refere-se a diversas doenças relacionadas com níveis elevados de insulina, resistência à insulina ou diabetes, incluindo diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 e várias patologias relacionadas, incluindo, mas não limitando à síndrome de Stein-Levental ou Síndrome de Ovário Policístico (PCOS)

Conforme aqui utilizado, o termo “rejeição de transplante” refere-se aos estados e sintomas relacionados, conhecidas como rejeição de aloenxerto, rejeição de xenoenxerto e rejeição de autoenxerto e, em formas de realização preferidas da invenção, refere-se à rejeição de aloenxerto humano-humano.

Conforme aqui utilizados, os termos “modulador” ou “modulação” referem-se à capacidade de um composto ou régimen de tratamento para alterar a presença ou produção de um composto modulado, em especial o TNF- α ou a IL-1, num indivíduo. De um modo muito preferido, “modulador” ou “modulação” referem-se à capacidade de um composto ou régimen de tratamento para reduzir a presença ou produção de um composto modulado.

Conforme aqui utilizados, os termos TTL1, TTL2, TTL3, TTL4 e TTL5 referem-se a entidades químicas específicas identificadas na Figura 17, entre outras.

Interleucina-1 (IL-1)

A Interleucina-1 (IL-1) é um factor regulador o qual participa numa gama lata de mecanismos imunológicos e inflamatórios em mamíferos e noutros mecanismos defensivos, especialmente mecanismos no organismo humano. Ver, e. g., Dinarello, D.A., FASEB J., 2, 108 (1988). A IL-1, inicialmente descoberta como, produzida por macrófagos activados, é segregada por diversas células, por exemplo, fibroblastos, queratinócitos, células T, células B e astrócitos do cérebro e tem sido referida como possuindo diversas funções incluindo: estimulação da proliferação de células T CD4+, ver Mizel, S.B., Immunol. Rev.,

63, 51 (1982); estimulação do efeito assassino de células das células tímicas Tc através de sua ligação a uma célula T receptora, TCR, ver McConkey, D. J., et al., J. Biol. Chem., 265, 3009(1990); indução da produção de diversos materiais que participam nos mecanismos inflamatórios, por exemplo, PGE₂, fosfolipase A₂ (PLA₂) e colagenase, ver Dejana, E., et al., Bolid, 69, 695-699 (1987)); indução da produção de proteínas de fase aguda no fígado, ver Andus, T., et al., Eur. J. Immunol., 123, 2928 (1988)); aumento da tensão arterial no sistema vascular, ver Okusawa, S., et al., J. Clin. Invest., 81, 1162 (1988)); e indução da produção de outras citocinas, por exemplo, IL-6 e TNF- α , ver Dinarello, C. A., et al., J. Immunol., 139, 1902(1987). A modulação da IL-1 também tem efeito sobre a artrite reumática, ver Nouri, A. M., et al., Clin. Exp. Immunol., 58, 402(1984); rejeição de transplante, ver Mauri e Teppo, Transplantation, 45, 143 (1988); e septicemia, ver Cannon, J. G. et al., Lymphokine Res., 7, 457 (1988) e a IL-1 pode induzir febre e dor quando administrada em doses grandes. Ver Smith, J., et al., Am. Soc. Clin. Oncol. 9, 710 (1990)).

A ocorrência de septicemia, artrite, inflamações e estados relacionados em modelos animais pode ser reduzida inibindo a ligação da IL-1 aos seus receptores utilizando inibidores naturais do receptor da IL-1 (IL-1 Ra), ver Dinarello, C. A. e Thompson, R. C., Immunol. Today, 12, 404 (1991) e foram propostos determinados métodos para inibir a actividade da IL-1 utilizando anticorpos particulares, ver Giovine, D. E. S. e Duff, G. W., Immunol. Today 11, 13 (1990). No caso da IL-6, a proliferação de mielócitos num doente que sofria de mieloma, o qual é provocado por uma secreção excessiva de IL-6 foi eliminado utilizando anticorpos contra a IL-6 ou o receptor da IL-6, ver Suzuki, H., Eur. J. Immuno., 22, 1989(1992)). O estado de doença passível de

ser tratado de acordo com a invenção, através de modulação de TNF- α e IL-1 induzida pelos compostos da invenção, incluem mas não estão necessariamente limitadas aos estados de doença aqui descritos.

Factor- α de Necrose Tumoral (TNF- α)

O TNF- α humano foi purificado pela primeira vez em 1985, Ver Aggarwal, B. B.; Kohr, W. J. "Human tumor necrosis factor. Production, Purification and Characterization". J. Biol. 1985, 260, 2345-2354. Pouco depois foi efectuada a clonagem molecular do ADNC de TNF e a clonagem do local do TNF humano. Ver Pennica, D.; Nedwin, G. E.; Hayflick, J. S. et al. "Human necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin". Nature 1984, 312, 724-729, Wang, A. M.; Creasy, A. A.; Ladner, M. B., "Molecular cloning of the complementary DNA by human Tumor Necrosis Factor". Nature 1985, 313, 803-806. O TNF- α é um polipéptido trimérico de 17-KDa produzido principalmente por macrófagos. Este péptido é inicialmente expresso como uma proteína transmembrana de 26-KDa a partir da qual é clivada a subunidade de 17-KDa e libertada após clivagem proteolítica por uma enzima conhecida como TACE. Este trabalho clarificou as implicações biológicas imensas e multifacetadas do TNF- α e incrementou o desenvolvimento de abordagens terapêuticas possuindo como alvo sua produção excessiva.

O factor de necrose tumoral- α (TNF- α), é tipicamente produzido por diversas células, por exemplo, macrófagos e fibroblastos activados. O TNF- α foi descrito como sendo capaz de induzir a produção de IL-1, ver Dinarello, D.A., FASEB J., 2, 108 (1988), a morte de células de fibrossarcoma L929, ver

Espevik e Nissen-Meyer, J. Immunol. Methods, 95, 99 (1986); estimular a proliferação de fibroblastos, ver Sugarman, B. J., et al., Science, 230, 943(1985); induzir a produção de PGE₂ e ácido araquidónico, os quais podem estar ambos envolvidos nas respostas inflamatórias, ver Suttys, et al., Eur. J. Biochem., 195, 465 (1991); e induzir a produção de IL-6 ou outros factores de crescimento, ver Van Hinsbergh, et al., Blood, 72, 1467 (1988)). O TNF- α também foi referido como participando, directa ou indirectamente, em diversas doenças tais como doenças infecciosas transportadas por estirpes de tripanossoma do género *Plasmodium*., ver Cerami, A., et al., Immunol. Today, 9, 28 (1988)); doenças autoimunes, tais como lúpus eritematoso sistémico (SLE) e artrite, ver Fiers, W., FEBS, 285, 199 (1991); Síndrome da Imunodeficiência adquirida (SIDA), ver Mintz, M., et al., Am. J. Dis. Child. 143, 771 (1989); septicemia, ver Tracey, K. J., et al., Curr. Opin. Immunol., 1, 454 (1989); e determinados tipos de infecções, ver Balkwill, F. R., Cytokines in Cancer Therapy, Oxford University Press (1989)

TNF- α e Resposta Inflamatória

A infecção e lesão de tecidos induzem uma cascata de alterações bioquímicas que accionam um conjunto de reacções intrincadas do sistema imunológico, denominadas colectivamente como resposta inflamatória. A evolução desta resposta baseia-se, pelo menos em parte, na vasodilatação local ou aumento da permeabilidade vascular e activação do endotélio vascular, o qual permite que os glóbulos brancos do sangue circulem de uma maneira eficiente e migrem para o local danificado, aumentando desta forma a sua hipótese de se ligar e destruir quaisquer antigénios. Diz-se então que o endotélio vascular está activado

ou inflamado. Duma maneira geral, a inflamação é uma resposta imunológica bem-vinda para uma variedade de estímulos inesperados e, como tal, a mesma apresenta uma formação rápida e uma duração curta (inflamação aguda). No entanto, a sua actividade persistente ou não controlada (inflamação crónica) tem efeitos prejudiciais para o corpo e resulta na patogénese de várias doenças imunes, tais como: choque séptico, artrite reumática, doenças inflamatórias dos intestinos e insuficiência cardíaca congestiva. Ver "Tumor Necrosis Factors. The molecules and their emerging role in medicine" B. Beutier, Ed. Raven Press, NI, 1992, págs. 1-590

O desdobramento de uma resposta imunitária eficaz exige tipicamente o recrutamento de uma variedade de células e a orquestração de uma série de eventos biológicos. Esta complexa coordenação e interacção intercelular é mediada por um grupo de proteínas de baixo peso molecular localmente segregadas que são colectivamente denominadas por citocinas. Estas proteínas ligam-se a receptores específicos sobre a superfície da célula e accionam percursos de condução de sinal que no fim alteram a expressão génica em células-alvo, regulando desse modo uma resposta inflamatória eficaz.

As citocinas podem exhibir propriedades de pliotropismo (uma determinada proteína exerce efeitos diferentes sobre células diferentes), redundância (duas ou mais citocinas medeiam funções semelhantes), sinergismo (o efeito combinado de duas citocinas é maior que o efeito aditivo de cada proteína individual) e antagonismo (o efeito de uma citocina inibe o efeito de outra). Para este fim, algumas das citocinas são pró-inflamatórias (induzem a inflamação), enquanto algumas outras são anti-inflamatórias (inibem a inflamação). A classe de citocinas

pró-inflamatórias inclui: interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e factor de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Ver "Tumor Necrosis Factors. The molecules and its emerging role in medicine", 6, Beutler, Ed. Raven Press, NI, 1992, págs. 1-590. Estas citocinas são segregadas por macrófagos logo após a iniciação da resposta inflamatória e induzem a coagulação, aumentam a permeabilidade vascular e activam o termo de moléculas de adesão sobre as células endoteliais vasculares (por exemplo, o TNF- α estimula a expressão da selecção E, que se liga e recruta neutrófilos para o local da lesão). Subsequentemente e durante uma resposta imunológica mais sistémica, estas citocinas actuam sobre diversos órgãos do corpo, incluindo a medula óssea e o fígado para assegurar uma maior produção de glóbulos brancos e a síntese de hormonas apropriadas e proteínas de fase aguda. Adicionalmente, as mesmas actuam sobre o hipotálamo e induzem febre, a qual ajuda a inibir o crescimento de patogéneos e aumenta a reacção imunológica como um todo.

TNF- α e a Patogénese de Várias Doenças e Patologias

Como com qualquer outra citocina, o TNF- α não é completamente benéfico nem completamente destrutivo para o hospedeiro. Ao contrário, o equilíbrio da sua produção e regulação é mantido para assegurar que o hospedeiro possa reagir eficazmente aos microrganismos invasores sem comprometer a saúde do hospedeiro no processo. Sendo um mediador de inflamação, o TNF- α ajuda o organismo na sua luta contra as infecções bacterianas e lesões no tecido ao aumentar a resposta imunológica apropriada. No entanto, a sua produção excessiva leva a uma inflamação crónica, tem efeitos prejudiciais para o

organismo e tem um papel principal na patogénese de várias doenças, algumas das quais são resumidas a seguir.

Choque Séptico Bacteriano. Esta doença desenvolve-se tipicamente após infecção por determinadas bactérias gram-negativas, tais como *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* e *Neisseria meningitidis*. Estas bactérias suportam nas paredes de suas células determinados lipopolissacáridos (endotoxinas) que estimulam os macrófagos a produzir em excesso a IL-1 e o TNF- α , os quais, por sua vez, causam o choque séptico. Os sintomas deste estado, os quais são frequentemente fatais, incluem uma queda na tensão arterial, febre, diarreia e coagulação sanguínea disseminada. Somente nos Estados Unidos, este estado afecta aproximadamente, 500000 pessoas por ano e causa mais que 70000 mortes. O custo anual para o tratamento desta doença é estimado em 5-10 mil milhões de dólares.

Artrite Reumatóide. Esta é a mais comum das doenças autoimunes humanas afectando, aproximadamente, 1% da população ocidental e é uma fonte principal de incapacidade, além de que na sua forma mais grave leva à morte. Ver Szekanecz, Z.; Kosh, A. E.; Kunkel, L.; Strieter, R. M. "Cytokines in rheumatoid arthritis. Potential targets for pharmacological applications". Clinical Pharmacol. 1998, 12, 377-390, Camussi, G.; Lupin, E. "The future role of antitumor necrosis factor products in the treatment of rheumatoid arthritis". Drugs 1998, 55, 613-620. Esta patologia caracteriza-se por inflamação e proliferação celular da membrana sinovial, o que resulta na invasão da matriz de cartilagem adjacente, sua erosão subsequente e, no final, destruição do osso. Embora as origens desta resposta inflamatória sejam mal entendidas, uma maior expressão de TNF- α e IL-1, foi encontrada em torno da área de erosão da cartilagem.

Mais recentemente, o papel patogénico do TNF- α nesta doença tem sido extensivamente estudado e experimentalmente verificado. Adicionalmente, os dados clínicos sugerem que a neutralização do TNF- α pode ser uma abordagem terapêutica para reduzir o processo de erosão. No entanto, até à data, as terapias correntes, apesar de proporcionarem um alívio temporário não alteram os mecanismos fundamentais de progresso ou processo da doença.

Doenças inflamatórias do intestino e patologias relacionadas. Esta classe de doenças, a qual inclui a doença de Crohn e a colite ulcerativa são distúrbios debilitantes caracterizados por uma inflamação crónica da mucosa intestinal e da lâmina própria. Embora os eventos que accionam o seu aparecimento sejam desconhecidos, as mesmas estão associadas a uma infiltração significativa de leucócitos e produção local de mediadores solúveis. O TNF- α é por conseguinte considerado um mediador chave na patogénese destes estados, seja por uma acção citotóxica directa ou como um orquestrador da cascata inflamatória. Por exemplo, ver Armstrong, A. M.; Gardiner, K. R.; Kirk, S. J.; Halliday, M. J.,; Rowles, B. J. "Tumour necrosis factor and inflammatory bowel disease". Brit. J. Surgery 1997, 84, 1051-1058. Os dados baseados em modelos animais aceitáveis também suportam o raciocínio para um estudo terapêutico na IBD humana, voltado para a redução do efeito do TNF. Ver Van Deventer, S. J. H. "Tumour necrosis factor and Crohn's disease" Gut, 1997, 40, 443.

Insuficiência cardíaca congestiva. A activação de citocinas e, especialmente, do TNF- α , ocorre em doentes com insuficiência cardíaca crónica e enfarte agudo do miocárdio. Ver Ferrari, R. "Tumor necrosis factor in CHF: a double facet cytokine". Cardiovascular Res. 1998, 37, 554-559. Além disso foi

demonstrado que o TNF- α activa o processo apoptótico em miócitos cardíacos tanto directa (por ligação e reprogramação genética destas células) como indirectamente (através da produção local de NO, o que também leva à morte da célula)

Replicação de HIV. A replicação do HIV é activada pelo factor de transcrição indutível NF- κ B, o qual, por sua vez, é induzido pelo TNF- α . A expressão do HIV pode ser induzida pelo TNF em linhas de macrófagos e clones de células "T" infectados cronicamente com o vírus. A infusão de TNF recombinante num número pequeno de doentes com sarcoma de Kaposi associado à SIDA pareceu provocar um aumento no nível de antígeno HIV p24, um marcador da actividade replicativa viral. Ver "Therapeutic modulation of cytokines" CRC Press, Inc., N.I. 1996, págs. 221-236. Estes resultados proporcionam uma base mecanicista para a consideração da utilização de um bloqueador de TNF para reduzir a carga de HIV infeccioso.

Outras patologias mediadas pelo TNF. Existe uma lista cada vez maior de patologias para as quais existe alguma evidência sobre o envolvimento do TNF. Ver, "Therapeutic modulation of cytokines" CRC Press, Inc., N.I. 1996, págs. 221-236. Nalguns casos, tais como os transplantes, doenças do enxerto contra o hospedeiro e lesões por isquemia/reperfusão o mecanismo potencial da patogénese implica uma actividade pró-inflamatória do TNF- α para uma variedade de células de tecidos. Outras, tais como a supressão da resposta à insulina na diabetes não insulino dependente, estão relacionadas com acções mais selectivas do TNF- α que parecem estar fora do modelo pró-inflamatório comum. O TNF- α tem sido detectado localmente em doentes que sofrem de otite do ouvido médio (infecção do ouvido médio, com ou sem efusão), por exemplo, ver Willett, D.N.,

Rezaee, R.P., Billy, J.M., Tighe, M.A. e DeMaria, T.F., Ann. Rhinol Laryngol, 107 (1998); Maxwell, K., Leonard, G. e Kreutzer, D.L., Arch Otolaryngol Head Neck Surg, vol. 123, p. 984 (Sept. 1997) e com sinusite, *por exemplo*, ver Nonoyana, T., Harada, T., Shinogi, J., Yoshimura, E., Sakakura, Y., Auris Nasus Larynx, 27(1), 51-58 (Jan 2000); Buehring I., Friedrich B., Schaff, J., Schmidt H., Ahrens P., Zielen S., Clin Exp Immunol, 109(3), 468-472, Sept 1997).

Modulação de TNF- α e IL-1 Como Abordagens Terapêuticas

Antes do isolamento do TNF- α , as abordagens terapêuticas para as doenças acima tinham como alvo a redução da inflamação crónica e baseavam-se no tratamento anti-inflamatório esteróide e não esteróide. No entanto, a nossa compreensão recente do TNF- α levou ao desenvolvimento de estratégias alternativas com base na sua inibição selectiva. Estas estratégias gerais são resumidas a seguir.

Tratamento com esteróides. Este tratamento, o qual inclui a utilização de corticosteróides, provoca a redução no número e na actividade das células do sistema imunológico. O mecanismo de acção dos corticosteróides envolve a travessia da membrana do plasma e a ligação aos receptores no citosol. Os complexos resultantes são então transportados para o núcleo da célula onde estes se ligam a sequências reguladores de ADN específicas, regulando desse modo negativamente a produção de citocina. Embora presentemente utilizada, esta estratégia tem diversas desvantagens uma vez que a mesma não é específica para o TNF- α mas regula também negativamente diversas outras citocinas que podem ter funções importantes numa reacção imunológica eficaz.

Além disso, a utilização de esteróides também está associada ao desenvolvimento de cancro (por exemplo, cancro de próstata).

Tratamento anti-inflamatório não esteróide. Esta estratégia inclui a utilização de compostos tal como aspirina que reduzem indirectamente a inflamação. Isto é geralmente conseguido inibindo o percurso da ciclooxygenase através do qual são produzidos as prostaglandinas e os tromboxanos. Esta acção reduz a permeabilidade vascular e proporciona um alívio temporário. Para esta finalidade, esta estratégia não regula a produção de citocinas e tem pouco ou nenhum efeito em doenças associadas com inflamação crónica.

Anticorpos monoclonais anti-TNF manipulados. Esta estratégia envolve a selecção de anticorpos monoclonais que são capazes de se ligar e neutralizar o TNF- α . Embora os estudos clínicos preliminares tenham mostrado alguns resultados positivos, esta abordagem ainda está na sua infância e não é geralmente aceite. Um dos problemas a ser solucionado é que os anticorpos monoclonais são de origem murídea e nos humanos induzem respostas imunológicas anti-imunoglobulina, o que limita a sua utilização clínica. Estão a ser pesquisadas técnicas de engenharia recombinante para criar versões “humanizadas” dos anticorpos de roedores que mantenham a actividade contra o TNF- α e que sejam mais facilmente aceites pelo sistema imunológico humano.

Utilização de receptores solúveis de TNF- α . A utilização de receptores solúveis contra o TNF- α é uma nova abordagem terapêutica. Embora estes receptores sejam criados para se ligar e neutralizar o TNF- α , eles também aumentam a sua actividade ao prolongar a sua vida útil na circulação sanguínea. Além disso, a

resposta imunológica de longa duração para este tipo de tratamento está a ser avaliada.

Terapia génica. O objectivo desta abordagem é reduzir a inflamação não pela redução da expressão do TNF- α mas pelo aumento da produção local de citocinas anti-inflamatórias. O tratamento consiste na injeção directa de vectores de expressão de ADNc que codifica citocinas anti-inflamatórias na área inflamada, o que poderia antagonizar o efeito do TNF. A eficácia deste método está, presentemente, sob investigação em estudos pré-clínicos e os seus efeitos a longo prazo na resposta imunológica permanecem desconhecidos.

Outras doenças e patologias relacionadas. Adicionalmente, o TNF- α e/ou a IL-1 foram mais recentemente identificados como participando na modulação do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) angiogénico, ver E. M. Paleolog et al., *Arthritis & Rheumatism*, 41, 1258 (1998) e pode participar na pleurisia tuberculosa, pleurisia reumatóide e outras doenças imunes, ver T. Söderblom, *Eur. Respir. J.*, 9, 1652 (1996). Também foi referido que o TNF- α afecta a expressão de determinados genes de células cancerosas em relação à proteína associada à resistência a múltiplos fármacos (MRP) e à proteína de resistência de pulmão (LRP), ver V. Stein, *J. Nat. Canc. Inst.*, 89, 807 (1997) e participa na insuficiência cardíaca crónica e congestiva e doenças cardiovasculares relacionadas, ver, por exemplo, R. Ferrari, *Cardiovascular Res.*, 37, 554 (1998); C. Ceconi et al., *Prog. Cardiovascular Dis.*, 41, 25 (1998) e na infecção viral mediada directa ou indirectamente, ver D.K. Biswas, et al., *J. Acquired Immune Defic Syndr. Hum Retrovirol.*, 18, 426-34 (1998) (replicação de HIV-1); R. LeNauor, et al., *Res. Virol.*, 145, 199-207 (1994) (mesmo); T.

Harrer, et al., J. Acquir. Immune Defic. Syndr., 6, 865-71 (1993) (mesmo); E. Fietz, et al., Transplantation, 58 (6), 675-80 (1994) (regulação do citomegalovírus humano (CMV)); D.F. Zhang, et al., Chin. Med. J., 106, 335-38 (1993) (infecção pelo HCV e HBV). Além disso, também se demonstrou que os antagonistas de TNF- α são úteis no tratamento de vermelhidão da pele de origem neurogénica. Ver Patente Europeia EPO-774250-B1 (de De Lacharriere et al.).

O TNF- α também foi identificado como sendo expresso em níveis mais elevados em humanos diagnosticados como obesos ou exibindo resistência à insulina e desta forma, é um modulador da diabetes. Ver Hotamisligil, G., Arner, P., Atkinson, R., Spiegelman, 8, (1995), "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in human obesity and insulin resistance. J. Clin. Invest. 95:2409-2415. O TNF- α também foi identificado como um modulador importante da rejeição de transplantes. Ver Imagawa, D., Millis, J., Olthoff, K., Derus, L., Chia, D., Sugich, L., Ozawa, M., Dempsey, R., Iwaki, Y., Levy, P., Terasaki, P., Busuttil, R. (1990) "The role of tumor necrosis factor in allograft rejection" Transplantation, vol. 50, N° 2, 219-225.

Estas observações destacam a importância e a vontade de identificar novas estratégias e/ou novos compostos e classes de compostos que influenciem selectivamente a produção de TNF- α e/ou IL-1. Moléculas pequenas que inibam selectivamente estas citocinas são, portanto, particularmente importantes sob o ponto de vista da medicina e biologia para, por exemplo, manter um sistema imunitário activo e no tratamento de doenças baseadas em inflamação.

Métodos de Síntese Preferidos da Presente Invenção

Determinadas formas de realização da presente invenção incluem novos métodos de preparação dos compostos possuindo a estrutura química de Fórmula (II), bem como novos métodos de preparação de análogos conhecidos dos compostos conhecidos possuindo a estrutura química de Fórmula (II), por exemplo, os compostos de Fórmulas (I) e (IA).

Os compostos da presente invenção e, especificamente, os compostos possuindo a estrutura química de Fórmula (II), podem ser preparados sinteticamente ou semi-sinteticamente. Se preparados sinteticamente, podem utilizar-se materiais de partida geralmente disponíveis, incluindo, mas não limitado a compostos bicíclicos possuindo unidades halogeneto reactivas. Os compostos da presente invenção com, pelo menos, três anéis podem ser sintetizados de acordo com as várias reacções de fecho de anel. Tais reacções incluem, mas não se limitam à reacção de Diels-Alder e à reacção de condensação de Dieckmann. A reacção de Diels-Alder envolve, de um modo preferido, a reacção de um dieno com uma unidade alcenilo substituída, de acordo com o que se forma o terceiro anel do composto desejado. A reacção de condensação de Dieckmann pode ser, de um modo preferido, seguida da redução da unidade ciclocetona resultante. Os compostos da presente invenção podem ser purificados e isolados, seguindo tais métodos de síntese e outros métodos de síntese bem conhecidos, através da utilização de processos, tais cromatografia ou HPLC, como é conhecido dos especialistas na técnica.

Alternativamente, os compostos possuindo a estrutura química de Fórmulas (I) e (IA) e determinados análogos específicos e seus derivados, podem ser extraídos e isolados, pelo menos, na forma de um extracto em bruto compreendendo ácido acantóico, a partir da casca da raiz de *Acantopanax koreanum Nakai*. Um tal extracto pode, de um modo preferido, ser produzido de acordo com o método seguinte:

Aproximadamente um quilograma de casca de raiz seca de *A. koreanum Nakai* é obtido, cortado em pedaços e coberto com entre 1 L até 3 L e de um modo preferido 2 L, de um solvente adequado, de um modo muito preferido metanol. Esta mistura é mantida a uma temperatura que vai desde 20 °C até 60 °C e pode ser mantida à temperatura ambiente durante, pelo menos, 10 horas e, de um modo preferido, durante 12 horas. A mistura é então filtrada para remover e reter o filtrado. Este processo é repetido, de um modo preferido, pelo menos, mais duas vezes e o filtrado combinado é concentrado a pressão reduzida para originar um extracto.

Aproximadamente, 100 gramas do extracto é partilhado com 200 mL até 400 mL, de um modo preferido, 300 mL de uma solução aquosa, de um modo preferido, água e 200 mL a 400 mL, de um modo preferido 300 mL, de uma solução orgânica, de um modo preferido éter dietílico. A fracção orgânica é separada da mistura e concentrada em seguida sob pressão reduzida para se obter um extracto adicional. O referido extracto adicional é purificado, de um modo preferido por cromatografia em coluna e de um modo ainda mais preferido, através da utilização de uma coluna de sílica gel, utilizando uma mistura de solventes orgânicos adequados, de um modo preferido, hexano e acetato de etilo como um eluente para se obter ácido acantóico isolado.

Este composto isolado de Fórmulas (I) e (IA) pode ser depois modificado sinteticamente para proporcionar determinados compostos, especificamente os compostos possuindo a estrutura química de Fórmula (II). Por exemplo, os análogos de éster em R_1 do ácido acantóico podem ser preparados de acordo com uma adição nucleófila catalisada por ácido de um álcool alquílico à unidade de ácido carboxílico do ácido acantóico. Os análogos de éter em R_1 do ácido acantóico podem ser preparados a partir de halogenetos ou álcoois de alquilo primário segundo a síntese de Éter de Williamson ou através da redução de uma unidade de álcool primário. Os análogos de alquilo, alcenilo e alcoólicos em R_{10} do ácido acantóico podem ser preparados através da hidrogenação catalítica do grupo alcenilo, ou através da adição electrófila, de um modo preferido, de HCl ou HBr ou outros halogenetos de alquilo adequados. Os análogos de substituição noutras posições R do ácido acantóico podem ser preparados por reacções de substituição envolvendo halogenetos de alquilo, desde que sejam utilizados os grupos reactivos adequados e grupos de protecção relacionados para encorajar a reacção desejada. De acordo com esta reacção e outras reacções de síntese bem conhecidas, a produção de toda a gama de compostos da presente invenção, determinada pela descrição aqui proporcionada daqueles compostos, está dentro do conhecimento dos especialistas na técnica.

As abordagens totalmente sintéticas de preparação dos compostos, incluindo os compostos das Fórmulas gerais (I), (IA), (II), são aqui descritas. Esta síntese inclui uma ou mais análises retro-sintéticas do ácido acantóico e os seus análogos, as sínteses de ácido acantóico marcado radioactivamente e os seus análogos e sínteses de dímeros e

conjugados dos compostos das Fórmulas gerais (I), (IA), (II). Os especialistas na técnica também compreenderão que estas abordagens são também completamente aplicáveis à preparação de ácido cauranóico e os seus análogos.

O Composto de Fórmula (I) e os seus Análogos Naturais

A casca da raiz de *Acantopanax koreanurn* Nakai (Araliaceae), a qual é endémica da ilha de Cheju, República da Coreia, tem sido utilizada tradicionalmente como um tónico e um sedativo, bem como um remédio para o tratamento de reumatismo e diabetes. Durante a investigação desta medicina popular, Chung e os seus colaboradores identificaram a partir dos seus extractos farmacologicamente activos, dois novos diterpenos ricíclicos: o ácido acantóico (Composto 1) e seu éster metílico (Composto 2), conforme representado na Figura 1. Ver Kim, Y. H.; chung, B. S.; Sankawa, U. "Pimaradiene diterpenes from *Acantopax Koreanum*". J. Nat. Prod. 1988, 51, 1080-1083. O ácido acantóico é um pimarano (**3**). No entanto, em nítido contraste com outros membros da família dos pimaranos, **1** distingue-se por uma relação estereoquímica invulgar entre os centros C8 e C10 que proporciona um modo único de conectividade do sistema de anéis BC.

Antes desta invenção, não existia nenhuma síntese completa para a produção do composto químico possuindo a estrutura de Fórmula (I) ou os seus análogos. Ainda mais importante, a estrutura química de Fórmula (I), **1**, (Figura 1) possui um perfil biológico como um agente anti-inflamatório. Mais especificamente, estudos *in vitro* com monócitos/macrófagos activados (inflamados) revelaram que o tratamento com **1**

(aproximadamente, 0,1 até, aproximadamente, 1,0 micrograma/mL durante 48 horas) resulta numa inibição de, aproximadamente, 90% da produção de TNF- α e IL-1. Esta inibição foi dependente da concentração e específica para a citocina, uma vez que nas mesmas condições a produção de IL-6 ou IFN- γ (interferão-gama) não foi afectada. Os efeitos *in vivo* do ácido acantóico foram avaliados em ratos que sofriam de silicose (inflamação crónica do pulmão) e cirrose (inflamação do fígado e fibrose hepática). A análise histológica revelou que o tratamento com o composto 1 resultou numa substancial redução de granulomas fibróticos e numa recuperação significativa das células de fígado cirróticas. Estes resultados extraordinários podem ser atribuídos, pelo menos parcialmente, à inibição de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1, mediadas por **1**. O composto **1** também apresenta uma toxicidade muito baixa em ratos e apenas após administração oral a concentração elevada (LD>300 mg/100 g de peso corporal). Ver Kang, H.-S.; Kim, Y.-H. Lee, C.-S.; Lee, J.-J.; Choi, I.; Pyun, K.-H., *Cellular Immunol.* 1996, 170, 212-221. Kang, H.-S.; Song, H. K.; Lee, J.-J.; Pyun, K.-H.; Choi, I., *Mediators Inflamm.* 1998, 7, 257-259.

Assim a estrutura química de Fórmula (I) tem efeitos anti-inflamatório e anti-fibrótico potentes e reduz a expressão de TNF- α e IL-1, O ácido acantóico é assim utilizado como um protótipo químico para o desenvolvimento dos novos compostos da invenção.

Análise Retro-sintética dos Compostos de Fórmulas (I), (II)

Os compostos de Fórmulas (I), (II) e, de um modo muito preferido, o composto de Fórmula (I) e os compostos designados por TTL1, TTL2, TTL3 e TTL4 aqui, podem ser sintetizados. As desconexões das ligações dos compostos de Fórmulas (I) são mostradas na Figura 2. O novo arranjo estrutural dos anéis BC e a presença do centro quaternário C13 constituem um motivo invulgar e levam a uma nova estratégia, a qual é um aspecto da presente invenção. Este motivo é fixado, numa etapa, na estereoquímica desejada utilizando-se uma metodologia de Diels-Alder. Um dieno, por exemplo, **14** e um dienófilo, tal como **15** (Y: auxiliar à base de oxazolidinona), foram identificados como os materiais de partida apropriados para uma reacção de Diels-Alder *endo* selectiva. Para se garantir adicionalmente o resultado regioquímico desejado desta cicloadição, o dieno **14** foi funcionalizado transitoriamente com um heteroátomo (por exemplo, X = OTBS ou SPh), o qual será subseqüentemente removido do produto **13**. A preferência *endo* geralmente observada desta reacção foi utilizada para prever a relação estereoquímica entre os centros C12 e C13 como se mostra no produto **13**, enquanto a selectividade diastereofacial do processo será controlada por um auxiliar quiral no centro carbonilo do dienófilo ou pela utilização de um catalisador quiral. Ver Xiang, A. X.; Watson, D. A.; Ling. T.; Theodorakis, E. A. "Total Synthesis of Clerocidin via a Novel, Enantioselective Hornoallenylboration Methodology". J. Org. Chem. 1998, 63, 6774-6775.

O dieno **14** pode ser preparado por uma construção catalisada com paládio (0) da ligação C8-C11, revelando a cetona **16** como o seu progenitor sintético. Esta cetona foi preparada a partir da conhecida cetona de Wieland-Miescher (**17**), a qual, por sua vez,

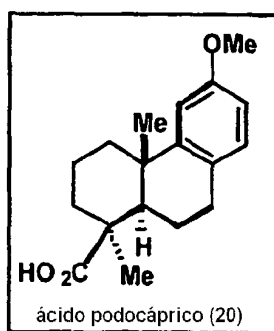
era facilmente preparada pela condensação de metilvinilcetona (**19**) com 2-metil-1,3-ciclo-hexanodiona (**18**) (Figura 2).

Num aspecto da invenção, reconhece-se que as funcionalidades e a estereoquímica relativa do sistema de anel AB de ácido acantóico (**1**) são semelhantes àsquelas na estrutura do ácido podocáprico (**20**). Ver "The total synthesis of natural products". ApSinion, Ed.; John Wiley & Sons, Inc., 1973, Volume 8, págs. 1-243. Entre as diversas estratégias sintéticas em direcção a **20**, os pontos principais daquelas que podem ser relevantes à síntese proposta de **1** são mostrados na Figura 5. Estas abordagens permitiram prever o resultado estereoquímico da síntese dos compostos de Fórmulas (I), (II) e o contrário estereoquímico dos compostos que são aqui designados por TTL1, TTL2, TTL3 e TTL4.

Síntese Completa dos Compostos das Fórmulas (I), (II)

A etapa inicial da síntese do ácido acantóico (**1**) e de todos os compostos das Fórmulas (I) e (II) envolve a reacção de uma cetona de Wieland-Miesher (**17**). Este composto era facilmente preparado a partir dos compostos **18** e **19** como um enantiómero único por uma sequência de adição de Michael/anelação de Robinson, utilizando quantidades catalisadoras de (R)-prolina. A protecção selectiva do grupo carbonilo C9 mais básico de **17**, seguida de uma alquilação redutiva da enona **34** com cianoformato de metilo deu origem ao cetoéster **36**. A transformação de **36** em **39** foi baseada em estudos anteriores, ver Welch, S. C.; Hagan, C. P. "A new stereoselective method for developing ring A of podocapric acid compounds" Synthetic Commun. 1972, 2, 221-225, como representado na Figura 3. A redução da funcionalidade éster

de **39**, seguida da sililação do álcool resultante e a desprotecção catalisada por ácido da unidade cetál proporcionou em seguida a cetona **40**. A conversão de **40** no dieno desejado **42** foi conseguida por uma sequência de duas etapas envolvendo a transformação de **40** no seu correspondente derivado de triflato do enol, seguida do acoplamento catalisado por paládio com estanano **41** de vinilo, Ver Farine, V.; Hauck, S. I.; Firestone, R. A. "Synthesis of cepheids bearing olefinic sulfoxide side chains as potential β -lactamase inhibitors" *Bioorg. & Medicinal Chem. Lett.* 1996, 6, 1613-1618.



As etapas que foram utilizadas na conclusão da síntese do ácido acantóico (1) e são utilizadas na realização da síntese dos compostos de Fórmulas (I) e (II) estão representadas na Figura 5, como Esquema 2. Uma cicloadição de Diels-Alder entre o dieno **42** e o dienófilo **43**, seguida da dessulfuração reductiva com Ni de Raney produz os sistemas tricíclicos **44** com a estereoquímica desejada. A transformação de **44** na amida de Weinreb, seguida de redução com aldeído gerado por DIBALH **45**, o qual após reacção de Wittig deu origem à olefina **46**. A dessililação induzida por fluoreto de **46**, seguida de oxidação em duas etapas do álcool resultante ao ácido carboxílico produziu o ácido acantóico (1) e pode ser utilizada para produzir os

compostos de Fórmulas (I), (II) por substituição apropriada dos intermediários.

Uma etapa importante na síntese dos compostos de Fórmulas (I) e (IA) e dos compostos de Fórmulas (II), (IIA) é a reacção de Diels-Alder. Esta reacção e a utilização e selecção de um ou mais dienos e/ou dienófilos adequadamente substituídos permite a síntese selectiva de compostos de Fórmula (II). Por exemplo, pode utilizar-se os seguintes dienófilos preferidos no lugar dos dienófilos, por exemplo, o composto **43** e pimarano (**103**), conforme ilustrado aqui a seguir, por exemplo, nas Figuras 5, 7, 8, 21 e 23, como Esquemas Reacionais 2, 3, 4, 5 e 6, para produzir selectivamente compostos de Fórmula (II).

Adicionalmente, a conformação electrónica do dieno, por exemplo composto (**42**) e composto (**112**), como aqui ilustrada, por exemplo, nas Figuras 5, 7, 8, 21 e 23, como Esquemas Reacionais 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente, pode ser alterada pela ligação covalente de um grupo dador de electrões ou atractor de electrões, por exemplo, pHS, para o dieno. Como aqui exemplificado, um tal grupo dador de electrões ou atractor de electrões afecta a orientação do dienófilo de entrada.

Assim, de acordo com um aspecto da presente invenção, a natureza quiral do dieno **42** permite que o mesmo seja utilizado para induzir assimetria durante a cicloadição. A análise de um modelo minimizado de **42** indica que o metilo angular em C10 influencia a selectividade facial da reacção e permite uma aproximação mais eficiente do dienófilo pela face superior do dieno. Esta aproximação também permite o desenvolvimento de uma variante assimétrica catalítica da reacção de Diels-Alder. Os benefícios da utilização de um catalisador quiral, em oposição a

auxiliares quirais, são óbvios e estão bem documentados na literatura recente.

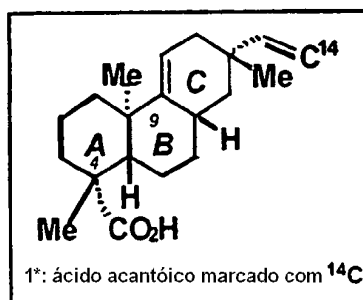
Uma forma de realização preferida da presente invenção é a utilização do catalisador **49**, que foi desenvolvido e aplicado por Corey a uma síntese assimétrica aperfeiçoada de cassiol (Esquema 3). Ver Corey, E. J.; Imai, N.; Zhang, H.-Y. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 3611. Foi demonstrado que o composto **49** permite uma cicloadição de Diels-Alder de um dieno **47** electronicamente rico com metacroleína (**48**) e produz exclusivamente o produto de adição *endo* com um rendimento e excesso enantiomérico excelente (83% de rendimento, 97% de ee).

A aplicação da metodologia acima à presente síntese está ilustrada na Figura 8, como Esquema 4. A utilização do catalisador **49** proporcionou uma versatilidade adicional e reduziu, significativamente, a quantidade total de etapas necessárias para conclusão da síntese total de 1.

Síntese de Compostos Marcados Radioativamente de Fórmula (I)

Uma amostra marcada radioativamente de um composto de Fórmulas (I), (II) pode ser sintetizada e é útil em estudos farmacológicos e farmacocinéticos, por exemplo, incorpora-se um carbono metilénico marcado com ^{14}C no composto de Fórmula (I), utilizando o aldeído **52** como um material de partida (conforme ilustrado na Figura 4, Esquema 4). O rendimento de marcado como C14, necessário para a química de Wittig, é preparado em duas etapas a partir de iodometano marcado como C14 e trifenilfosfina, seguido de tratamento com uma base, tal como

NaHMDS. A desprotecção induzida por base do éster metílico produz um composto marcado radioactivamente de Fórmulas (I), (II).



Objectivos da Síntese dos Compostos de Fórmula (II)

Um aspecto da presente invenção é a identificação de novos fármacos anti-inflamatórios possuindo a estrutura dos compostos de Fórmula (II). O rastreio biológico dos intermediários sintéticos e dos compostos de Fórmula (II) racionalmente concebidos proporciona informação e orienta os requisitos de concepção.

A concepção e síntese de análogos dos compostos de Fórmula (II) baseia-se nos objectivos seguintes: (a) definir os requisitos estruturais e funcionais mínimos dos compostos de Fórmula (II) que são responsáveis pela modulação da actividade do TNF- α e IL-1 (farmacóforo mínimo); (b) melhorar a actividade de modulação do TNF- α e IL-1 dos compostos de Fórmula (II) alterando a estrutura, particularmente os grupos R do farmacóforo mínimo (por exemplo, estudos SAR e experiências de reconhecimento molecular); (c) examinar o modo de acção dos compostos de Fórmula (II) por estudos de identificação de fotoafinidade; (d) modificar e melhorar a solubilidade e

permeabilidade de membrana dos compostos de Fórmula (II) (e) sintetizar e estudar dímeros ou conjugados dos compostos de Fórmula (II); unidades de distribuição selectivas e (f) reconceber e refinar a estrutura alvo através da avaliação dos dados biológicos obtidos.

De particular significância para o desenho racional dos novos compostos de Fórmula (II) são os relatórios recentes que modificam os anéis A e C do ácido oleanólico (53), como ilustrado na Figura 9, que conduzem a uma melhor actividade antiproliferativa e anti-inflamatória. Ver Honda, T.; Rounds, B. V.; Gribble, G. W.; Suh, N.; Wang, Y.; Sporn, M. B. "Design and synthesis of 2-ciano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-oic acid, a novel and highly active inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophages" *Biorg. & Medic. Chem. Lett.* 1998, 8, 2711-2714. Suh, N. et al. 'A novel synthetic oleanane triterpenoid, 2-ciano--3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid, with potent differentiating, antiproliferative and anti-inflammatory activity" *Cancer Res.* 1999, 59, 336-341. Mais especificamente, estudos SAR com derivados comercialmente disponíveis **53** e derivados semi-sintéticos destes levaram ao reconhecimento que: (a) a ligação de grupos atractores de electrões, tal como nitrilo, na posição C2 aumenta a potência biológica de **53** (Figura 9); (b) uma funcionalidade cetona α,β -insaturada no anel C é um forte melhorador da potência. A combinação destes observações levou à semi-síntese de um triterpenóide designado **54** (Figura 9), que se mostrou ser 500 vezes mais activo que qualquer outro triterpenóide conhecido na supressão das enzimas inflamatórias iNOS (sintase indutível de óxido nítrico) e COX-2 (ciclooxigenase-2) (Figura 9).

Síntese dos compostos de fórmulas (II)

A síntese em treze etapas dos compostos de Fórmulas (II) (conforme mostrada nas Figuras 4 e 8, Esquemas 1 e 4, respectivamente) é eficiente e como tal, permite a preparação de uma variedade de análogos úteis em estudos SAR. A significância biológica do desdobramento tricíclico invulgar dos compostos de Fórmulas (II) (o epímero C8 é construído utilizando o catalisador de Diels-Alder apropriado). Os locais que são facilmente alterados através da abordagem sintética da presente invenção ou por modificações correntes dos presentes intermediários sintéticos são mostrados na Figura 10 e exemplos representativos dos compostos de Fórmula (II) são mostrados na Figura 11.

O desdobramento químico desejado dos compostos de Fórmula (II) também podem ser incorporados em suportes sólidos, tais como, por exemplo, uma resina de Wang. Isto permite a construção fácil de bibliotecas combinatórias dos compostos de Fórmula (II). Além disso, de acordo com a presente invenção, os moduladores de TNF- α e IL-1 preferidos podem ser mais rapidamente identificados e rastreados que actualmente possível.

Estudos de marcação por fotoafinidade. A cadeia principal dos compostos de Fórmula (II) é, também, de um modo preferido marcada com um reticulante reactivo, que é útil em estudos de marcação por fotoafinidade. Estes estudos ajudam na identificação do alvo *in vivo* dos compostos de Fórmula (II) e proporcionam conhecimentos fundamentais sobre o modo de acção do ácido acantóico e sobre a activação de TNF- α . O ácido carboxílico C 19 ou o aldeído C 15 (precursor de 1) são úteis

em experiências de reticulação com os reagentes fotossensíveis apropriados (ver 60 e 61, Figura 12).

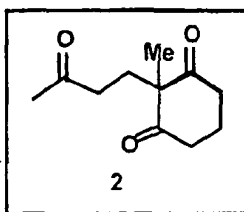
Síntese de dímeros e conjugados dos compostos de Fórmula (II)

As formas diméricas dos compostos de Fórmula (II), tal como, por exemplo, **62** (n=1), foram isoladas de fontes naturais e, adicionalmente, o conjugado dexametasona-ácido acantóico **63** proporciona resultados biologicamente interessantes para um fármaco que tenha como alvo um receptor de esteróide com implicações potenciais na pesquisa do cancro. Ver Chamy, M. C.; Piovano, M.; Garbarino, J. A; Mirea, C.; Vicente, G. *Phytochemistry* 1990, 9, 2943-2946. Enquanto nenhuns estudos biológicos desta classe de compostos foram realizados, de acordo com a presente invenção, os análogos diméricos de Fórmula (II), (IIA) e (IIB) são avaliados. Utiliza-se ácido acantóico sintético ou análogos bioactivos de 1 como parceiros monoméricos e o seu acoplamento é realizado utilizando técnicas correntes, incluindo as aqui descritas.

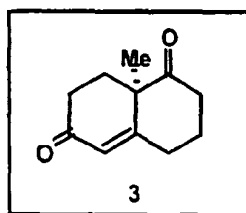
Técnicas Experimentais

Todas as reacções foram realizadas sob uma atmosfera de argon em solventes recentemente destilados, anidros, em condições anidras, a menos que indicado em contrário. Destilou-se tetra-hidrofurano (THF) e éter dietílico (Et₂O) a partir de sódio/benzofenona; diclorometano (CH₂Cl₂), hexametilfosforamida (HMPA) e tolueno de hidreto de cálcio; e dimetilformamida (DMF) de cloreto de cálcio. Os rendimentos referem-se a materiais

cromatográfica e espectroscopicamente (RMN de ^1H) homogêneos, a menos que indicado em contrário. Os reagentes adquiridos eram da qualidade comercial mais alta e utilizados sem qualquer purificação adicional, a menos que indicado em contrário. As reacções foram seguidas por cromatografia em camada fina realizada sobre placas de sílica gel E. Merck de 0,25 mm (60F-254), utilizando luz UV como agente de visualização e ácido fosfomolibdico etanólico a 7%, ou uma solução de p-anisaldeído e calor como agentes de desenvolvimento. Sílica gel E. Merck (60, tamanho de partícula 0,040-0,063 mm) foi utilizada para cromatografia flash. As separações de cromatografia em camada fina foram realizadas sobre placas de sílica gel 0,25 ou 0,50 mm E. Merck (60F-254). Os espectros de RMN foram registados em instrumentos Varian 400 e/ou 500 MHz e calibrados utilizando solvente residual não deuterado como uma referência interna. Utilizou-se as seguintes abreviaturas para explicar as multiplicidades: s = singuleto; d = duplete, t = triplete; q = quarteto, m = múltiplo, b = largo. Os espectros de IV foram registados num espectrómetro Nicolet Avatar 320 FT-IR. As rotações ópticas foram registadas num polarímetro Perkin Elmer 241. O espectro de massa de alta resolução (HRMS) foi registado num espectrómetro de massa VG 7070 HS sob condições de ionização química (CI) ou num espectrómetro de massa VG ZAB-ZSE sob condições de bombardeamento com átomos rápidos (FAB).

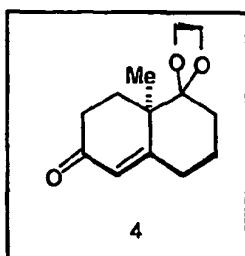


Tricetona 2. Uma solução de dicetona 1 (50 g, 0,40 mol) em acetato de etilo (500 mL) foi tratada com trietilamina (72 mL, 0,52 mol) e metilvinilcetona (36 mL, 0,44 mol). A mistura reaccional foi submetida a refluxo a 70 °C durante 10 h e, então, arrefecida até 25 °C. O solvente foi removido sob pressão e o material resultante em bruto foi cromatografado directamente (10-40% de éter em hexanos) para proporcionar a tricetona **2** (61 g, 0,31 mol, 78%). **2**: óleo incolor; $R_f = 0,25$ (sílica, 50% de éter em hexanos); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,75-2,59 (m, 4H), 2,34 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz), 2,10 (s, 3H), 2,07-2,05 (m, 3H), 1,98-1,94 (m, 1H), 1,24 (s, 3H).



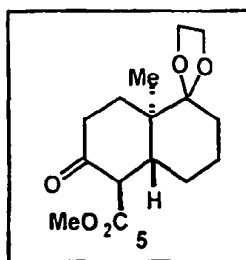
Cetona de Wieland-Miescher (3). Uma solução de tricetona 2 (61 g, 0,31 mol) em sulfóxido de dimetilo (400 mL) foi tratada com D-prolina finamente triturada (1,7 g, 0,01 mol). A solução foi agitada a 25 °C durante 4 dias e agitada em seguida a 40 °C durante mais 1 dia. A solução de cor púrpura resultante foi arrefecida até 25 °C, diluída com água (300 mL) e solução aquosa saturada de cloreto de sódio (100 mL) e vertida para uma ampola de decantação. A mistura foi extraída com éter etílico (3 x 800 mL). As camadas orgânicas foram concentradas (sem secagem) e submetidas a cromatografia (10-40% de éter em hexanos) para proporcionar 59 g de um óleo de cor avermelhada-violeta em bruto. O material foi novamente submetido a cromatografia (10-40% de éter em hexanos) e concentrada para proporcionar 57 g de um óleo amarelo. O óleo foi dissolvido em

éter etílico (400 mL) e mantido a 4 °C durante 30 min, após o que se adicionou uma camada de hexanos (100 mL) sobre a parte superior do éter. A solução com duas camadas foi adicionada com alguns cristais e colocada no interior de um congelador (-28 °C) dum dia para o outro. Os cristais resultantes foram recolhidos por filtração, enxaguados com hexanos gelados (2 × 100 mL) e secos sob pressão. A concentração das águas-mãe proporcionou uma outra colheita e a combinação dos cristais proporcionou a cetona de Wiele-Miescher (3) (43 g, 0,24 mol, 78%). 3: cristais castanhos-amarelados; 0,25 (sílica, 50% de éter em hexanos); $[\alpha]_D^{25} -80,0$ (c = 1, C₆H₆); RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,85 (s, 1H), 2,72-2,66 (m, 2H), 2,51-2,42 (m, 4H), 2,14-2,10 (m, 3H), 1,71-1,68 (m, 1H), 1,44 (s, 3H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 210,7, 198,0, 165,6, 125,7, 50,6, 37,7, 33,7, 31,8, 29,7, 23,4, 23,0.



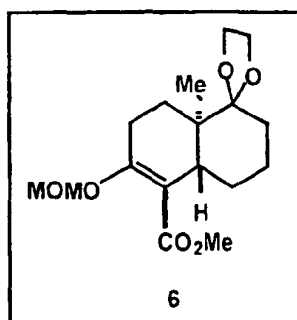
Acetal 4. Uma solução de cetona **3** (43 g, 0,24 mol) em benzeno (700 mL) foi tratada com ácido p-toluenossulfónico (4,6 g, 0,024 mol) e etilenoglicol (15 mL, 0,27 mol). A reacção foi submetida a refluxo com um aparelho Dean-Stark e condensada a 120 °C. Uma vez concluída a recolha de água no aparelho de Dean-Stark, a reacção estava completa (aprox. 4 h). Quando se deixava a reacção por períodos de tempo mais prolongados tendeu a escurecer a mistura reaccional e a reduzir o rendimento final. A reacção foi arrefecida até 25 °C, desactivada com trietilamina

(5 mL, 0,036 mol) e vertida para uma ampola de decantação contendo água (300 mL) e bicarbonato de sódio saturado (200 mL). A mistura resultante foi então extraída com éter (3 × 800 mL). As camadas orgânicas foram combinadas, secas com MgSO_4 , concentradas e submetidas a cromatografia (10-40% de éter em hexanos) para proporcionar o acetal **4** (48, 0,22 mol, 90%). **4**: óleo amarelo; $R_f = 0,30$ (sílica, 50% éter em hexanos); $[\alpha]_D^{25}$: -77 ($c = 1$, C_6H_6); IV (película) ν_{max} 2943, 2790, 1667, 1450, 1325, 1250; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,80 (s, 1H), 3,98-3,93 (m, 4H), 2,43-2,35 (m, 3H), 2,34-2,20 (m, 3H), 1,94-1,82 (m, 1H), 1,78-1,60 (m, 3H), 1,34 (s, 3H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) 198,9, 167,5, 125,5, 112,2, 65,4, 65,1, 45,1, 34,0, 31,5, 30,1, 26,9, 21,8, 20,6.



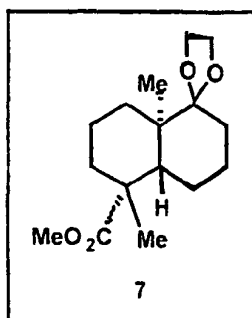
Cetoéster 5. Uma solução de lítio (0,72 g, 0,10 mol) em amoníaco líquido (400 mL) a -78 °C foi tratada gota a gota com uma solução de acetal **4** (10 g, 0,045 mol) e álcool *terc*-butílico (3,7 mL, 0,045 mol) em éter (40 mL). A mistura azul resultante foi deixada aquecer e agitada a refluxo (-33 °C) durante 15 min e arrefecida em seguida novamente até -78 °C. Uma quantidade suficiente de isopreno (aprox. 8 mL) foi adicionada gota a gota para eliminar a cor azul residual da mistura reaccional. A reacção foi então aquecida num banho de água (50 °C) e o amoníaco rapidamente evaporado sob uma corrente de azoto seco. O éter restante foi removido sob pressão para deixar uma espuma

branca. Após mais 5 min sob alto vácuo, a atmosfera de azoto foi restaurada e o enolato de lítio foi suspenso em éter seco (150 mL) e arrefecido até $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cianofornato de metilo (4,0 mL, 0,050 mol) foi, então, adicionado e a reacção agitada durante 40 min a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. A reacção foi aquecida a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e agitada durante mais 1 h. Água (300 mL) e éter (200 mL) foram adicionados e a mistura vertida para uma ampola de decantação contendo cloreto de sódio saturado (100 mL). Após separar a camada orgânica, a fase aquosa foi extraída com éter ($2 \times 400\text{ mL}$). As camadas orgânicas combinadas foram secas com MgSO_4 , concentradas e submetidas a cromatografia (10-40% de éter em hexanos) para proporcionar o cetoéster **5** (7,0 g, 0,025 mol, 55%). **5**: precipitado em pó branco; $R_f = 0,40$ (sílica, 50% de éter em hexanos); $[\alpha]_D^{25}$: $-2,9$ ($c = 1$, C_6H_6). IV (película) ν_{max} 2943, 1746, 1700; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,00 3,96 (m, 2H), 3,95-3,86 (m, 2H), 3,74 (s, 3H), 3,23 (d, 1H, $J = 13,2\text{ Hz}$), 2,50-2,42 (m, 3H), 2,05-1,92 (m, 1H), 1,79-1,50 (m, 5H), 1,32-1,28 (m, 2H), 1,21 (s, 3H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 205,4, 170,0, 111,9, 65,2, 65,1, 59,9, 52,0, 43,7, 41,6, 37,5, 30,3, 29,8, 26,2, 22,5, 14,0; HRMS, calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{Na}^+$) 305,1359, encontrado 305,1354.



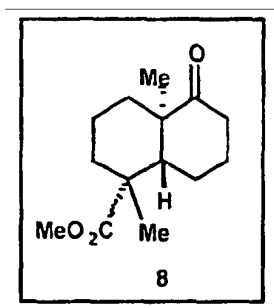
Éster 6. Uma solução de cetoéster **5** (7,0 g, 0,025 mol) em HMPA (50 mL) foi tratada com hidreto de sódio (0,71 g, 0,030

mol). Após agitação durante 3 h a 25 °C, a mistura reaccional amarela-castanha resultante foi desactivada com éter clorometílico e metílico (2,3 mL, 0,030 mol) e a reacção deixada em agitação durante mais 2 h a 25 °C. A mistura amarela-castanha resultante foi, então, vertida para uma ampola de decantação contendo gelo-água (100 mL), bicarbonato de sódio saturado (50 mL) e éter (200 mL). Após as camadas se terem separado, a camada aquosa foi extraída com éter (3 × 200 mL). Os extractos de éter reunidos foram secos com MgSO₄, concentrados e submetidos a cromatografia (sílica, 10-40% de éter em hexanos) para proporcionar o éster **6** (7,7 g, 0,024 mol, 95%). **6**: óleo amarelo; $R_f = 0,45$ (sílica, 50% de éter em hexanos); $[\alpha]_D^{25}$: +26,3 ($c = 1$, C₆H₆); IV (película) ν_{\max} 2951, 1728, 1690, 1430, 1170; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,89 (dd, 2H, $J = 22,8, 6,4$ Hz), 3,93-3,91 (m, 2H), 3,90-3,84 (m, 2H), 3,69 (s, 3H), 3,40 (a, 3H), 2,72-2,68 (m, 1H), 2,24 (s, 1, 2H), 1,80-1,42 (m, 4H), 1,37-1,15 (m, 2H), 0,960 (s, 3H), 0,95-0,80 (m, 2H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) 167,8, 150,5, 115,8, 112,1, 93,0, 65,2, 5 65,1, 56,3, 51,3, 40,7, 40,3, 30,3, 26,4, 23,6, 22,9, 22,3, 13,9; HRMS, calculado para C₁₇H₂₆O₆ (M+Na⁺) 349,1622, encontrado 349,1621,

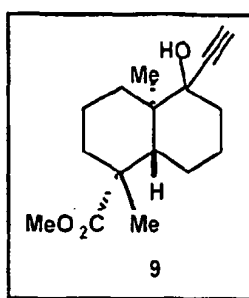


Acetal 7. Uma solução de lítio (1,1 g, 0,17 mol) em amoníaco líquido (400 mL) a -78 °C foi tratada gota a gota com uma solução do éster **6** (7,7 g, 0,024 mol) em 1,2-DME (30 mL). A

mistura reaccional azul foi deixada aquecer e agitada a refluxo (-33 °C) durante 20 min. A mistura reaccional foi então novamente arrefecida até -78 °C e rapidamente desactivada com iodometano em excesso (15 mL, 0,24 mol). A pasta branca resultante foi deixada em agitação a refluxo (-33 °C) durante 1 h, após o que a reacção foi aquecida em banho-maria (50 °C) com agitação durante 1 h, deixando a amónia a evaporar. A mistura reaccional foi desactivada com água (100 mL), bicarbonato de sódio (100 mL) e éter (200 mL) e vertida para uma ampola de decantação. Depois das camadas se terem separado, extraiu-se a camada aquosa com éter (3 × 200 mL). Os extractos de éter combinados foram secos com MgSO₄, concentrados e submetidos a cromatografia (sílica, 10-30% de éter em hexanos) para proporcionar o acetal **7** (4,1 g, 0,014 mol, 61%). **7**: óleo amarelo semi-cristalino; R_f = 0,80 (sílica, 50% éter em hexanos); [α]_D²⁵: ±16,9 (c=10, C₆H₆); IV (película) 2934, 1728, 1466, 1379, 1283, 1125, 942; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,95-3,80 (m, 4H), 3,64 (s, 3H), 2,17-2,15 (m, 1H), 1,84-1,37 (m, 11H), 1,16 (s, 3H), 1,05-1,00 (m, 1H), 0,87 (s, 3H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 177,7, 112,9, 65,2, 64,9, 51,2, 44,0, 43,7, 38,1, 30,7, 30,3, 28,8, 23,4, 19,1, 14,7; HRMS, calculado para C₁₆H₂₆O₄ (M+H⁺) 283,1904, encontrado 283,1904.

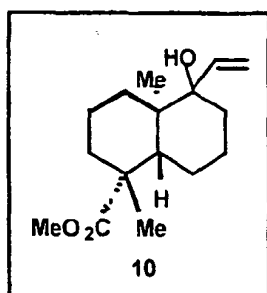


Cetona 8. Uma solução de acetal 7 (4,1 g, 0,014 mol) em THF (50 mL) foi tratada com HCl 1 M gota a gota (aprox. 15 mL) a 25 °C com agitação. A reacção foi monitorizada por cromatografia em camada fina e neutralizada com bicarbonato de sódio (30 mL) após o que o desapareceu o material de partida. A mistura resultante foi vertida para uma ampola de decantação contendo água (100 mL) e éter (100 mL). Depois das camadas se terem separado, a camada aquosa foi extraída com éter (3 × 100 mL). Os extractos de éter reunidos foram secos com MgSO₄, concentrados e submetidos a cromatografia (sílica, 10-20% de éter em hexanos) para proporcionar a cetona **8** (3,3 g, 0,014 mol, 95%). **8**: cristais brancos; $R_f = 0,70$ (sílica, 50% de éter em hexanos); $[\alpha]_D^{25}$: +3,5 ($c = 1,0$, C₆H₆); IV (película) ν_{\max} 2943, 1728, 1449, 1239, 1143, 1095, 985; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,62 (s, 3H), 2,55–2,45 (m, 1H), 2,92–1,95 (m, 5H), 1,8–1,6 (m, 2H), 1,50–1,30 (m, 4H), 1,14 (s, 3H), 0,98–0,96 (m, 1H), 0,90 (s, 3H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 214,8, 177,0, 54,4, 51,3, 49,3, 44,2, 37,9, 37,7, 33,1, 28,6, 26,4, 22,8, 18,8, 17,0; HRMS, calculado para C₁₄H₂₂O₃ (M+Na⁺) 261,1461, encontrado 261,1482.

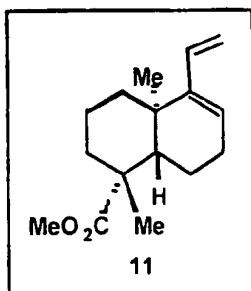


Alcino 9. Uma solução de cetona **8** (2,0 g, 8,3 mmol) em éter (50 mL) foi tratada com acetileto de lítio (0,40 g, 13 mmol). A reacção foi agitada a 25 °C durante 1 h e, então, desactivada com bicarbonato de sódio (20 mL) e água (30 mL). A mistura foi

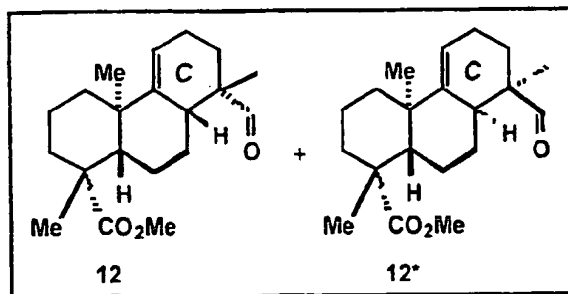
vertida para o interior de uma ampola de decantação e as camadas foram separadas. A camada aquosa foi extraída com éter (3 × 50 mL). As camadas orgânicas foram reunidas, secas com MgSO_4 , concentradas e submetidas a cromatografia (sílica, 10-30% de éter em hexanos) para proporcionar o alcino **9** (2,0 g, 7,6 mmol, 90%) **9**: sólido branco; $R_f = 0,65$ (sílica, 50% de éter em hexanos); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) 3,64 (s, 3H), 2,56 (s, 1H), 2,18-2,10 (m, 1H), 1,92-1,40 (m, 12H), 1,18 (s, 3H), 1,17-1,01 (m, 1H), 0,81 (s, 3H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) 177,6, 86,8, 76,5, 75,0, 51,2, 50,5, 43,9, 52,5, 37,9, 35,3, 33,4, 28,8, 23,5, 22,5, 19,1, 11,5; HRMS, calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+-\text{H}_2\text{O}$) 247,1693, encontrado 247,1697.



Alceno 10. Uma solução do alcino **9** (0,50 g, 1,9 mmol) em 1,4-dioxano (20 mL) e piridina (2 mL) foi tratada com catalisador de Lindlar (100 mg). A mistura foi hidrogenada sob pressão (30 lbs/in²) durante 7 min. A mistura reaccional foi então diluída com éter (10 mL), filtrada através de uma almofada de celite e lavada com éter (2 × 50 mL). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida para proporcionar o alceno **10** (0,48 g, 1,8 mmol, 95%). **10**: óleo incolor; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 6,58 (dd, 1H), 5,39 (d, 1H), 5,14 (d, 1H), 3,64 (s, 3H), 2,20-2,11 (m, 2H), 1,93-1,65 (m, 4H), 1,61 (s, 2H), 1,52-1,25 (m, 4H), 1,19 (s, 3H), 1,17-0,90 (m, 2H), 0,89 (s, 3H).

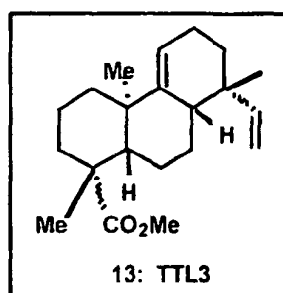


Dieno 11. Uma solução do alceno **10** (0,48 g, 1,8 mmol) em benzeno (80 mL) e THF (20 mL) foi tratada com eterato de trifluoreto de boro (1 mL, 7,9 mmol) e a mistura reaccional foi submetida a refluxo a 100 °C durante 5 h. Depois de arrefecer, a reacção foi desactivada com NaOH 1 N (1 mL, 26 mmol) e a mistura foi vertida para uma ampola de decantação contendo água (100 mL) e éter (100 mL). Após a separação das camadas, a camada aquosa foi extraída com éter (3 × 100 mL). As camadas orgânicas foram combinadas, secas com MgSO₄, concentradas e submetidas a cromatografia (sílica, 5% de éter em hexanos) para proporcionar o dieno **11** (0,42 g, 1,7 mmol, 95%). **11**: óleo incolor; R_f = 0,95 (sílica, 50% de éter em hexanos); RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,26-6,23 (dd, 1H), 5,70 (s, 1H), 5,253 (d, 1H, J = 19,2 Hz), 4,91 (d, 1H, J = 12,8 Hz), 3,64 (s, 3H), 2,22-2,12 (m, 2H), 2,10-1,94 (m, 2H) 1,92-1,67 (m, 3H), 1,60-1,44 (m, 3H), 1,378 (d, 1H, J = 13,6), 1,21 (s, 1H), 1,19-1,00 (m, 2H), 0,86 (s, 3H); RMN de ¹³C (100 4Hz, CDCl₃) δ 177,7, 146,7, 136,1, 121,9, 113,3, 53,0, 51,2, 5 43,9, 38,0, 37,9, 37,4, 28,5, 27,8, 20,5, 19,5, 18,3.



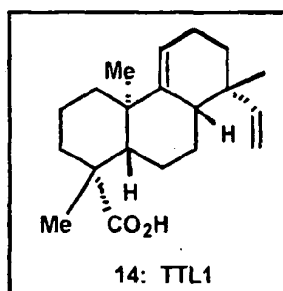
Aldeído 12. Uma solução de metacroleína (0,5 mL, 5,2 mmol) e dieno **11** (0,1 g, 0,40 mmol) foi agitada durante 8 h a 25 °C sob condições normais. O excesso de metacroleína foi então eliminado a pressão reduzida. O produto em bruto foi submetido a cromatografia (sílica, 10-20% de éter em hexanos) para proporcionar os aldeídos **12** e **12*** (0,13 g, 0,40 mmol, 100%) como uma mistura de diastereómeros (3:1-4:1 proporção a em C13). **12** e **12***: óleo incolor; $R_f = 0,55$ (sílica, 25% de éter em hexanos); **12**: IV (película) ν_{\max} 3441, 2936, 1726, 1451, 1233, 1152; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 9,70 (s, 1H), 5,58 (m, 1H), 3,62 (s, 3H), 2,38-2,25 (m, 1H), 2,21-2,18 (m, 1H), 2,17-1,98 (m, 4H), 1,96-1,62 (m, EH), 1,61-1,58 (m, 1H), 1,57-1,43 (m, 2H), 1,40-1,23 (m, 1H), 1,17 (s, 3H), 1,04 (s, 3H), 0,92 (s, 3H); ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 207,6, 20 177,7, 148,3, 188,6, 51,3, 47,8, 47,0, 44,2, 41,2, 39,3, 38,8, 38,1, 29,5, 28,4, 22,9, 22,5, 21,8, 20,6, 20,5, 19,7; **12***: $[\alpha]_D^{25}$: +36,8 ($c = 0,7$, C_6H_6); IV (película) ν_{\max} 3441, 2936, 1726, 1451, 1233, 1152; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 9,64 (s, 1H), 5,42 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 2,29-2,10 (m, 4H), 2,09-1,84 (m, 4H), 1,81-1,77 (m, 2H), 1,75-1,63 (m, 2H), 1,62-1,58 (m, 2H), 1,57- 1,45 (m, 1H), 1,43 (s, 1H), 1,13 (s, 3H), 1,03 (s, 3H), 0,87 (s, 3H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 207,3, 177,5, 147,4, 114,6, 55,8, 51,3, 47,3, 44,5, 40,7, 40,4, 38,4, 37,5, 31,5, 28,6, 25,0, 24,2, 5 21,9, 19,9, 19,6, 18,7.

A forma preferida de purificação dos aldeídos diastereoméricos consiste em reduzi-los com boro-hidreto de sódio em MeOH e separar os álcoois. O composto principal (diastereómero superior) pode ser, depois, oxidado ao aldeído **12** desejado após tratamento com periodinano de Dess-Martin.



Alceno 13 (TTL3). Uma solução de brometo de (metil) trifenilfosfônio (357 mg, 10 mmol) em THF (40 mL) foi tratada com NaHMDS 1 M em THF (0,86 mL, 0,86 mmol). A mistura amarela resultante foi deixada em agitação a 25 °C durante 30 min. Após este tempo, a solução do aldeído **12** (91 mg, 0,29 mmol) em THF (10 mL) foi adicionada à reacção via cânula. A mistura reaccional foi agitada a 25 °C durante 8 horas e, em seguida desactivada com bicarbonato de sódio (30 mL) e água (20 mL). A mistura foi vertida para uma ampola de decantação contendo éter (50 mL). Após a separação das camadas, a camada aquosa foi extraída com éter (3 × 50 mL). As camadas orgânicas foram combinadas, secas com MgSO₄, condensadas e submetidas a cromatografia (sílica, 10% de éter em hexanos) para proporcionar o alceno **13** (84 mg, 0,28 mmol, 97%). **13:** óleo incolor; R_f = 075 (sílica, 25% de éter em hexanos); **13:** RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,96 (dd, 1H, J = 16,8, 11,6 Hz), 5,50 (m, 1H), 4,98 (m, 2H), 3,62 (s, 3H), 2,20-2,11 (m, 1H), 2,10-1,91 (m, 4H), 1,90-1,70

(m, 4H), 1,69–1,51 (m, 3H), 1,50–1,38 (m, 3H), 1,36–1,24 (m, 1H), 1,17 (s, 3H), 1,04 (s, 3H), 0,90 (s, 3H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 177,9, 149,1, 143,8, 117,9, 111,7, 51,2, 47,7, 44,4, 41,4, 41,2, 38,9, 38,3, 37,7, 34,8, 30,4, 28,4, 24,8, 23,1, 22,3, 22,2, 20,6, 19,8.



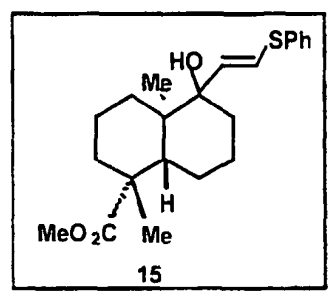
Ácido 14 (TTL1). Uma solução de alceno **13** (84 mg, 0,28 mmol) em sulfóxido de dimetilo (20 mL) foi tratada com LiBr (121 mg, 1,4 mmol). A mistura reaccional foi submetida a refluxo a 180 °C durante 2 dias. Depois de arrefecer, a reacção foi diluída com água (30 mL) e extraída com éter (3 × 50 mL). As camadas orgânicas foram combinadas, secas com MgSO_4 , concentradas e submetidas a cromatografia (sílica, 30% de éter em hexanos) para proporcionar ácido carboxílico **14** (TTL1) (78 mg, 0,26 mmol.). **14**: sólido branco; R_f = 0,30 (sílica, 30% de éter em hexanos); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,96 (dd, 1H, J = 14,4, 9,6 Hz), 5,52 (m, 1H), 4,98–4,95 (m, 2H), 2,20–1,72 (m, 10H), 1,64–1,58 (m, 3H), 1,57–1,37 (m, 4H), 1,22 (s, 3H), 1,04 (s, 3H), 0,99 (s, 3H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 182,9, 149,3, 143,9, 118,1, 111,9, 47,5, 44,2, 41,3, 41,2, 38,9, 38,0, 37,6, 34,8, 28,4, 24,7, 23,0, 22,4, 21,9, 20,3, 19,5.

Preparação de $\text{Ph}_3\text{P}=\text{}^{14}\text{CH}_2$.

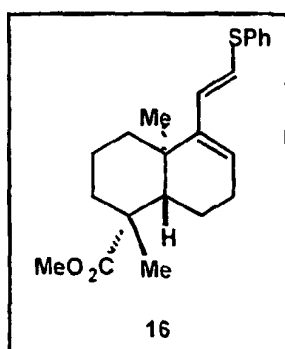
Trifenilfosfina (0,16 g, 0,61 mmol) foi adicionada a um balão de reacção de 15 mL e seca dum dia para o outro sob vácuo a 25 °C. A este balão foram adicionados 2 mL de THF (seco e degaseificado sob vácuo), seguido de $^{14}\text{CH}_3\text{I}$ (50 mCi, 53 mCi/mmol, 0,9 mmol) dissolvido em 1 mL de THF e a mistura foi agitada durante 24 horas na presença de árgon. Adicionou-se então hexametildissililamida de potássio (2,5 mL, 1,25 mmol, 0,5 M em tolueno) e mistura vermelho-amarelada foi deixada em agitação durante 3 h a 25 °C.

Reacção de Wittig com $\text{Ph}_3\text{P}=\text{}^{14}\text{CH}_2$.

A mistura acima foi arrefecida até -78 °C e tratada com o aldeído **12** (63 mg, 0,2 mmol) em THF seco (1,5 mL). A mistura foi deixada aquecer lentamente a 25 °C, agitada durante 8 h e desactivada com bicarbonato de sódio (10 mL) e água (10 mL). A mistura foi extraída com éter (3 × 50 mL) e as camadas orgânicas foram combinadas, secas com MgSO_4 , condensadas e submetidas a cromatografia sobre sílica gel (sílica, 10% de éter em hexanos) para proporcionar o alceno **13**.

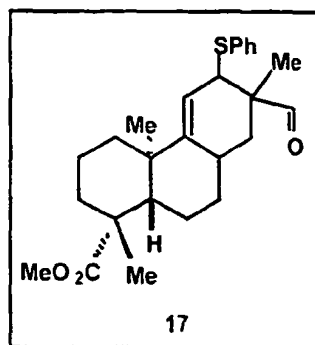


Álcool 15. Uma solução do alcino **9** (1,10 g, 4,2 mmol), tiofenol (1,37 g, 12,4 mmol) e 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN, 34,5 mg, 0,21 mol) em xileno (25 mL) foi agitada a 110 °C (na presença de árgon) durante 18 h. A mistura reaccional foi arrefecida até 25 °C e desactivada com bicarbonato de sódio aquoso saturado (50 mL). A camada orgânica foi extraída com éter etílico (3 × 50 mL), recolhida, seca (MgSO₄), concentrada e o resíduo foi cromatografado (sílica, 2-5 % de éter etílico em hexano) para proporcionar álcool 15 (1,35 g, 3,6 mmol, 85,7%); **15**: líquido incolor; R_f = 0,51 (sílica, 5% éter etílico em hexanos); [α]_D²⁵: +24,20 (c = 1,0, benzeno); IV (película) ν_{max} 2946,8, 1724,5, 1472,6, 1438,4, 1153,5, 740,0, 690,9; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,20-7,60 (m, 5H), 5,23 (d, 1H, J = 10,5 Hz), 5,12 (d, 1H, J = 10,0 Hz), 3,62 (s, 3H), 2,08-2,24 (m, 2H), 1,16-1,92 (m, 9H), 1,09 (s, 3H), 0,86-1,02 (m, 2H), 0,68 (s, 3H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 177,8, 151,7, 133,9, 133,7, 128,8, 127,9, 118,2, 54,9, 53,5, 51,1, 44,3, 40,4, 38,1, 37,3, 28,7, 27,7, 25,5, 23,5, 19,5, 18,5.



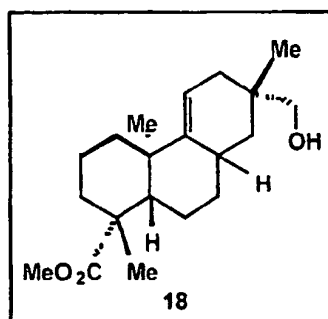
Dieno 16. Uma solução de álcool **15** (1,10 g, 2,94 mmol) em hexametilfosforamida (HMPA, 10 mL) foi adicionado, gota a gota, oxicloreto fósforo (0,50 g, 3,3 mmol) e a mistura foi agitada a 25 °C até ficar transparente. Piridina (0,26 mL, 3,23 mmol) foi

então adicionada e a mistura foi agitada a 150 °C (na presença de árgon) durante 18 h. A mistura reaccional foi arrefecida até 25 °C e desactivada com bicarbonato de sódio aquoso saturado (50 mL). A camada orgânica foi extraída com éter etílico (3 × 60 mL), recolhida, seca (MgSO₄) e concentrada e o resíduo foi cromatografado (sílica, 2-5% de éter etílico em hexano) para proporcionar o dieno **16** (0,85 g, 2,38 mmol, 81%); **16**: líquido incolor; $R_f = 0,60$ (sílica, 5% de éter etílico em hexanos); $[\alpha]_D^{25}$: 17,30 ($c = 1,08$, benzeno); IV (película) 2957,0, 1726,6, 1581,6, 1478,3, 1439,0, 1234,7, 1190,8, 1094,8, 1024,4, 739,1; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,20-7,60 (m, 5H), 6,43 (d, 1H, $J = 15,0$ Hz), 6,36 (d, 1H, $J = 14,5$ Hz), 5,72 (m, 1H), 3,64 (s, 3H), 1,48-2,32 (m, 10H), 1,43 (s, 3H), 1,21 (s, 3H), 1,05 (m, 1H), 0,88 (s, 3H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 177,9, 133,7, 129,1, 128,9, 128,6, 127,5, 126,2, 123,4, 120,9, 52,8, 51,1, 43,7, 37,7, 37,3, 30,2, 28,3, 27,7, 20,1, 19,3, 18,3.



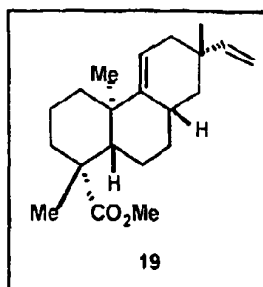
Aldeído 17. A uma solução de dieno **16** (0,51 g, 1,43 mmol) e metacroleína (0,30 g, 4,30 mmol) em diclorometano (5 mL) a -20 °C foi adicionado, na presença de árgon, gota a gota cloreto de estanho (IV) (0,29 mL de solução 1 M em diclorometano, 0,29 mmol). As misturas resultantes foram aquecidas a 0 °C no período de 1 h e agitada a 0 °C durante 18 h. A reacção foi

desactivada com bicarbonato de sódio aquoso saturado (15 mL) e a camada orgânica foi extraída com éter etílico (3 × 20 mL). As camadas orgânicas reunidas foram secas (MgSO₄) e concentradas e o resíduo foi cromatografado (sílica, 10-15 % de éter etílico em hexano) para proporcionar o aldeído **17** (0,51 g, 1,19 mmol, 83,7%); 4: líquido incolor; $R_f = 0,48$ (sílica, 10% de éter etílico em hexanos); $[\alpha]_D^{25}$: +30,0 ($c = 1,13$, benzeno); IV (película) ν_{\max} 2930,8, 2871,4, 1724,9, 1458,4, 1226,4, 1149,8; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 9,51 (s, 1H), 7,20-7,60 (m, 5H), 5,57 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 1,20-2,32 (m, 15H), 1,17 (s, 3H), 1,05 (s, 3H), 0,91 (s, 3H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 203,6, 177,9, 153,7, 133,6, 133,5, 128,9, 127,8, 117,1, 51,3, 49,1, 47,7, 44,2, 41,6, 38,7, 38,1, 31,2, 28,3, 27,8, 26,9, 21,7, 20,2, 19,3, 18,6.



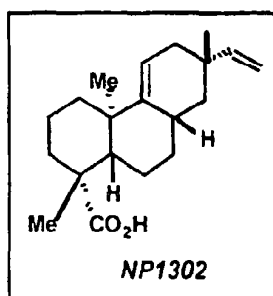
Álcool 18. A uma solução de aldeído **17** (0,50 g, 1,17 mmol) em etanol anidro (5 mL) adicionou-se em porções boro-hidreto de sódio (50 mg, 1,32 mmol) e a mistura foi agitada durante 30 min. Bicarbonato de sódio aquoso saturado (10 mL) foi, então, adicionado e a mistura foi extraída com éter etílico (3 × 20 mL). A camada orgânica foi recolhida, seca (MgSO₄) e concentrada. O resíduo foi redissolvido em tetra-hidrofurano (5 mL) e tratado com excesso de Níquel de Raney sob árgon a 65 °C durante 15 min.

A mistura reaccional foi filtrada e o filtrado foi seco (MgSO_4) e concentrado e o resíduo foi cromatografado (sílica, 2-5 % de éter etílico em hexano) para proporcionar o álcool **18** como um composto principal (0,21 g, 0,65 mmol, rendimento global 56,1%. Nota: o rendimento global para as duas reacções acima é de 91%); **18**: líquido incolor; $R_f = 0,39$ (sílica, 30% de éter etílico em hexanos); $[\alpha]_D^{25}$: -6,70 ($c = 1,0$, benzeno); IV (película) v_{max} 3436,8, 2929,0, 2872,2, 1728,1, 1433,9, 1260,6, 1029,7, 801,6; RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 5,37 (m, 1H), 3,62 (s, 3H), 2,28 (s 1, 1H), 2,06-2,20 (m, 2H), 1,20-2,00 (m, 12H), 1,16 (s, 3H), 0,99 (m, 1H), 0,86 (s, 3H), 0,84 (s, 3H); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 178,2, 150,4, 116,4, 73,6, 51,2, 47,9, 44,2, 41,9, 38,8, 38,2, 34,3, 33,9, 28,3, 28,2, 27,8, 22,1, 20,3, 20,1, 18,9.



Alcenol 19. A uma solução de álcool **18** (20,0 mg, 0,062 mmol) em diclorometano (2 mL) adicionou-se periodinano de Dess-Martin (35 mg, 0,08 mmol) em unidades e a mistura foi agitada a 25 °C durante 30 min. A reacção foi desactivada com bicarbonato de sódio aquoso saturado (5 mL) e extraída com éter etílico (3 × 10 mL). A camada orgânica foi recolhida, seca (MgSO_4) e concentrada. O resíduo foi redissolvido em tetra-hidrofurano (0,5 mL) e adicionado na presença de árgon a uma suspensão amarela de brometo de (metil)trifenil-fosfónio (60 mg,

0,17 mmol) e bis(trimetilsilil)amida de sódio (0,14 mL de 1,0 M em THF) em THF (1,5 mL). Após agitação a 25 °C durante 18 h a mistura foi diluída com bicarbonato de sódio aquoso saturado (5 mL) e extraída com éter etílico (3 × 10 mL). A camada orgânica foi recolhida, seca (MgSO₄), concentrada e o resíduo foi cromatografado (sílica, 2-5% de éter etílico em hexano) para proporcionar o alceno **19** (16,8 mg, 0,05 mmol, o rendimento global para as duas reacções acima é de 86%); **19**: líquido incolor; $R_f = 0,74$ (sílica, 5% de éter etílico em hexanos); $[\alpha]^{25}_D$: -14,40 (c = 0,50, benzeno); IV (película) ν_{max} 2929,5, 2873,4, 1726,8, 1637,7, 1460,7, 1376,8, 1225,1, 1150,4, 997,8, 903,7; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 5,82 (dd, 1H), 5,39 (m, 1H), 4,85-4,94 (dd, 2H), 3,64 (s, 3H), 2,30 (s 1, 1H), 2,14 (m, 1H), 2,02 (m, 1H), 1,80-1,98 (m, 2H), 1,68-1,80 (m, 2H), 1,20-1,68 (m, 7H), 1,18 (s, 3H), 0,96-1,08 (m, 2H), 0,95 (s, 3H), 0,88 (s, 3H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 178,3, 150,4, 125,6, 116,6, 109,2, 51,2, 47,9, 44,3, 41,9, 41,8, 38,3, 38,2, 37,4, 34,8, 30,2, 29,6, 28,6, 28,4, 27,8, 22,1, 20,4, 19,0.



Composto de Fórmula (I). A uma solução de alceno **19** (16,8 mg, 0,05 mmol) em N,N-dimetilformamida (2 mL) foi adicionado brometo de lítio (5,0 mg, 0,06 mmol) e a mistura foi submetida a refluxo a 190 °C durante 1 h. A mistura reaccional foi então arrefecida até 25 °C, diluída com H₂O (5 mL) e extraída

com acetato de etilo (3 × 10 mL). A camada orgânica foi recolhida, seca (MgSO₄) e concentrada e o resíduo foi cromatografado (sílica, 15-20% de éter etílico em hexano) para proporcionar a Fórmula (I) (14,9 mg, 0,05 mmol, 92,6%);

O composto de Fórmula (1) é um líquido incolor; $R_f = 0,20$ (sílica, 30% de éter etílico em hexano); $[\alpha]^{25}_D$: -6,0 (c = 0,33, benzeno); IV (película) ν_{max} 3080,6, 2928,9, 2857,6, 1693,6, 1638,2, 1464,7, 1413,8, 1376,4, 1263,1, 1179,3, 1095,9, 1027,5, 999,2, 909,2, 801,7; RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 5,82 (dd, 1H), 5,40 (m, 1H), 4,85-4,95 (dd, 2H), 2,30 (s 1, 1H), 2,16 (m, 1H), 2,02 (m, 1H), 1,80-1,98 (m, 2H), 1,70-1,84 (m, 2H), 1,10-1,70 (m, 7H), 1,24 (s, 3H), 1,00-1,10 (m, 2H), 0,99 (s, 3H), 0,95 (s, 3H); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 150,3, 149,9, 116,7, 109,2, 47,9, 41,8, 41,7, 38,3, 38,2, 37,4, 34,8, 31,8, 28,6, 28,5, 27,7, 22,6, 22,4, 22,1, 20,3, 18,9.

Métodos de Utilização da Invenção

Os métodos *in vitro* e *in vivo* descritos acima como parte da presente invenção também estabelecem a selectividade de um modulador de TNF- α ou IL-1. É reconhecido que os químicos podem modular uma ampla variedade de processos biológicos ou serem selectivos. Painéis de células com base na presente invenção podem ser utilizados para determinar a especificidade do modulador de candidato. A selectividade é evidente, por exemplo, no campo da quimioterapia, onde a selectividade de um químico para ser um tóxico em relação a células cancerosas, mas não em relação a células não cancerosas, é obviamente desejável. Os moduladores selectivos são preferidos porque os mesmos têm menos

efeitos secundários no ambiente clínico. A selectividade de um modulador candidato pode ser estabelecida *in vitro* testando a toxicidade e efeito de um modulador candidato sobre uma multiplicidade de linhas de células que exibem uma variedade de sensibilidades e percursos celulares. Os dados obtidos a partir destes estudos de toxicidade *in vitro* podem ser alargados aos modelos animais, incluindo estudos em modelos animais aceites e ensaios clínicos em humanos, para determinar a toxicidade, eficácia e selectividade do modulador candidato.

A presente invenção também abrange as composições produzidas pelos métodos da presente invenção, a composições farmacêuticas compreendendo um veículo farmacêuticamente aceitável preparada para armazenagem e administração subsequente, as quais têm uma quantidade farmacêuticamente eficaz dos produtos divulgados acima num veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável. Veículos ou diluentes aceitáveis para utilização terapêutica são bem conhecidos na técnica farmacêutica e estão descritos, por exemplo, em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985). Conservantes, estabilizantes, corantes e, mesmo, aromatizantes podem ser proporcionados na composição farmacêutica. Por exemplo, benzoato de sódio, ácido ascórbico e ésteres de ácido p-hidroxibenzóico podem ser adicionados como conservantes. Além disso podem ser utilizados antioxidantes e agentes de suspensão.

Estas composições moduladoras de TNF- α ou IL-1 podem ser formuladas e utilizadas na forma de comprimidos, cápsulas ou elixires para administração oral; supositórios para administração rectal; soluções estéreis, suspensões para administração por injeção; emplastros para administração

transdérmica e depósitos subdérmicos e semelhantes. Os injectáveis podem ser preparados de modo convencional, como soluções ou suspensões líquidas, formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injeção, ou como emulsões. Os excipientes adequados são, por exemplo, água, soro fisiológico, dextrose, manitol, lactose, lecitina, albumina, glucamato de sódio, cloridrato de cisteína. Adicionalmente, se desejado, as composições farmacêuticas injectáveis podem conter pequenas quantidades de substâncias auxiliares não tóxicas, tais como agentes humectantes, agentes tampão de pH. Se desejado, podem ser utilizadas preparações para melhorar a absorção (por exemplo, lipossomas).

A quantidade farmacêuticamente eficaz da composição moduladora de TNF- α ou IL-1 necessária como uma dose dependerá da via de administração, tipo de animal a ser tratado e características físicas do animal específico sob consideração. A dose pode ser individualizada para se obter o efeito desejado, mas dependerá de outros factores tais como peso, dieta, medicação concorrente e outros factores que os especialistas na técnica médica reconhecerão.

Ao pôr em prática os métodos da invenção, os produtos ou composições podem ser utilizados separadamente ou em combinação uns com os outros ou em combinação com outros agentes terapêuticos ou de diagnóstico. Estes produtos podem ser utilizados *in vivo*, vulgarmente num mamífero, de um modo preferido num humano ou *in vitro*. Ao utilizá-los *in vivo*, os produtos ou composições podem ser administrados ao mamífero numa multiplicidade de formas, incluindo por via parentérica, intravenosa, subcutânea, intramuscular, pelo cólon, rectal, vaginal, nasal ou intraperitoneal, empregando uma variedade de

formas de dosagem. Tais métodos também podem ser aplicados para avaliar a actividade química *in vivo*.

Como será imediatamente evidente ao especialista na técnica, a dosagem útil *in vivo* a ser administrada e o modo particular de administração variarão dependendo da idade, peso e espécie de mamífero tratada, os compostos particulares utilizados e a utilização específica para a qual estes compostos são empregues. A determinação dos níveis de dosagem eficazes, isto é, dos níveis de dosagem necessários para se conseguir resultado desejado, pode ser realizada por um especialista na técnica utilizando métodos farmacológicos de rotina. Tipicamente, as aplicações clínicas de produtos em humanos são iniciadas a níveis de dosagem menores, sendo o nível de dosagem aumentado até se obter o efeito desejado. Alternativamente, pode utilizar-se estudos aceitáveis *in vitro* para estabelecer doses e vias de administração úteis para as composições identificadas pelos métodos da presente invenção utilizando métodos farmacológicos estabelecidos.

Em estudos animais não humanos, as aplicações dos produtos potenciais são iniciadas a níveis de dosagem maiores, sendo a dosagem diminuída até não se obter mais o efeito desejado ou até desaparecerem os efeitos secundários. A dosagem para os produtos da presente invenção pode variar muito em função dos efeitos desejados e da indicação terapêutica. Tipicamente, as dosagens podem estar entre, aproximadamente, 10 micrograma/kg e 100 mg/kg de peso corporal, de um modo preferido entre aproximadamente 100 micrograma/kg e 10 mg/kg de peso corporal. Alternativamente as dosagens podem basear-se e serem calculadas com relação à área de superfície do doente, como será compreendido pelos

especialistas na técnica. A administração é de um modo preferido oral, uma ou duas vezes ao dia.

A formulação exacta, via de administração e dosagem podem ser escolhidas pelo médico do indivíduo tendo em consideração o estado do doente. Ver por exemplo, Fingi et al., em *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1975. Assinale-se que o médico assistente saberia como e quando terminar, interromper ou ajustar a administração devido à toxidade ou às disfunções do órgão. Reciprocamente, o médico assistente também saberia ajustar o tratamento para níveis mais altos se a resposta clínica não fosse adequada (evitando a toxicidade). A grandeza de uma dose administrada na gestão do distúrbio de interesse variará com a gravidade do estado a ser tratado e a via de administração. A gravidade do estado pode, por exemplo, ser avaliado, em parte, por métodos de prognóstico. Além disso, a dose e talvez a frequência da dose, também variarão de acordo com idade, peso e resposta do doente em particular. Um programa comparável ao discutido acima pode ser utilizado em medicina veterinária.

Dependendo dos estados específicos a ser tratados, tais agentes podem ser formulados e administrados sistemicamente ou localmente. Uma variedade de técnicas para formulação e administração pode ser encontrada em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990). As vias de administração podem incluir a administração oral, rectal, transdérmica, vaginal, transmucosa ou intestinal; administração parentérica, incluindo injeção intramuscular, subcutânea, intramedular, bem como injeções intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal ou intraocular.

Para injeção, os agentes da presente invenção podem ser formulados em soluções aquosas, de um modo preferido, em tampões fisiologicamente compatíveis, tais como solução de Hanks, solução de Ringer ou tampão de soro fisiológico. Para uma administração transmucosa, penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada são utilizados na formulação. Tais penetrantes são geralmente conhecidos na técnica. A utilização de veículos farmacêuticamente aceitáveis para formular os compostos aqui descritos para colocação em prática da invenção em dosagens adequadas para administração sistêmica está dentro do âmbito da invenção. Com a escolha apropriada do veículo e a prática de fabrico adequada, as composições de acordo com a presente invenção, em particular, aquelas formuladas como soluções, podem ser administradas por via parentérica, tal como por injeção intravenosa. Os compostos podem ser facilmente formulados utilizando veículos farmacêuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica em dosagens adequadas para administração oral. Tais suportes permitem aos compostos da presente invenção serem formulados como comprimidos, pílulas, cápsulas, líquidos, geles, xaropes, pastas, suspensões, para ingestão oral por um doente a ser tratado.

Os agentes destinados a serem administrados por via intracelular podem ser administrados utilizando técnicas bem conhecido dos técnicos médios na matéria. Por exemplo, tais agentes podem ser encapsulados em lipossomas e, em seguida, administrados como descrito acima. Todas as moléculas presentes numa solução aquosa aquando da formação dos lipossomas são incorporadas na solução aquosa interior. Os conteúdos dos lipossomas são protegidos do microambiente externo e, como os lipossomas se fundem com as membranas da célula, estes são

eficientemente administrados no citoplasma da célula. Adicionalmente, devido à sua hidrofobicidade, as pequenas moléculas orgânicas podem ser administradas intracelularmente.

As composições farmacêuticas adequadas para serem utilizadas como aqui descrito incluem composições nas quais os moduladores de TNF- α ou IL-1 estão contidos numa quantidade eficaz para se conseguir o efeito de modulação do TNF- α ou IL-1. A determinação das quantidades eficazes está bem dentro do conhecimento dos especialistas na técnica, especialmente à luz da descrição detalhada aqui proporcionada. Além dos ingredientes activos, estas composições farmacêuticas podem conter veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados, compreendendo excipientes e auxiliares, os quais facilitam o processamento dos compostos activos em preparações as quais podem ser utilizadas farmacêuticamente. As preparações formuladas para administração oral podem ser na forma de comprimidos, drageias, cápsulas ou soluções. As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser fabricadas numa maneira que é conhecida, por exemplo, por intermédio de processos de mistura, dissolução, granulação, formação de drageias, levitação, emulsificação, encapsulação, retenção ou liofilização convencionais.

As formulações farmacêuticas para administração parentérica incluem soluções aquosas dos compostos activos numa forma solúvel em água. Adicionalmente, podem preparar-se suspensões dos compostos activos consoante apropriado em suspensões para injeção oleosas. Os solventes ou veículos lipófilos adequados incluem óleos gordos, tais como óleo de sésamo ou outros óleos orgânicos, tais como óleos de soja, toranja ou amêndoa ou ésteres sintéticos de ácidos gordos, tais como oleato de etilo ou triglicéridos ou lipossomas. As suspensões aquosas para

injecção podem conter substâncias, as quais aumentam a viscosidade da suspensão, tais como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol ou dextrano. Opcionalmente, a suspensão pode conter estabilizantes ou agentes que aumentem a solubilidade dos compostos para permitir a preparação de soluções extremamente concentradas.

As preparações farmacêuticas para utilização oral podem ser obtidas pela combinação dos compostos activos com um excipiente sólido, opcionalmente triturando a mistura resultante e processando a mistura de grânulos, depois de se adicionar auxiliares adequados, se desejado, para se obter núcleos de comprimidos ou drageias. Os excipientes adequados são, em particular, agentes de enchimento, tais como açúcares, incluindo lactose, sacarose, manitol ou sorbitol; preparações de celulose tais como, por exemplo, amido de milho, amido de trigo, amido de arroz, amido de batata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose de sódio e/ou polivinilpirrolidona (PVP). Se desejado pode adicionar-se desintegrantes, tais como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ou ácido algínico ou um sal dos mesmos tal como alginato de sódio. Os núcleos das drageias são proporcionados com revestimentos adequados. Para este propósito pode utilizar-se soluções concentradas de açúcar, as quais podem conter opcionalmente goma-arábica, talco, polivinilpirrolidona, carbopol gel, polietilenoglicol e/ou dióxido de titânio, soluções de laca e solventes ou misturas de solventes orgânicos adequados. Pode-se adicionar corantes ou pigmentos aos revestimentos dos comprimidos ou drageias para identificação ou caracterização de combinações diferentes de doses de composto activo. Para este fim pode-se utilizar soluções concentradas de açúcar, as quais podem conter opcionalmente goma-arábica, talco,

polivinilpirrolidona, carbopol gel, polietilenoglicol, e/ou dióxido titânio, soluções de laca e solventes ou misturas de solventes orgânicos adequados. Pode adicionar-se corantes ou pigmentos aos revestimentos dos comprimidos ou drageias para identificação ou caracterização das diferentes combinações de doses de composto activo. Tais formulações podem ser formadas utilizando métodos conhecidos na técnica (ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nº 5733888 (composições injectáveis); 5726181 (compostos pouco solúveis em água); 5707641 (proteínas ou péptidos terapeuticamente activos); 5667809 (agentes lipófilos); 5576012 (agentes poliméricos solubilizantes); 5707615 (formulações antivirais); 5683676 (medicamentos em partículas); 5654286 (formulações tópicas); 5688529 (suspensões orais); 5445829 (formulações de libertação prolongada); 5653987 (formulações líquidas); 5641515 (formulações de libertação controlada) e 5601845 (formulações esferóides).

Os compostos da presente invenção podem ser avaliados quanto à sua eficácia e toxicidade utilizando métodos conhecidos. Por exemplo, a toxicologia de um composto particular de acordo com a presente invenção, ou de um subconjunto de compostos da presente invenção que compartilham determinadas unidades químicas, pode ser estabelecida pela determinação da toxicidade *in vitro* em relação a uma linhagem de células, tal como uma linhagem de células de mamíferos e, de um modo preferido, humanos. Os resultados de tais estudos são frequentemente previsíveis da toxicidade em animais, tais como mamíferos ou, mais especificamente, humanos. Alternativamente, a toxicidade de compostos particulares da presente invenção num modelo animal, tais como ratos, coelhos ou macacos, pode ser determinada utilizando métodos conhecidos. A eficácia de um composto particular da presente invenção pode ser estabelecida

utilizando diversos métodos reconhecidos na técnica, tais como métodos *in vitro*, modelos animais, ou ensaios clínicos em humanos. Existem modelos *in vitro* reconhecidos na técnica para quase todas as classes de patologia, incluindo os estados discutidos na presente invenção, incluindo cancro, doença cardiovascular e diversas disfunções humanas. De modo semelhante pode utilizar-se modelos animais aceitáveis para estabelecer a eficácia de químicos para o tratamento de tais patologias. Quando da selecção de um modelo para determinar a eficácia, o especialista na técnica pode ser guiado pelo estado da técnica para escolher um modelo, dose e via de administração e regime apropriados. Evidentemente, também se pode utilizar os ensaios clínicos em humanos para determinar a eficácia de um composto da presente invenção em humanos.

Quando utilizado como um agente anti-inflamatório, um agente anticancerígeno, um composto inibidor do crescimento de tumor, ou como um meio para o tratamento de uma doença cardiovascular, os compostos de Fórmula (II) podem ser administrados por via oral ou não oral. Quando administrado por via oral, ele pode ser administrado em cápsulas, comprimidos, grânulos, formulação para pulverização, xaropes ou outras formas desse tipo. Quando administrado não oralmente, este pode ser administrado como uma suspensão, uma preparação oleosa ou em gotas, supositório, unguento, pomada, quando administrado via injeção subcutânea, intrepéritoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica. De modo semelhante, ele pode ser administrado por via tópica, rectal ou vaginal, conforme considerado apropriado pelos especialistas na técnica para colocar o composto da presente invenção em contacto óptimo com um tumor, inibindo desse modo o crescimento do tumor. A administração local no local do tumor ou de outros estados

patológicos também é contemplada, antes ou após a extracção do tumor ou como parte de um tratamento reconhecido na técnica para o estado patológico. As formulações de libertação controlada, formulações de implante e administração por bomba de infusão são, igualmente, contempladas.

Os compostos de Fórmula (II) quando utilizados como um agente antitumoral ou como um tratamento para qualquer outra dos estados patológicos acima identificados, podem ser administrados por via oral ou não oral a um doente humano numa quantidade de aproximadamente 0,0007 mg/dia até, aproximadamente, 7000 mg/dia do ingrediente activo e, de um modo mais preferido, aproximadamente 0,07 mg/dia até aproximadamente 70 mg/dia de ingrediente activo, de um modo preferido, uma vez ao dia ou, de um modo menos preferido, duas até cerca de dez vezes ao dia. Alternativamente e, também, de um modo preferido, o composto da presente invenção pode, de um modo preferido, ser continuamente administrado nas quantidades indicadas através, por exemplo, de um gotejamento intravenoso. Assim, para um doente com um peso de 70 quilogramas, a dose diária preferida da substância activa antitumoral seria de aproximadamente, 0,0007 mg/kg/dia até aproximadamente 35 mg/kg/dia e, de um modo muito preferido, 0,007 mg/kg/dia até aproximadamente 0,035 mg/kg/dia. No entanto, conforme será compreendido pelos especialistas na técnica, em algumas situações pode ser necessária a administração de um composto antitumoral da presente invenção em quantidades que excedem, ou excedem mesmo muito, a gama de dosagem preferida supramencionada para tratar eficaz e agressivamente tumores particularmente avançados ou letais.

Para formular o composto de Fórmula (II) como um composto inibidor do crescimento de tumor ou antiviral pode utilizar-se

agentes tensioactivos, excipientes, agentes de amaciamento, agentes de suspensão e substâncias filmogénias e assistentes de revestimento farmacêuticamente aceitáveis. De um modo preferido, álcoois, ésteres, álcoois alifáticos sulfatados podem ser utilizados como agentes tensioactivos; sacarose, glucose, lactose, goma, celulose cristalizada, manitol, silicato anidro leve, aluminato de magnésio, metassilicato e aluminato de magnésio, silicato de alumínio sintético, carbonato de cálcio, hidrogenocarbonato de sódio, hidrogenofosfato de cálcio, carboximetilcelulose de cálcio podem ser utilizados como excipientes; estearato de magnésio, talco, óleo endurecido podem ser utilizados como agentes amaciadores; óleo de coco, azeite, óleo de sésamo, óleo de amendoim e soja podem ser utilizados como agentes de suspensão ou lubrificantes; acetato e ftalato de celulose como um derivado de um hidrato de carbono, tais como celulose ou açúcar, ou um copolímero de metilacetato-metacrilato como um derivado de polivinilo podem ser utilizados como agentes de suspensão; e plastificantes, tais como éster de ftalatos podem ser utilizados como agentes de suspensão. Além dos ingredientes preferidos acima, podem adicionar-se adoçantes, aromatizantes, corantes, conservantes à formulação administrada do composto da invenção, em particular quando o composto é para ser administrado por via oral.

No caso da utilização do composto de Fórmula (II), Fórmula (IIA) e/ou Fórmula (IIB) como um meio para o tratamento da vermelhidão da pele, o composto pode ser alternativamente administrado por via tópica na forma de um unguento ou pomada, em conjunção com um veículo farmacêuticamente aceitável.

No caso da utilização do composto de Fórmula (II) como um reagente num ensaio bioquímico, conforme descrito acima, o

composto de acordo com a presente invenção pode ser dissolvido num solvente orgânico ou num solvente orgânico aquoso e aplicado directamente a qualquer de vários sistemas de células em cultura. Os solventes orgânicos que podem ser utilizados incluem, por exemplo, metanol, sulfóxido de metilo. A formulação pode, por exemplo, ser um pó, granulado ou outro inibidor sólido, ou um inibidor líquido preparado utilizando um solvente orgânico ou um solvente orgânico aquoso. Embora a concentração preferida do composto da presente invenção para utilização como um inibidor de ciclo celular esteja geralmente na gama de, aproximadamente, 1 até aproximadamente 100 µg/mL, as quantidades mais apropriadas para utilização varia dependendo do tipo de sistema de células de cultura e o propósito da utilização, como será apreciado pelos especialistas na técnica. Também, em determinadas aplicações, pode ser necessário ou preferido para os especialistas na técnica utilizar uma quantidade fora da gama anterior.

A presente invenção também abrange as composições de Fórmula (II) em composições farmacêuticas compreendendo um veículo farmacêuticamente aceitável. Tais composições podem ser preparadas para armazenamento e para administração posteriores. Veículos ou diluentes aceitáveis para utilização terapêutica são bem conhecidos na técnica farmacêutica e estão descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985). Por exemplo, tais composições podem ser formuladas e utilizadas como comprimidos, cápsulas ou soluções para administração oral; supositórios para administração rectal ou vaginal; soluções ou suspensões estéreis para administração injectável. Os injectáveis podem ser preparados de maneiras convencionais, quer como soluções ou suspensões líquidas, como formas sólidas adequadas para

dissolução ou suspensão em líquido antes da injeção, ou como emulsões. Os excipientes adequados incluem, mas não se limitam a, soro fisiológico, dextrose, manitol, lactose, lecitina, albumina, glutamato de sódio, cloridrato de cisteína. Ainda, se desejado, as composições farmacêuticas injectáveis podem conter quantidades pequenas de substâncias auxiliares não tóxicas, tais como agentes humectantes, agentes tampão. Se desejado podem utilizar-se preparações para melhorar a absorção (por exemplo, lipossomas).

A quantidade farmacêuticamente eficaz da composição necessária como uma dose dependerá da via de administração, do tipo de animal a ser tratado e das características físicas do animal específico sob consideração. A dose pode ser individualizada para a obtenção de um efeito desejado, mas dependerá de factores, tais como peso, dieta, medicação concorrente e outros factores que os especialistas na técnica reconhecerão.

Os produtos ou composições de acordo com a presente invenção, conforme descritos acima, podem ser utilizados separadamente ou em combinação uns com os outros, ou em combinação com outros agentes terapêuticos ou de diagnóstico. Estes produtos podem ser utilizados *in vivo* ou *in vitro*. As dosagens úteis e os modos de administração muito úteis variarão dependendo da idade, peso e animal a ser tratado, dos compostos particulares a serem utilizados e da utilização específica, para a qual esta composição ou composições são utilizadas. A grandeza da dose na gestão ou tratamento de um distúrbio particular variará com a gravidade da patologia a ser tratada e com a via de administração e, dependendo dos estados patológicos e da sua gravidade, as composições de acordo com a presente invenção

podem ser formuladas e administradas por via sistémica ou local. Várias técnicas de formulação e administração podem ser encontradas em Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990).

EXEMPLOS

Os exemplos seguintes, especificamente o Exemplo 1, demonstram que foram sintetizados compostos representativos das classes de compostos aqui descritas. Os Exemplos 9-17 apresentam, em células de mamíferos que constituem um modelo preliminar aceitável para a segurança e eficácia em humanos tratados com doses crescente do composto de Fórmula (I), como sintetizado no Exemplo 1 e compostos como aqui designados por TTL1 até TTL4, como sintetizados de acordo com os processos do Exemplo 1, em concentrações tão elevadas quanto 10 µg/mL mostraram viabilidade semelhante quando comparados com controlos não tratados indicando que os efeitos de inibição dos compostos avaliados na síntese de TNF- α não foram mediados por um efeito citotóxico directo.

Estudos subsequentes com determinados compostos preferidos de acordo com a presente invenção demonstraram que o TTL1 exibiu uma actividade, aproximadamente, dez (10) vezes maior quando comparado com O COMPOSTO SINTÉTICO DE FÓRMULA (I) na inibição da síntese de TNF- α e IL-1. O TTL3, o qual contem uma modificação química adicional exibiu uma actividade, aproximadamente, 100 vezes maior que o TTL1. É importante observar que de modo semelhante ao composto de Fórmula (I), nem o TTL1 nem o TTL3 inibiram significativamente a síntese de IL-6.

EXEMPLO 1

Síntese Estereosselectiva de Compostos de Fórmulas (I) e (II)

Foi efectuada a primeira síntese estereosselectiva do composto de Fórmula (I). O nosso plano se síntese parte da (-) cetona de Wieland-Miesher (**107**), ver Figura 18 e exige uma reacção de cicloadição de Diels-Alder para a construção do anel C de **101**. A síntese descrita confirma a estereoquímica de **101** e representa uma entrada eficiente numa classe inexplorada de diterpenos biologicamente activos.

A casca da raiz de *Acantopanax koreanum* Nakai (Araliaceae), um arbusto que cresce na República da Coreia, tem sido tradicionalmente utilizada como um tónico, sedativo e como um remédio para reumatismo e diabetes. (Medicinal Plants of East and Southeast Asia, Perry, E. M.; Metzger, J. Eds.; MIT Press, Cambridge, MA e London, 1980). Nos seus estudos sobre extractos farmacologicamente activos deste remédio popular, Chung e colaboradores isolaram e caracterizaram estruturalmente um novo diterpeno que foi, subsequentemente, denominado ácido acantóico (**101**). ((a) Kirn, Y.-H.; Chung, B.S.; Sankawa, U. J. Nat. Prod. 1988, 51, 1080-1083; (b) Kang, H.-S.; Kim, Y.-H.; Lee, C.-S.; Lee, J.-J.; Choi, I.; Pyun, K.-H. Cellular Immunol. 1996, 170, 212-221; (c) Kang, H.-S.; Song, H.K.; Lee, J.-J.; Pyun, K.-H.; Choi, I. Mediators Inflamm. 1998, 7, 257-259).

Do ponto de vista da biossíntese, **101** pertence a uma família relativamente grande de diterpenos pimaradieno, a qual pode ser melhor representada pelo ácido pimárico (**102**).

(Ruzicka, E.; Sternbach, E.; J. Am. Chem. Soc. 1948, 70, 2081-2085; Irele, R. E.; Schiess, P. W. Tetrahedron Lett. 1960, 25, 37-43; Wenkert, E.; Buckwalter, B. L. J. Am. Chem. Soc. 1972, 94, 4367-4372; Wenkert, E.; Chamberlin, J. W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 688-693). A estrutura do composto de Fórmula (I) distingue-se por uma conectividade invulgar ao longo do núcleo tricíclico rígido, a qual pode ser tida como responsável pelo seu perfil farmacológico. Na verdade, o recente isolamento deste composto permitiu realizar estudos sobre a sua actividade biológica e verificar o seu potencial medicinal. (Kang, H.-S.; Kim, Y.-H.; Lee, C.-S.; Lee, J.-J.; Choi, I.; Pyun, K.-H. Cellular Immunol. 1996, 170, 212-221; Kang, H.-S.; Song, H. K.; Lee, J.-J.; Pyun, K.-H.; Choi, I. Mediators Inflamm. 1998, 7, 257-259)). Mais especificamente, constatou-se que o ácido acantóico apresenta actividades anti-inflamatória e antifibrótica promissoras que surgem presumivelmente da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias: factor de necrose de tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1). Ver Tumor Necrosis Factor. The Molecules and its Emerging Role in Medicine, B. Beutler, Ed.; Raven Press, N.I. 1992; Aggarwal, B.; Puri, R. Human Cytokines: its Role in Disease and Therapy; Blackwell Science, Inc.: E.U.A., 1995; Torpe, R.; Nire-Sluis, A. Cytokines; Academic Press: San Diego, 1998; Kurzrock, R.; Talpaz, M. Cytokines: Interleukins and its Receptors; Kluwer Academic Publishers: E.U.A., 1995; Szekanecz, Z.; Kosh, A. E.; Kunkel, S. L.; Strieter, R. M. Clinical Pharmacol. 1998, 12, 377-390; Camussi, G.; Lupin, E. 15 Drugs 1998, 55, 613-620; Newton, R. C.; Decicco, C. P. J. Med. Chem. 1999, 42, 2295-2314.

Esta inibição foi dependente da concentração e específica para a citocina, uma vez que sob as mesmas condições a produção de IL-6 ou IFN- γ (interferão-gama) não foram afectadas. Além

disso, constatou-se que o ácido acantóico é activo por administração oral e mostrou uma toxicidade mínima nas experiências realizadas em ratinhos e ratos.

A combinação de uma estrutura invulgar e uma actividade farmacológica promissora exibidas por **101** levaram a um prolongamento dos nossos estudos sobre a síntese, ver Xiang, A. X.; Watson, D. A.; Ling, T.; Theodorakis, E. A. J. Org. Chem. 1998, 63, 6774-6775; Ling, T.; Xiang, A. X.; Theodorakis, E. A. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1999, 38, 3089-3091, a esta família de metabolitos biologicamente importantes. Este exemplo proporciona uma síntese estereosseletiva total do ácido (-)acantóico e dos compostos de Fórmula (II) e, como se mostra nos Exemplos 2 a 6, proporciona uma base para a síntese total dos compostos de Fórmula (IIB) . Este Exemplo também confirma a estrutura e a estereoquímica absoluta de **101**.

A estratégia retro-sintética para a obtenção do ácido acantóico está ilustrada na Figura 20. O anel em C de **101** é visualizado como sendo construído por uma reacção de cicloadição de Diels-Alder, revelando desta forma o dienófilo **103** e um dieno apropriadamente substituído, tal como **104**, como parceiros ideais de condensação. Ver Oppolzer, W em Comprehensive Org. Synthesis, Trost, E. M. Ed.; Oxford, N. I.; Pergamon Press, 1991, 315-399. Esta reacção introduz tanto a insaturação na ligação C9-C11 e a estereoquímica desejada nos carbonos C8 e C13, permitindo um ponto de ramificação conveniente entre as sínteses dos compostos de Fórmula (II) e dos compostos de Fórmula (IIB). O dieno **104** poderia ser produzido pela funcionalização da cetona **105**, cujo centro quaternário C4 foi planeado para ser preparado por uma alquilação controlada estereoquimicamente do β -cetoéster **107**, Esta análise sugeriu a utilização da (-)cetona de Wieland-

Miesher **107** como um material de partida putativo. A aplicação de um tal plano à síntese de ácido acantóico está representada nas Figuras 21 e 23, como Esquemas 5 e 6. Todos os compostos exibiram dados espectrais e analíticos satisfatórios.

A síntese começou com a enona **107** opticamente pura, o qual foi facilmente obtida através de uma anelação assimétrica de Robinson mediada pela D-prolina (75-80% de rendimento, >95% ee) Ver Buchschacher, P.; Fuerst, A.; Gutzwiller, J. *Org. Synth. Coll. Vol. VII* 1990, 368-3372.). A cetalização selectiva do grupo cetona C9 de **107**, seguida de alquilação redutiva ao longo da funcionalidade enona com cianoformato de metilo proporcionou o cetoéster **106** com 50% de rendimento global. Ver Crabtree, S.-R.; Meer, L. N.; Sethi, P. S. *Org. Synth.* 1992, 70, 256-263. Para introduzir a funcionalidade desejada na posição C4, implementou-se um segundo processo de alquilação redutiva, ver Coates, R. M.; Shaw, J. E. *J. Org. Chem.* 1970, 35, 2597-2601; Coates, R. M.; Shaw, J. E. *J. Org. Chem.* 1970, 35, 2601-2605. O composto **106** foi inicialmente transformado no éter de metoximetilo correspondente **108**, o qual por tratamento com lítio em amónia líquida e iodometano deu origem ao éster **110** com um rendimento total de 58% e como um único diastereómero. Ver Welch, S. C.; Hagan, C. P. *Synthetic Comm.* 1973, 3, 29-32; Welch, S. C.; Hagan, C. P.; Kim, J. H.; Chu, P. S. *J. Org. Chem.* 1977, 42, 2879-2887; Welch, S. C.; Hagan, C. P.; White, D. H.; Fleming, W. P.; Trotter, J. W. *J. Amer. Chem. Soc.* 1977, 99, 549-556. A estereosselectividade desta adição resultou da forte preferência do intermediário enolato **109** para sofrer alquilação do lado equatorial menos impedido.

Com o núcleo bicíclico na mão, construiu-se o anel C. O anel C foi preparado através de uma reacção de Diels-Alder entre

a metacroleína **103**, ver por exemplo, a Figura 21 e o dieno contendo enxofre **104**. A síntese de **104** foi iniciada com uma desprotecção catalisada por ácido do cetol C9 de **110**, seguida de alquilação da cetona resultante **105** com complexo de acetileno de lítio-etilenodiamina. Ver Das, J.; Dickinson, R. A.; Kakushima, M.; Kingston, G. M.; Reid, G. R.; Sato, Y.; Valenta, Z. Can. J. chem. 1984, 62, 1103-1111). Esta sequência proporcionou o alcino **111** como uma mistura diastereomérica a 8:1 em C9 (em favor do isómero mostrado) e com um rendimento total de 86%. Nesta altura, a selectividade diastereofacial da reacção de Diels-Alder, como foi a viabilidade total da utilização de um dieno não funcionalizado, tal como **112**. Para este fim, a mistura diastereomérica de álcoois de propargilo **111** foi parcialmente reduzida (H₂, catalisador de Lindlar) e desidratada (BF₃•Et₂O) para produzir o dieno **112** com um rendimento de 90%. (Coisne, J.-M.; Pecher, J.; Declercq, J.-P.; Germain, G. van Meerssche, M. Bull. Soc. Chim. Belg. 1980, 89, 551-557). A cicloadição de Diels-Alder entre **112** e metacroleína (**103**) sob condições puras a 25 °C proporcionou com rendimento quantitativo uma mistura de dois aldeídos diastereoméricos que foram separados após a redução com boro-hidreto de sódio. Os álcoois **114** e **115** resultantes foram transformados nos ésteres de *p*-bromobenzoato correspondentes (compostos **116** e **117**, respectivamente), os quais ao recrystalizar com diclorometano/etanol produziram cristais adequados para análise por raios X (Figura 22).

Os resultados das análises por raio X estabeleceram que o sistema tricíclico tinha a estereoquímica esperada na posição C4 e confirmaram que a reacção de Diels-Alder prosseguiu exclusivamente com orientação *endo*. Foi demonstrado que a metacroleína produz produtos Diels-Alder *exo* quando se faz reagir com ciclopentadieno: Kobuke, Y. Fueno, T.; Furukawa, J.

J. Am. Chem. Soc. 1970, 92, 6548-6553. Esta observação surpreendente foi racionalizada com base na repulsão estereoquímica apresentada pelo grupo metilo, Yoon, T.; Danishefsky, S. J.; de Gala, S. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1994, 33, 853-855). A seguir, após a redução, foi mostrado que o produto principal da cicloadição era o álcool **114**, o qual tinha a estereoquímica desejada no centro C8, demonstrando desse modo uma preferência forte do dieno **112** para sofrer uma reação com **103**, ver por exemplo, a Figura 21, na face α (ataque pelo lado inferior). Além do mais, estes dados indicam que a síntese de ácido acantóico exigiria uma inversão na orientação do dienófilo de entrada.

A inversão de dienófilo necessária para a síntese do composto de Fórmula (I), seus análogos naturais e dos compostos de Fórmula (II) foi conseguida alterando os coeficientes orbitais atômicos nas extremidades do dieno, apoiando a utilização de um dieno contendo heteroátomo, tal como **104**, durante a cicloadição. Ver em termos gerais Overman, L. E.; Petty, C. B.; Ban, T.; Huang, G. T. J. Am. Chem. Soc. 1983, 105, 6335-6338; Trost, B. M.; Ippen, J.; Vladuchick, W. C. J. Am. Chem. Soc. 1977, 99, 8116-8118; Cohen, T.; Kozarych, Z. J. Org. Chem. 1982, 47, 4008-4010; Hopkins, P. B.; Fuchs, P. L. J. Org. Chem. 1978, 43, 1208-1217; Petrzilka, M.; Grayson, J. 1. Synthesis, 1981, 753-786). A construção do dieno **104** e a sua utilização para a síntese de **101** são mostradas na Figura 23, Esquema 6.

O composto **104** foi produzido por uma adição radicalar de tiofenol ao alcino **111** (Greengrass, C. W.; Hughman, J. A.; Parsons, F. J. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1985, 889-890), seguida de desidratação mediada por POCl_3 do álcool alílico

resultante (Trost, B. M.; Jungheim, L. N. J. Am. Chem. Soc. 1980, 102, 7910-7925; Mehta, G.; Murthy A. N.; Reddy, D. S.; Reddy, A. V. J. Am. Chem. Soc. 1986, 108, 3443-3452) (2 etapas, 70% de rendimento). De uma forma interessante, esta desidratação também foi tentada com $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, mas provou ser ineficaz neste caso. Com uma quantidade substancial de **104** na mão, nós investigamos a reacção de Diels-Alder, utilizando **103** como dienófilo. Testou-se várias condições térmicas (-78 até 80 °C) e catalisadas por ácidos de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, TiCl_4 , AlCl_3 e SnCl_4) para a reacção Diels-Alder. Os melhores resultados foram obtidos com SnCl_4 em cloreto de metileno a -20 °C, proporcionando o aldeído **118** com um rendimento de 84% como uma mistura de diastereómeros a 4,2:1. Para simplificar a caracterização do produto e permitir uma separação adequada, esta mistura foi reduzida com NaBH_4 e dessulfurizada redutivamente utilizando Ni de Raney. Os álcoois **119** e **120** foram obtidos deste modo com um rendimento total de 91%. A estrutura destes compostos foi atribuída por comparação dos produtos isolados a partir da reacção entre **103** e **112**. O tratamento do diastereómero principal **120** com periodinano de Dess-Martin, seguido de metilenação de Wittig introduziu a funcionalidade alceno no centro C13 e produziu **121** com um rendimento total de 86%. O ácido carboxílico em C-19 foi depois desprotegido. A exposição de **121** a LiBr em DMF a refluxo deu origem ao ácido acantóico **101** com um rendimento de 93% através de uma substituição de tipo S_N^2 da funcionalidade aciloxilo. Ver Bennet, C. R.; Gambie, R. C. Tetrahedron 1967, 23, 927-941. O produto de síntese **101** tinha dados espectroscópicos e analíticos idênticos aos descritos para o produto natural.

Este Exemplo proporciona uma síntese concisa, estereosselectiva do Composto **101**. A estratégia de síntese é

destacada pela implementação de uma reacção de Diels-Alder entre o dieno **104** e a metacroleína (**103**), a qual fixa a estereoquímica nos centros dos carbonos C13 e C8. A síntese descrita de **101** requer catorze etapas (começando com a enona **107**) e ocorre com um rendimento global de, aproximadamente, 9%. A eficiência e a versatilidade globais da presente estratégia estabelecem as bases para a preparação de análogos concebidos com perfis farmacológicos melhorados.

EXEMPLOS 9-17

Materiais e métodos.

Células de macrófagos de murídeo RAW 264,7 ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram pré-tratadas durante 30-60 minutos com doses variáveis do composto sintético de Fórmula (I), o composto sintético de Fórmula (I) e um painel de análogos (diluídos em DMSO a 0,5%) antes da estimulação com diversos agentes,, tais como lipopolissacáridos (LPS) ou um agente gram-positivo tal como *Staph aureus* (SAC) morto termicamente. Os sobrenadantes colhidos ao longo de um período de 72 horas serão submetidos a ensaios para verificar os níveis de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, IL-18 e outras citocinas por Elisa ou bioensaio. Também serão realizados estudos adicionais para avaliar os efeitos dos compostos sintéticos de fórmulas (I), (II) em percursos de sinalização de citocina específicos, tais como a actividade da Caspase (Nr-1, Nr.3), NF- κ B, actividade de MAP-cinase (P38, ERK e JNK).

Resultados

Estudos pré-clínicos demonstraram que células RAW 264.7 de murídeo tratadas com doses crescentes dos compostos sintéticos de Fórmulas (I), especificamente aqueles aqui designados por TTL1 e TTL3, em concentrações tão altas quanto 10 µg/mL mostraram uma viabilidade semelhante quando comparadas com controlos não tratados indicando que os efeitos inibidores dos compostos sintéticos de Fórmulas (I) e (IIB) na síntese de TNF- α não foram mediados por um efeito citotóxico directo.

Estudos subsequentes com o composto de Fórmula (I) como sintetizado de acordo com o Exemplo 1, TTL1 e TTL3 demonstraram que a TTL1 apresentava uma actividade aproximadamente 10 vezes maior quando comparado com o composto de Fórmula (I) como sintetizado de acordo com o Exemplo 1 na inibição da síntese de TNF- α IL-1. O TTL3 contém uma modificação química adicional e apresentou uma actividade aproximadamente 100 vezes maior que o TTL1. Observou-se que, de modo semelhante ao composto de Fórmula (I) como sintetizado de acordo com o Exemplo 1, nem o análogo TTL1 nem o análogo TTL3 inibiram de forma significativa a síntese de IL-6. O TTL1 apresentou uma actividade dez (10) vezes maior quando comparado com o composto de Fórmula (I) como sintetizado de acordo com o Exemplo 1 na inibição da síntese de TNF- α e IL-1.

O TTL3, o qual contém uma modificação química adicional, apresentou uma actividade, aproximadamente, 100 vezes maior que o TTL1. É mais uma vez importante assinalar que, de modo semelhante ao composto de Fórmula (I) como sintetizado de acordo com o Exemplo 1, nenhum análogo inibiu de forma significativa a síntese de IL-6.

TABELA 1

Inibição da Síntese de TNF- α Induzida por LPS pelo Composto de Fórmula (I) e TTL1							
	LPS	Fórmula (I) (0,1 $\mu\text{g/mL}$)	Fórmula (I) (1 $\mu\text{g/mL}$)	Fórmula (I) (10 $\mu\text{g/mL}$)	TTL1 (0,1 $\mu\text{g/mL}$)	TTL1 (1 $\mu\text{g/mL}$)	TTL1 (5,4 $\mu\text{g/mL}$)
TNF- α (ng/mL)	120	108	67	50	57	60	38

TABELA 2

Inibição da Síntese de TNF- α Induzida por SAC pelo composto de Fórmula (I) e TTL1							
	SAC	Fórmula (I) (0,1 $\mu\text{g/mL}$)	Fórmula (I) (1 $\mu\text{g/mL}$)	Fórmula (I) (10 $\mu\text{g/mL}$)	TTL1 (0,1 $\mu\text{g/mL}$)	TTL1 (1 $\mu\text{g/mL}$)	TTL1 (5,4 $\mu\text{g/mL}$)
TNF- α (ng/mL)	385	410	275	165	250	285	150

TABELA 3

Inibição da Síntese de IL-1 Induzida por SAC pelo composto de Fórmula (I) e TTL1							
	SAC	Fórmula (I) (0,1 $\mu\text{g/mL}$)	Fórmula (I) (1 $\mu\text{g/mL}$)	Fórmula (I) (10 $\mu\text{g/mL}$)	TTL1 (0,1 $\mu\text{g/mL}$)	TTL1 (1 $\mu\text{g/mL}$)	TTL1 (5,4 $\mu\text{g/mL}$)
IL-1 α (pg/mL)	700	1350	1050	350	950	400	300

TABELA 4

O composto de Fórmula (I) e TTL1 não Inibem a Síntese de IL-6 Induzida por SAC							
	SAC	Fórmula (I) (0,1 $\mu\text{g/mL}$)	Fórmula (I) (1 $\mu\text{g/mL}$)	Fórmula (I) (10 $\mu\text{g/mL}$)	TTL1 (0,1 $\mu\text{g/mL}$)	TTL1 (1 $\mu\text{g/mL}$)	TTL1 (5,4 $\mu\text{g/mL}$)
IL-6 (ng/mL)	75	65	90	80	83	86	65

TABELA 5

TTL3 Inibe a Síntese de TNF- α Induzida por SAC							
	Não estimulada	SAC	0,001 $\mu\text{g/mL}$	0,01 $\mu\text{g/mL}$	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$
TNF- α (ng/mL)	5	375	80	75	85	60	80

TABELA 6

TTL3 Inibe a Síntese de IL-1 Induzida por SAC							
	Não estimulada	SAC	0,001 $\mu\text{g/mL}$	0,01 $\mu\text{g/mL}$	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$
IL-1 α (pg/mL)	0	650	200	220	190	180	170

TABELA 7

Inibição da Síntese de TNF- α Induzida por LPS pelo TTL3 (TNF- α (ng/mL))						
LPS ($\mu\text{g/mL}$) + TTL3 ($\mu\text{g/mL}$)						
LPS sozinha	(1×10^{-7})	(1×10^{-6})	(1×10^{-5})	(1×10^{-4})	(1,0)	(1×10^2)
88	41	18	10	15	13	4

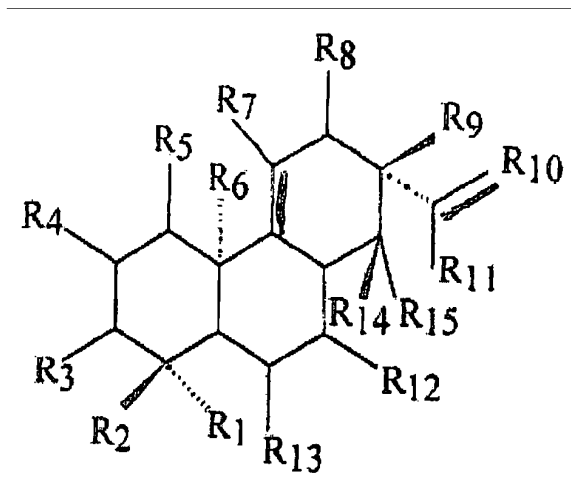
TABELA 8

TTL3 Inibe a Mortalidade pós Administração de LPS/D-Gal		
Tratamento*	Mortalidade 24 horas	Mortalidade 48 horas
LPS/D-Gal	10/10	10/10
LPS/D-Gal + DMSO	8/10	9/10
LPS/D-Gal + TTL3	2/10	2/10
* Todos os tratamentos foram i.p., administração de TTL3 45 minutos antes da LPS		

Lisboa, 24 de Fevereiro de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Composto possuindo a seguinte estrutura química:



em que:

R_3 - R_5 , R_7 , R_8 , R_{11} - R_{13} são, cada, hidrogénio,

R_2 , R_6 e R_9 são, cada, metilo,

R_{10} é CH_2 ,

R_1 é seleccionado de resíduos de acilo C_1 - C_{12} não substituídos; $-\text{CO}-\text{NH}(\text{C}_2-\text{C}_{12})$, em que $(\text{C}_2-\text{C}_{12})$ é não substituído ou substituído com $-\text{CO}_2\text{RO}$, em que RO é seleccionado do grupo consistindo de hidrogénio, alquilo C_1 - C_{20} não substituído, cicloalquilo não substituído, arilo não substituído, benzilo não substituído e heterarilo não substituído;

-CO-NH(C₂-C₁₂)(C₂-C₁₂), em que (C₂-C₁₂) é não substituído; e álcoois (C₂-C₁₂) não substituídos; e

R₁₄ e R₁₅ são separadamente seleccionados de hidrogénio, um halogéneo, alquilo C₁-C₆ não substituído, alcenilo C₂-C₆ não substituído, álcool C₁-C₆ não substituído e arilo C₅-C₆ não substituído.

2. Composto da reivindicação 1, em que R₁₄ e R₁₅ são cada hidrogénio.
3. Composto da reivindicação 1, em que R₁₅ é hidrogénio e R₁₄ é seleccionado de hidrogénio, um halogéneo, álcoois C₂-C₆, alquilos C₂-C₆, alcenilos C₂-C₆ e arilos C₅-C₆.
3. Composto de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3 anteriores para utilização como um medicamento.

Lisboa, 24 de Fevereiro de 2010

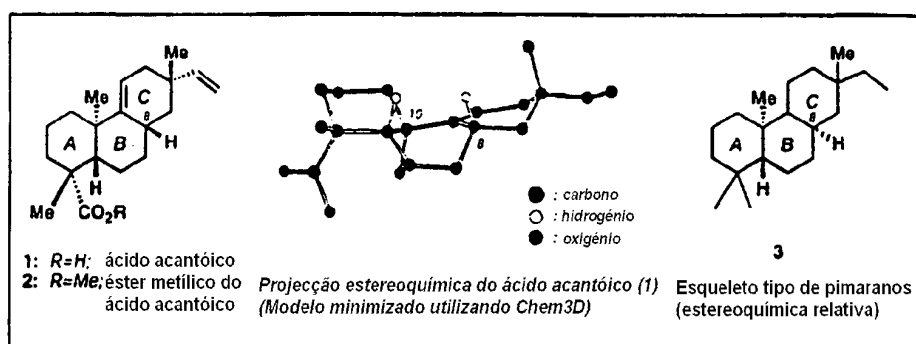


Figura 1

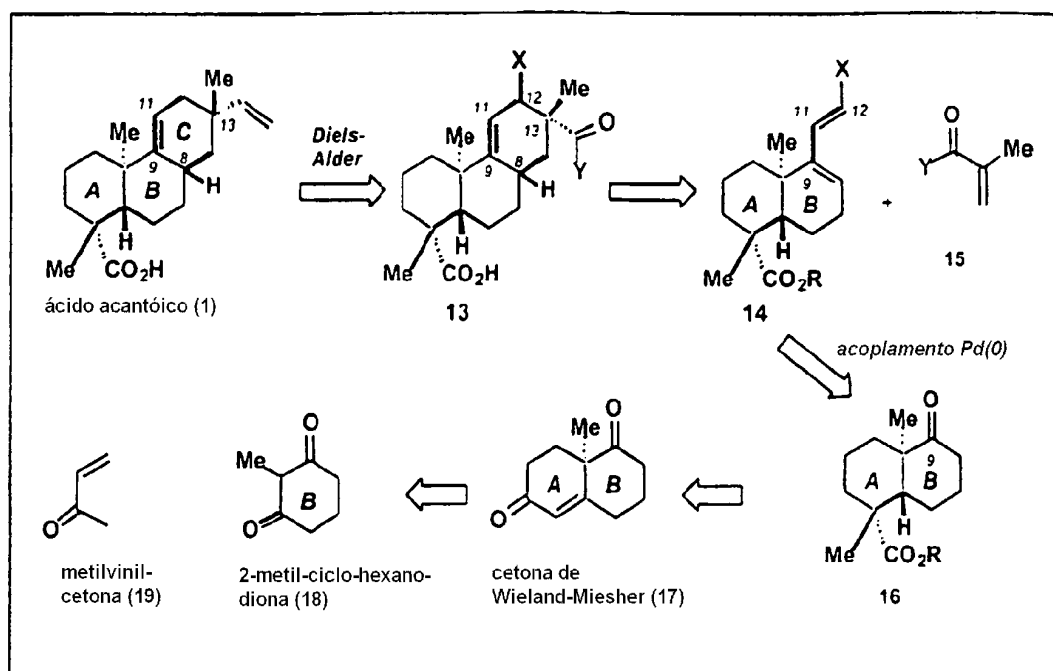


Figura 2

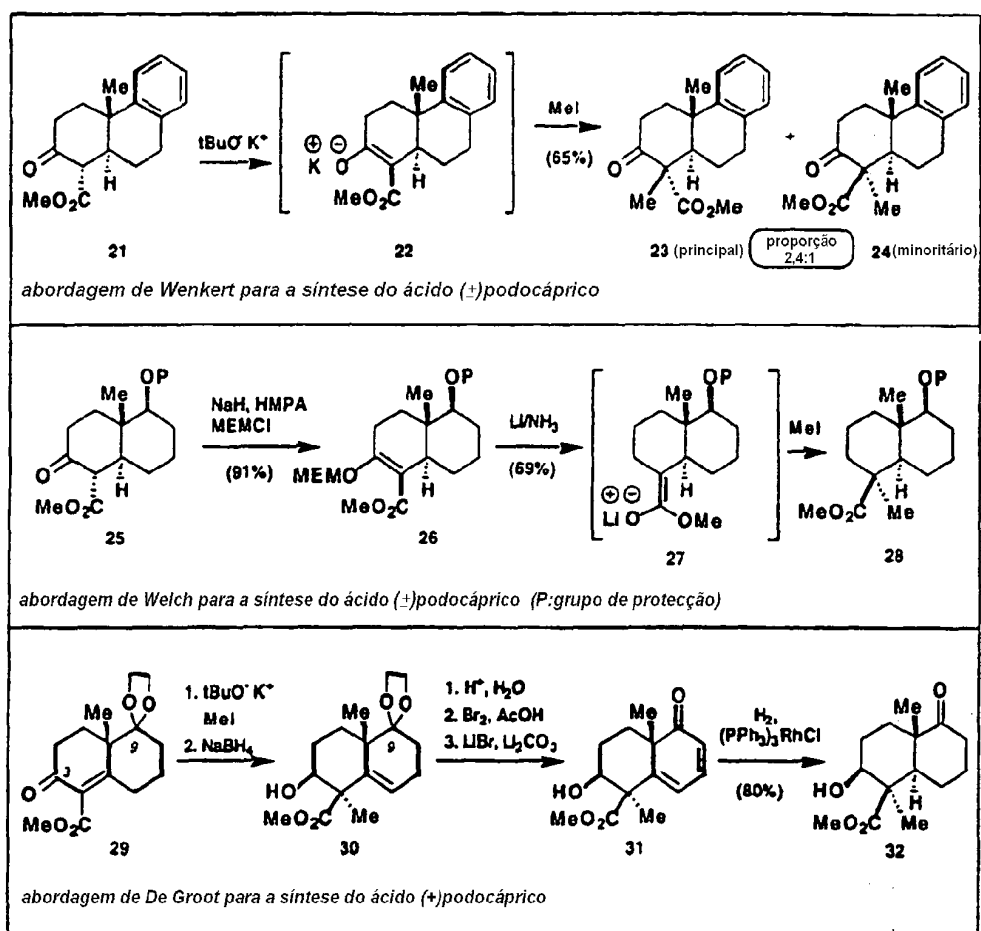


Figura 3

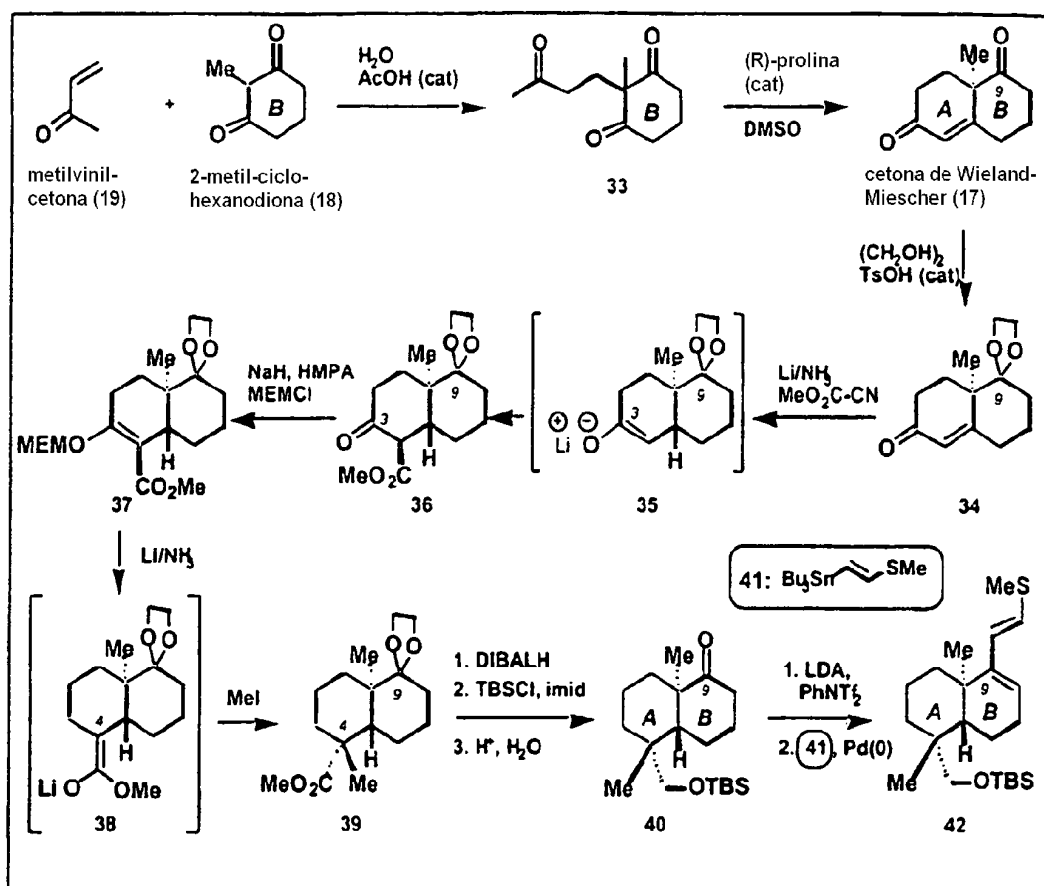


Figura 4

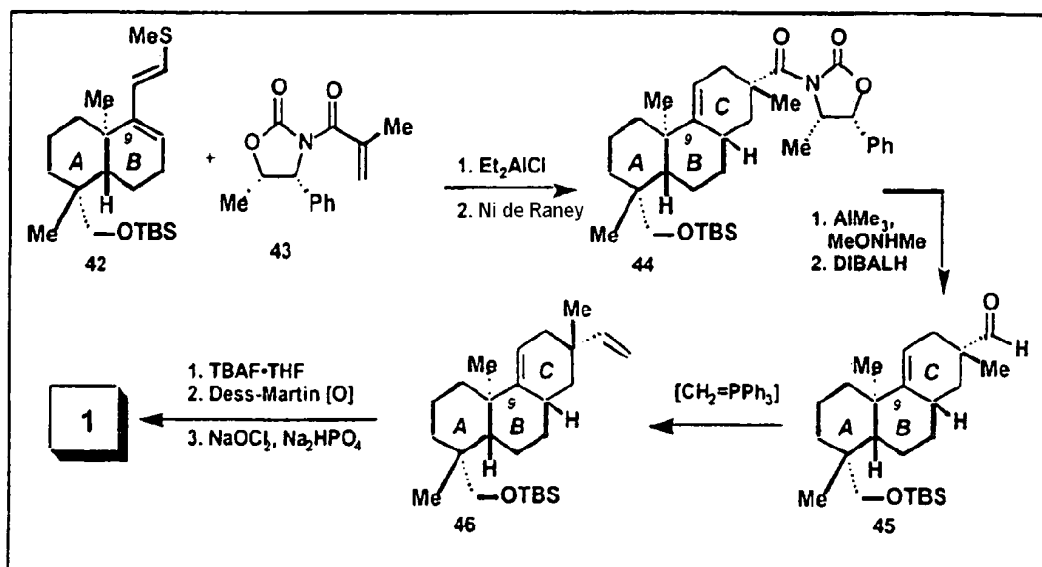


Figura 5

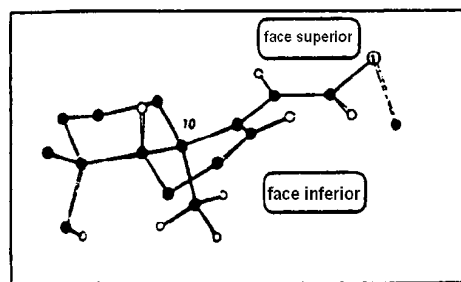


Figura 6

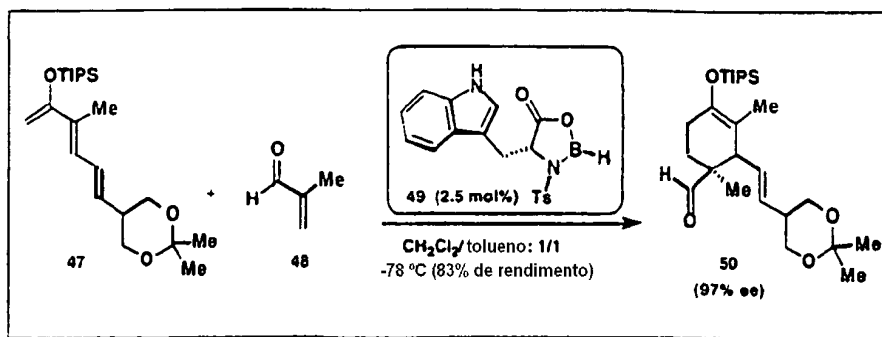


Figura 7

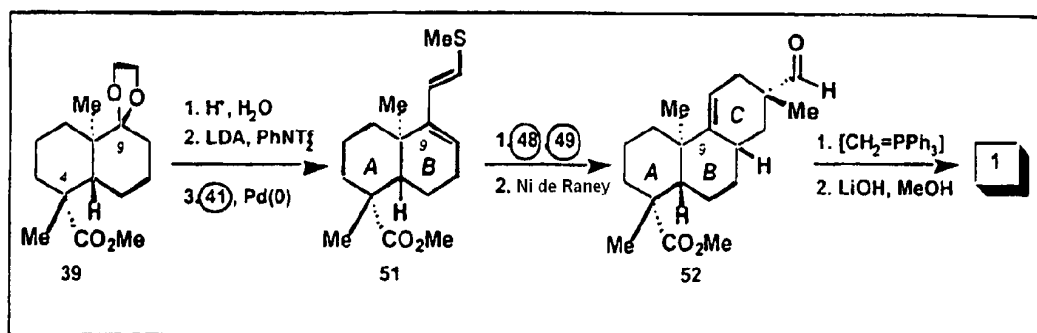


Figura 8

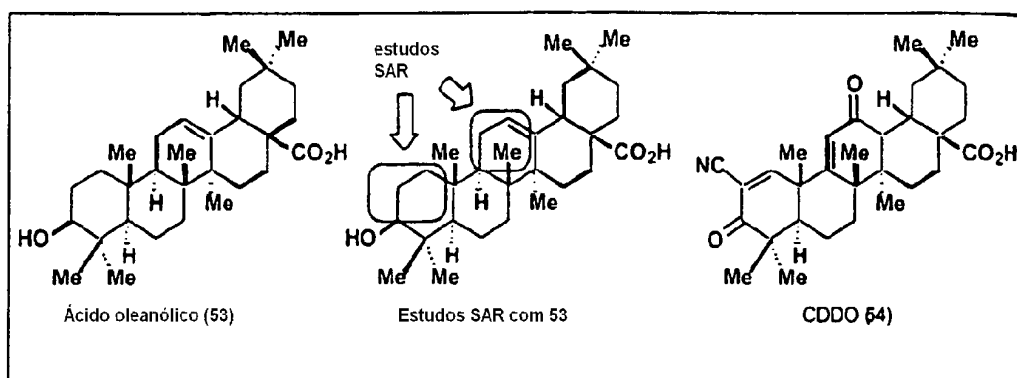
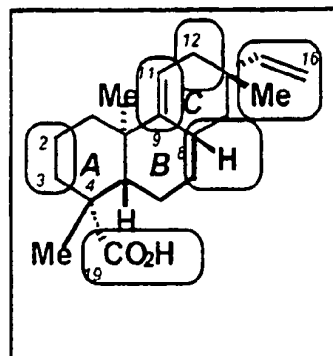


Figura 9

10/22



Figuras 10

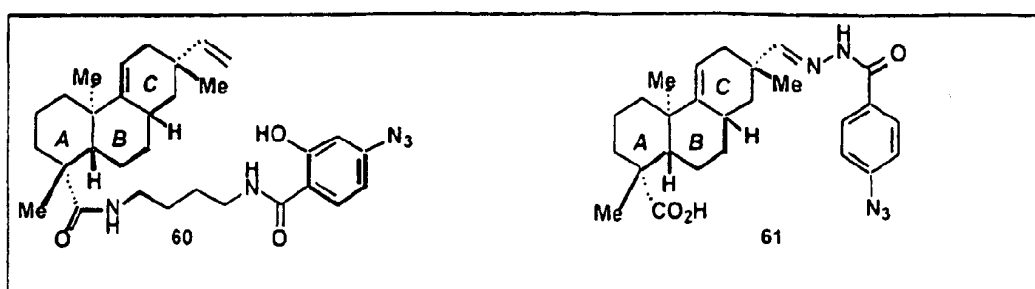


Figura 12

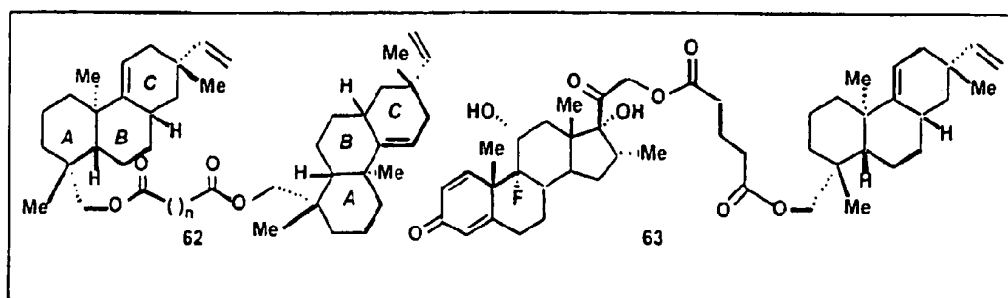


Figura 13

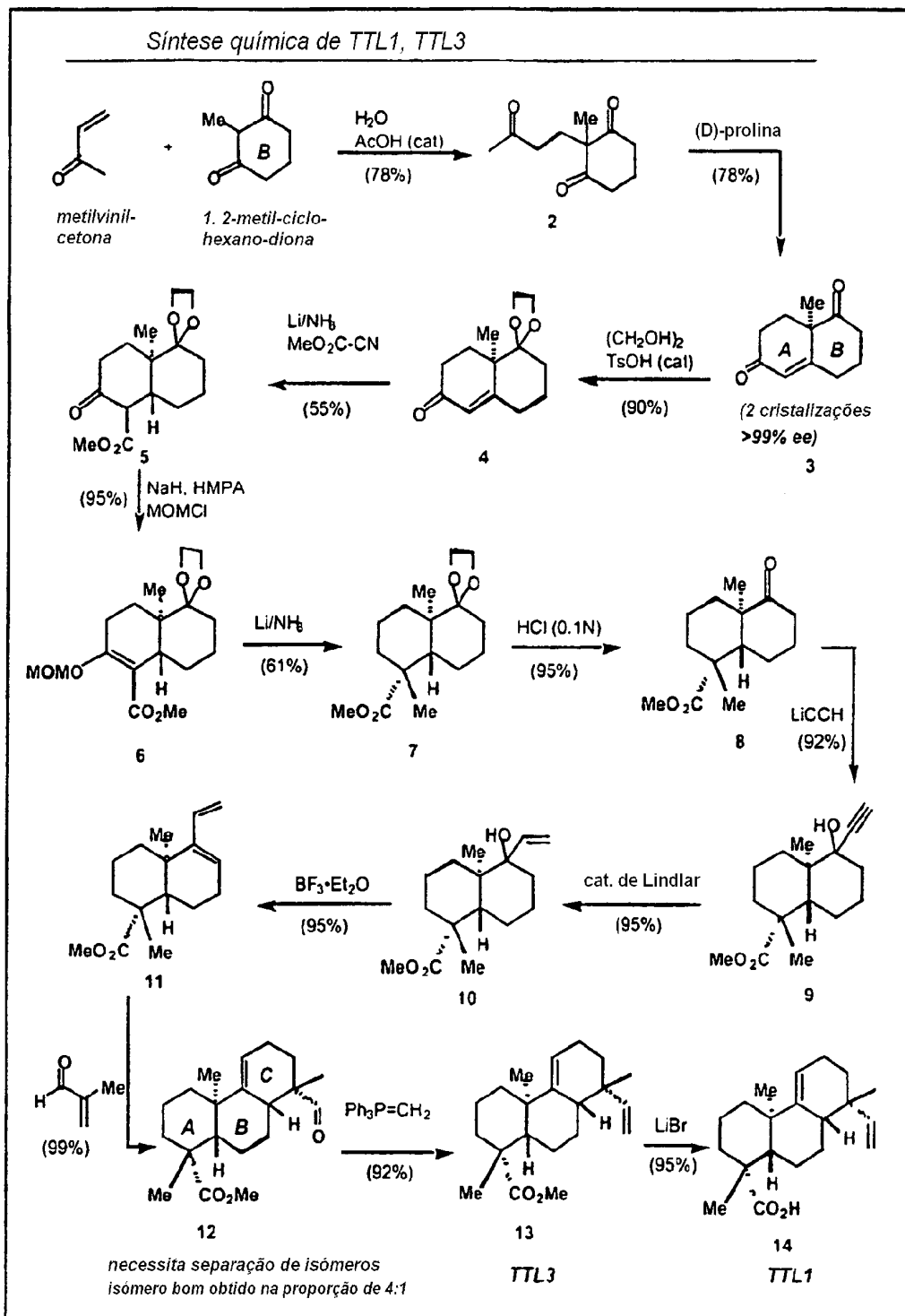


Figura 14

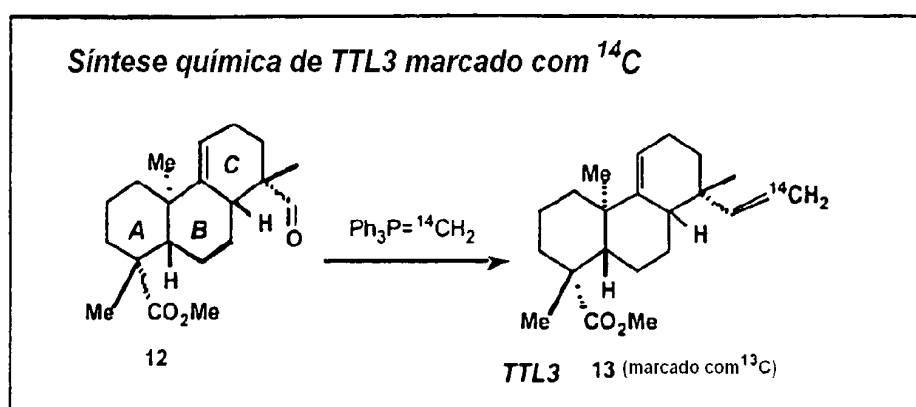


Figura 15

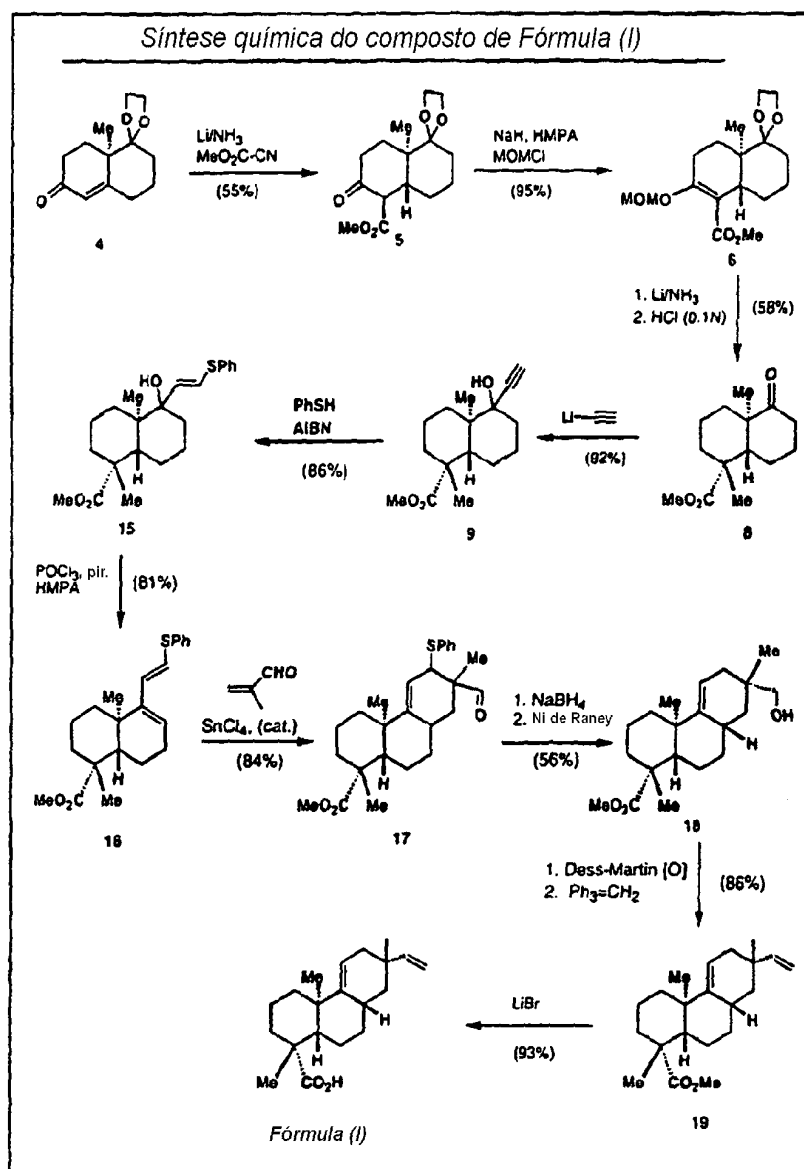


Figura 16

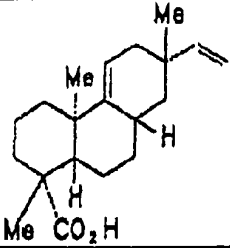
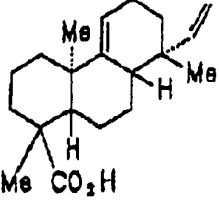
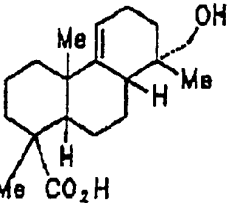
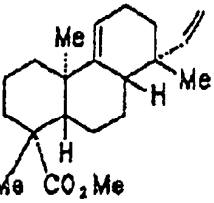
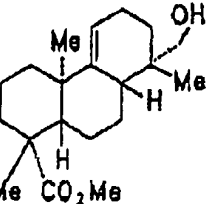
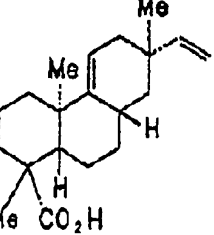
NPI 1302			
TTL1		$C_{20}H_{30}O_2$ M. Mol.: 302,45	2,9 mg
TTL2		$C_{19}H_{30}O_3$ M. Mol.: 306,44	2,5 mg
TTL3		$C_{21}H_{32}O_2$ M. Mol.: 316,48	1,8 mg
TTL4		$C_{20}H_{32}O_3$ M. Mol.: 320,47	2,1mg
TTL5		$C_{20}H_{30}O_2$ M. Mol.: 302,45 misturas de diastereómeros 1:1 a °C	1,2mg

Figura 17

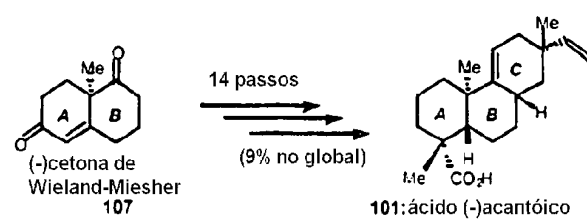


Figura 18

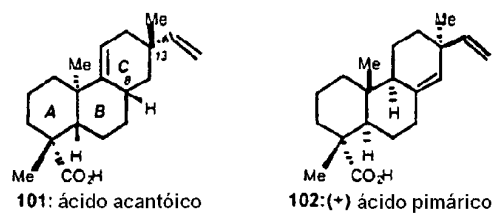


Figura 19

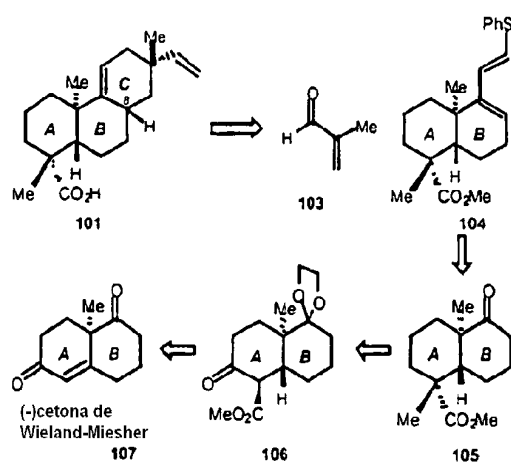


Figura 20

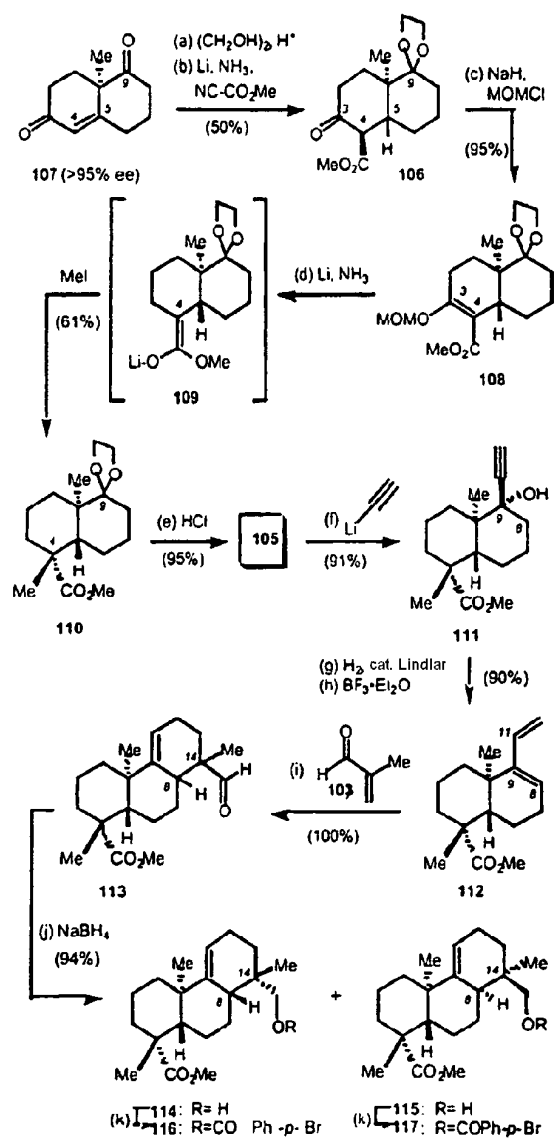


Figura 21

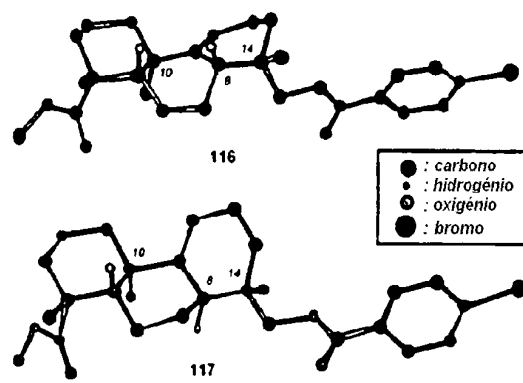


Figura 22

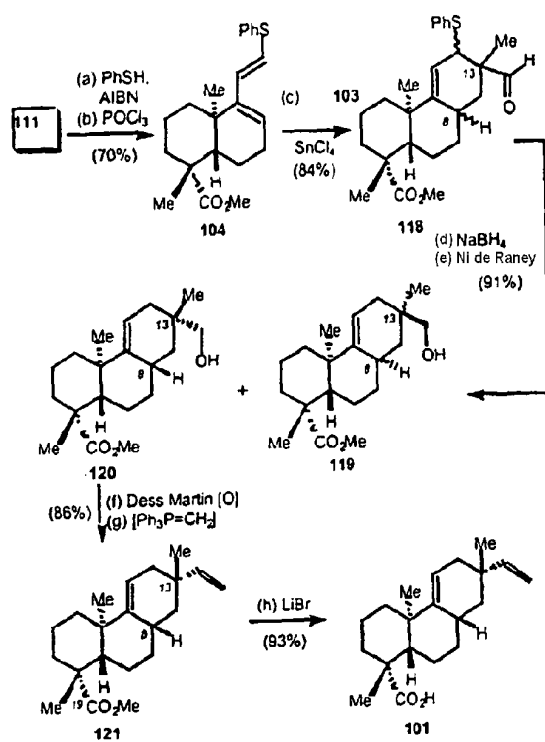


Figura 23