



INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1313695 E**

(51) Classificação Internacional:

**C07C 229/22** (2006.01) **A61K 31/195** (2006.01)

**A61K 49/00** (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: <b>2001.07.25</b>	(73) Titular(es): <b>PHOTOCURE ASA</b>	
(30) Prioridade(s): <b>2000.07.27 GB 0018528</b>	<b>HOFFSVEIEN 48 0377 OSLO</b>	<b>NO</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2003.05.28</b>	(72) Inventor(es): <b>JO KLAVENESS</b>	<b>NO</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2006.12.27</b>	<b>NILS, OLAV NILSEN</b>	<b>NO</b>
<b>001/2007</b>	<b>JON, ERIK BRAENDEN</b>	<b>NO</b>
	<b>ASLAK GODAL</b>	<b>NO</b>
	(74) Mandatário: <b>PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA</b>	
	<b>RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1350-232 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **ÉSTERES DO ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO COMO AGENTES  
FOTOSENSIBILIZADORES EM FOTOQUIMIOTERAPIA**

(57) Resumo:

## RESUMO

### **"ÉSTERES DO ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO COMO AGENTES FOTOSENSIBILIZADORES EM FOTOQUIMIOTERAPIA"**

A invenção proporciona compostos para utilização em fotoquimioterapia ou diagnóstico, sendo os referidos compostos ésteres alquílicos ramificados ou ésteres alquílicos substituídos do ácido 5-aminolevulínico, ou derivados ou os seus sais farmacologicamente aceitáveis. Em especial, a invenção proporciona compostos de fórmula (I):  $R^2_2N-CH_2COCH_2CH_2CO-OR^1$  (em que  $R^1$  representa um grupo alquilo (e. g.,  $C_{5-30}$  alquilo) ramificado, opcionalmente substituído, ou um grupo alquilo substituído;  $R^2$ , que podem ser iguais ou diferentes, representam um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo opcionalmente substituído, de um modo preferido um grupo  $R^1$ ; em que os referidos substituintes são seleccionados de grupos hidroxilo, alcóxido, acilóxido, alcóxicarbonilóxido, amino, arilo, nitro, oxo, fluoro,  $-SR^3$ ,  $-NR^3_2$  e  $PR^3_2$ , e cada grupo alquilo está opcionalmente interrompido por um ou mais grupos  $O-$ ,  $-NR^3-$ ,  $-S-$  ou  $-PR^3-$ ; e  $R^3$  representa um átomo de hidrogénio ou um grupo  $C_{1-6}$  alquilo) e os seus sais para utilização em diagnóstico e fotoquimioterapia de distúrbios e anomalias de superfícies externas ou internas do corpo, e produtos e kits para realização da invenção.

## **DESCRIÇÃO**

### **"ÉSTERES DO ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO COMO AGENTES FOTOSSENSIBILIZADORES EM FOTOQUIMIOTERAPIA"**

A presente invenção refere-se a novos derivados do ácido 5-aminolevulínico (ALA) e em especial com ésteres de ALA e à sua utilização como agentes fotossensibilizadores na fotoquimioterapia ou diagnóstico.

A fotoquimioterapia, ou terapêutica fotodinâmica (PDT) como também é conhecida, é uma técnica para o tratamento de várias anomalias ou distúrbios da pele, outros órgãos ou epiteliais ou mucosas, especialmente cancros ou lesões pré-cancerosas, bem como certas lesões não malignas, por exemplo queixas da pele, tal como psoríase. A fotoquimioterapia envolve a aplicação de agentes fotossensibilizadores (fotoquimioterapêuticos) na área afectada do corpo, seguida por exposição a radiação fotoactivadora de forma a activar os agentes fotossensibilizadores e convertê-los em forma citotóxica, com o que as células afectadas são mortas ou diminuído o seu potencial proliferativo.

É conhecida uma gama de agentes fotossensibilizadores, incluindo nomeadamente os psoralenos, as porfirinas, as clorinas e as ftalocianinas. Esses fármacos tornam-se tóxicos quando expostos a radiação.

Os fármacos fotossensibilizadores podem exercer os seus efeitos por uma variedade de mecanismos, directamente ou indirectamente. Assim, por exemplo, certos fotossensibilizadores

tornam-se directamente tóxicos quando activados por radiação, enquanto que outros actuam para gerar espécies tóxicas, *e. g.*, agentes oxidantes, tais como oxigénio singuleto ou outros radicais livres derivados de oxigénio, que são extremamente destrutivos para material celular e biomoléculas tais como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Os psoralenos são um exemplo de fotossensibilizadores de actuação directa; por exposição à luz formam adutos e reticulação entre duas cadeias de moléculas de ADN, inibindo assim a síntese do ADN. Infelizmente o risco desta terapêutica é que podem ocorrer efeitos secundários mutagénicos e carcinogénicos indesejados.

Esta desvantagem pode ser evitada por selecção de fotossensibilizadores com um modo de acção alternativo, indirecto. Por exemplo as porfirinas, que actuam indirectamente por geração de espécies de oxigénio tóxicas, não têm efeitos secundários mutagénicos e representam candidatos mais favoráveis para a fotoquimioterapia. As porfirinas são precursores de ocorrência natural na síntese do heme. Em especial, o heme é produzido quando ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) é incorporado na protoporfirina IX ( $\text{P}_p$ ) por acção da enzima ferroquelatase. A  $\text{P}_p$  é um fotossensibilizador extremamente potente, enquanto que o heme não tem efeito fotossensibilizador.

Um desses fármacos à base de porfirina, Photofrin<sup>®</sup>, foi aprovado recentemente como fotossensibilizador na terapêutica de certos cancros. A principal desvantagem é que uma vez que tem de ser administrado parentericamente, geralmente intravenosamente, provoca fotossensibilização da pele que pode durar várias semanas depois da injeção i.v. O Photofrin consiste em grandes oligómeros de porfirina e não penetra prontamente na pele quando

aplicado topicamente. Há problemas semelhantes com outros fotossensibilizadores à base de porfirinas, tal como o chamado "derivado de hematoporfirina" (Hpd) que também foi descrito para utilização na fotoquimioterapia do cancro (ver por exemplo S. Dougherty. *J. Natl. Cancer Ins.*, 1974, **52**:1333; Kelly e Snell, *J. Urol.*, 1976, **115**:150). O Hpd é uma mistura complexa obtida por tratamento de hematoporfirina com os ácidos acético e sulfúrico, após o que o produto acetilado é dissolvido com álcali.

Para superar estes problemas, foram investigados precursores de Pp quanto ao potencial fotoquimioterapêutico. Em especial o precursor de Pp ácido 5-aminolevulínico (ALA) foi investigado como agente fotoquimioterapêutico para certos cancros da pele. O ALA, que é formado a partir de succinil CoA e glicina no primeiro passo da síntese do heme, é, em extensão limitada, capaz de penetrar na pele e levar a uma acumulação localizada de Pp; uma vez que a acção de ferroquelatase (a enzima metalante) é o passo limitante da velocidade na síntese do heme, um excesso de ALA leva à acumulação de Pp, o agente fotossensibilizador. Assim, por aplicação de ALA topicamente em tumores da pele, e depois de várias horas de exposição dos tumores à radiação, pode obter-se um efeito fotoquimioterapêutico vantajoso (ver, por exemplo, o documento W091/01727). Uma vez que a pele que cobre os basiliomas e os carcinomas de células escamosas é mais facilmente penetrada por ALA do que a pele saudável e uma vez que a concentração de ferroquelatase é baixa em tumores da pele, verificou-se que a aplicação tópica de ALA leva a uma produção selectivamente aumentada de Pp em tumores.

Contudo, a fotoquimioterapia com ALA não é sempre inteiramente satisfatória. O ALA não é capaz de penetrar em todos os tumores e outros tecidos com eficácia suficiente para permitir

tratamento de uma ampla gama de tumores ou outros estados e o ALA também tende a ser instável em formulações farmacêuticas. Estes problemas têm em grande medida sido ultrapassados pela utilização de ésteres alquílicos não substituídos de cadeia linear de ALA que apresentam selectividade melhorada para tecido anormal, localização não sistémica de agentes administrados, absorção e produção de PpIX melhoradas, e sensação de dor reduzida na administração (ver o documento WO96/28412).

Na base de dados Xfire, as entradas 3060978, 5347132, 5499790, 5620924, 5633390, 5991317 e 6517740 (Beilstein); Cosmo Sogo Kenkyusho KK, Patent Abstracts of Japan, Vol 16; N° 156 (C-0930), 16.4.1992; EP-A-316179 (Tokuyama Soda KK); GB-A-2058077 (Hudson *et al.*) e DE-A-2411382 (Boehringer Sohn Ingelheim) descrevem derivados ésteres alquílicos do ácido 5-aminolevulínico, e derivados e os seus sais e processos para a sua preparação.

Contudo, estes compostos ainda apresentam algumas limitações para utilização como fármacos em PDT, *e. g.*, eficácia relativa baixa, e por isso existe uma necessidade de agentes fotoquimioterapêuticos alternativos, em especial agentes fotoquimioterapêuticos que apresentem eficácia melhorada em relação aos conhecidos na matéria.

A presente invenção é dirigida a esta necessidade e em especial tem como objectivo proporcionar agentes fotoquimioterapêuticos que são fármacos melhores, *i. e.*, que têm um efeito fotoquimioterapêutico acrescido em relação aos descritos na técnica anterior.

Verificou-se agora que uma classe de ésteres de ALA

derivatizados, compreendendo essencialmente ésteres benzílicos substituídos de ALA, são adequados para utilização em fotoquimioterapia. Em especial, verificou-se que certos desses compostos, surpreendentemente, proporcionam propriedades de PDT acrescidas extremamente vantajosas em comparação com compostos conhecidos.

Assim, visto deste aspecto a invenção proporciona um composto para utilização em fotoquimioterapia ou diagnóstico, em que o referido composto tem a fórmula geral I:



(em que  $\text{R}^1$  representa um grupo  $\text{C}_1$  ou  $\text{C}_2$  alquilo substituído por um ou mais grupos arilo; e

$\text{R}^2$  representa, independentemente, um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo opcionalmente substituído) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

Tal como aqui utilizado, o termo "alquilo", salvo indicação em contrário, inclui qualquer grupo hidrocarboneto alifático saturado ou insaturado, de cadeia longa ou curta, de cadeia cíclica, linear ou ramificada. Os grupos alquilo insaturados podem ser mono- ou poli-insaturados e incluem tanto o grupo alcenilo como alcinilo. Salvo indicação em contrário, esses grupos podem conter até 40 átomos. Contudo são preferidos os grupos alquilo com até 10, de um modo preferido até 8, de um modo particularmente preferido até 6, de um modo especialmente preferido até 4 átomos de carbono.

Os grupos alquilo substituídos  $R^1$  podem estar mono ou poli-substituídos.

O termo "acilo", tal como aqui utilizado, inclui grupos carboxilato e carbonato, assim os grupos alquilo substituídos com aciloxilo incluem por exemplo alquilcarboniloxi alquilo. Nesses grupos quaisquer unidades alcileno de um modo preferido têm o teor de átomos de carbono aqui definido para os grupos alquilo.

Os grupos alquilo substituídos  $R^1$  que estão presentes em compostos de fórmula I incluem  $C_{1-2}$  alquilo (e. g., metilo) substituído (de um modo preferido substituído terminalmente) por um grupo arilo. Os grupos arilo preferidos incluem fenilo, difenilo e monocíclico com 5-7 membros, e. g., com 5 ou 6 membros, heteroaromáticos, especialmente fenilo e esses grupos podem eles próprios estar opcionalmente substituídos, por exemplo por um ou mais (e. g., um ou dois) grupos  $C_{1-6}$  alquilo (de um modo preferido  $C_{1-4}$  alquilo, e. g., metilo), grupos alcóxido (e. g., metóxido), nitro, fluoro, cloro ou trifluorometilo. Os grupos heteroaromáticos adequados incluem os que contêm pelo menos um heteroátomo seleccionado de oxigénio, enxofre e azoto. Um grupo heteroaromático preferido é a piridina.

Num aspecto particularmente preferido  $R^1$  representa: um grupo  $C_1$  ou  $C_2$  alquilo substituído por arilo, em que de um modo preferido o referido grupo arilo está substituído, de um modo especialmente preferido está substituído por um ou mais grupos alquilo (e. g.,  $C_{1-2}$  alquilo), alcóxido (e. g., metóxido), fluoro, cloro, nitro ou trifluorometilo.

Num aspecto adicional, a presente invenção proporciona compostos novos. Assim a presente invenção proporciona compostos



de fórmula I,



(em que  $R^1$  representa um grupo  $C_1$  ou  $C_2$  alquilo substituído por arilo, em que o referido grupo arilo está substituído;  $R^2$ , que podem ser iguais ou diferentes, representam um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo opcionalmente substituído;

em que os referidos substituintes são seleccionados de grupos hidroxilo, alcoxilo, aciloxilo, alcoxycarboniloxilo, amino, arilo, nitro, oxo, fluoro,  $-SR^3$ ,  $-NR^3_2$  e  $-PR^3_2$ ,

e o referido grupo alquilo está opcionalmente interrompido por um ou mais grupos  $-O-$ ,  $-NR^3-$ ,  $-S-$  ou  $-PR^3-$ ; e

$R^3$  representa um átomo de hidrogénio ou um grupo  $C_{1-6}$ alquilo) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

De um modo preferido  $R^2$  são ambos átomos de hidrogénio e assim, num aspecto preferido, a invenção proporciona ésteres benzílicos substituídos de ALA que podem ser utilizados em métodos da invenção.

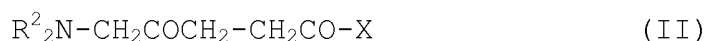
Assim, compostos preferidos da invenção ou para utilização em métodos da invenção compreendem éster benzílico de ALA, éster p-metilbenzílico de ALA, éster p-nitrobenzílico de ALA, éster p-[trifluorometil]benzílico de ALA, éster p-fluorobenzílico de ALA, éster 4-clorobenzílico de ALA, éster 3-metilbenzílico de ALA e éster 2-metilbenzílico de ALA.

Os compostos da invenção ou para utilização na invenção

podem ser preparados utilizando processos e procedimentos correntes bem conhecidos na matéria para derivatização de compostos multifuncionais, e, especialmente, esterificação. Como é conhecido na matéria, essa esterificação de compostos pode envolver protecção e desprotecção de grupos apropriados de forma que só os grupos necessários permanecem activos e tomam pmatéria na reacção nas condições de esterificação. Assim, por exemplo, os substituintes de alcanóis substituídos utilizados para preparar os ésteres podem ser protegidos durante a esterificação. Analogamente o grupo  $\text{NR}_2^2$  do composto que contribui com este grupo para os compostos de fórmula I pode ser protegido durante a reacção e desprotegido depois dela. Esses processos de protecção/desprotecção são bem conhecidos na matéria para a preparação de derivados, e em especial, de ésteres de aminoácidos bem conhecidos, ver por exemplo Mcomie em "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum, 1973 e T. W. Greene em "Protective Groups in Organic Chemistry", Wiley-Interscience, 1981.

Num aspecto adicional, a presente invenção proporciona um processo para a preparação de compostos de fórmula I, processo esse que compreende, pelo menos, um dos seguintes passos:

(a) reacção de um composto de fórmula II



(em que X representa um grupo de saída, por exemplo um grupo hidroxilo, um átomo de halogéneo ou grupo alcoxilo ou COX representa um grupo anidrido de ácido e  $\text{R}^2$  é como aqui definido anteriormente)

com um composto de fórmula III



(em que  $\text{R}^1$  é como aqui definido anteriormente); e

(b) conversão de um composto de fórmula I num seu sal farmacêuticamente aceitável.

A reacção do passo (a) pode ser convenientemente realizada num solvente ou mistura de solventes tais como água, acetona, éter dietílico, metilformamida, tetra-hidrofurano, etc., a temperaturas até ao ponto de ebulição da mistura, de um modo preferido a temperaturas ambientes.

As condições das reacções de esterificação dependerão do álcool utilizado e as condições podem ser escolhidas de modo a ser obtido o rendimento máximo do éster. Uma vez que as reacções de esterificação são reacções de equilíbrio reversíveis, as condições reaccionais podem ser seleccionadas de modo a ser obtido o rendimento máximo do produto éster. Essas condições podem ser obtidas por selecção de um solvente que é capaz de remover a água formada numa reacção de esterificação típica por formação de um azeótropo com água. Esses solventes são exemplificados por hidrocarbonetos aromáticos ou outros capazes de formar azeótropos com água, e. g., alguns hidrocarbonetos clorados tal como o clorofórmio. Para a formação dos ésteres inferiores de 5-ALA a reacção no equilíbrio pode ser deslocada no sentido do éster por utilização de um grande excesso do álcool. Com outros ésteres o equilíbrio pode ser deslocado no sentido do produto éster por utilização de um grande excesso do ácido.

As reacções de esterificação são bem conhecidas na matéria, por exemplo, como descrito por Saul Patai em "The chemistry of the carboxylic acids and esters", (Ch. 11, p. 505, Interscience 1969) e Houben Weyl (Methoden der Organische Chemie, Band E5, "Carbonsauren und carbonsauren-derivate", p. 504, Georg Thieme Verlag, 1985). A formação de derivados de aminoácidos está descrita em Band XI/2 da mesma série (Houben Weyl, Methoden der Organische Chemie, Band XI/2, "Stickstoffverbindungen", p. 269, Georg Thieme Verlag, 1958).

A reacção do passo (a) será convenientemente realizada na presença de um catalisador, e, g., um ácido inorgânico ou orgânico ou um agente que se liga a ácidos tal como uma base.

Os compostos utilizados como materiais de partida são conhecidos da literatura e, em muitos casos, estão disponíveis comercialmente, ou podem ser obtidos utilizando métodos conhecidos *per se*. O ALA, por exemplo, está disponível da Sigma ou de Photocure ASA, Oslo, Noruega.

Como referido acima, os compostos da invenção ou para utilização de acordo com a invenção podem tomar a forma de sais farmaceuticamente aceitáveis. Esses sais, de um modo preferido, são sais de adição de ácidos com ácidos orgânicos ou inorgânicos fisiologicamente aceitáveis. Os ácidos adequados incluem, por exemplo, os ácidos clorídricos, bromídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, láctico, cítrico, tartárico, succínico, maleico, fumárico e ascórbico. Os sais hidrófobos também podem ser convenientemente produzidos por exemplo por precipitação. Os sais apropriados incluem por exemplo os sais acetato, brometo, cloreto, citrato, cloridrato, maleato, mesilato, nitrato, fosfato, sulfato, tartarato, oleato, estearato, tosilato, de

cálcio, meglumina, de potássio e de sódio. Os processos para a formação de sais são convencionais na matéria.

Como referido acima, os compostos da invenção e para utilização de acordo com a invenção e os seus sais têm propriedades farmacológicas valiosas, nomeadamente propriedades fotossensibilizadoras que os tornam úteis como agentes fotoquimioterapêuticos.

Um aspecto adicional da presente invenção, em conformidade, proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um composto, tal como aqui descrito anteriormente, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, conjuntamente com, pelo menos, um veículo ou excipiente farmacêutico.

Ainda noutro aspecto, também é proporcionada a utilização de um composto tal como aqui descrito anteriormente, ou de um seu sal farmaceuticamente aceitável, para a preparação de um agente terapêutico para utilização em fotoquimioterapia, ou um agente de diagnóstico para utilização em diagnóstico e, especialmente, para o tratamento de distúrbios ou anomalias de superfícies externas ou internas do corpo que respondem a fotoquimioterapia.

As anomalias e distúrbios que podem ser tratadas de acordo com a presente invenção incluem quaisquer anomalias ou distúrbios malignos, pré-malignos e não malignos que respondem a fotoquimioterapia e. g., tumores ou outras proliferações, distúrbios da pele tais como psoríase ou queratoses actínicas e acne, abrasões da pele, e outras distúrbios ou infecções e. g., infecções bacterianas, virais ou fúngicas, por exemplo infecções pelo vírus do Herpes. A invenção é particularmente adequada para o tratamento de distúrbios, distúrbios ou anomalias em que são

formadas lesões discretas nas quais as composições podem ser aplicadas directamente (lesões é aqui utilizado num sentido lato para incluir tumores e outros semelhantes).

As superfícies corporais internas e externas que podem ser tratadas de acordo com a invenção incluem a pele e todas as outras superfícies epiteliais e serosas, incluindo, por exemplo, mucosas, os revestimentos de órgãos e. g., dos tractos respiratório, gastro-intestinal e genito-urinário, e glândulas com canais que se esvaziam sobre essas superfícies (e. g., fígado, folículos capilares com glândulas sebáceas, glândulas mamárias, glândulas salivares e vesículas seminais). Para além da pele, essas superfícies incluem, por exemplo, o revestimento da vagina, o endométrio e o urotélio. Essas superfícies também podem incluir cavidades formadas no corpo após extirpação de tecido doente ou canceroso e. g., cavidades do cérebro na sequência da extirpação de tumores tais como gliomas.

Superfícies exemplificativas incluem assim: (i) pele e conjuntiva; (ii) o revestimento da boca, faringe, esófago, estômago, intestinos e apêndices intestinais, recto e canal anal; (iii) o revestimento das vias nasais, seios nasais, nasofaringe, traqueia, brônquios e bronquíolos; (iv) O revestimento dos ureteres, bexiga urinária e uretra; (v) o revestimento da vagina, colo do útero e útero; (vi) a pleura parietal e visceral; (vii) o revestimento das cavidades peritoneal e pélvica, e a superfície dos órgãos contidos nessas cavidades; (viii) a *dura mater* e meninges; (ix) quaisquer tumores em tecidos sólidos que possam ser tornados acessíveis a radiação fotoactivante e. g., quer directamente, no momento da cirurgia, ou por meio de uma fibra óptica inserida através de uma agulha.

As composições da invenção podem ser formuladas de modo convencional, com um ou mais veículos ou excipientes fisiologicamente aceitáveis, de acordo com técnicas bem conhecidas na matéria. Quando apropriado, num aspecto preferido da invenção, os compostos ou composições de acordo com a invenção são esterilizados, e. g., por irradiação  $\gamma$ , autoclavagem ou esterilização térmica, antes ou após a adição de um veículo ou excipiente quando está presente, para proporcionar formulações estéreis.

As composições podem ser administradas topicamente, oralmente ou sistemicamente. São preferidas as composições tópicas, e incluem geles, cremes, pomadas, produtos para pulverização, loções, bálsamos, bastões, sabões, pós, pessários, aerossóis, gotas, soluções e quaisquer das outras formas farmacêuticas convencionais na matéria.

As pomadas, geles e cremes podem, por exemplo, ser formulados com uma base aquosa ou oleosa com a adição de agentes espessantes e/ou gelificantes adequados. As loções podem ser formuladas com uma base aquosa ou oleosa e em geral conterão também um ou mais agentes emulsionantes, dispersantes, de suspensão, espessantes ou corantes. Os pós podem ser formados com a ajuda de qualquer base em pó adequada. As gotas e soluções podem ser formuladas com uma base aquosa ou não aquosa compreendendo também um ou mais agentes de dispersão, solubilizantes ou de suspensão. Os produtos em aerossol são convenientemente administrados a partir de embalagens pressurizadas, com a utilização de um propulsor adequado.

Alternativamente, as composições podem ser proporcionadas numa forma adaptada para administração oral ou parentérica, por

exemplo, por injeção intradérmica, subcutânea, intraperitoneal ou intravenosa. As formas farmacêuticas alternativas incluem assim comprimidos simples ou revestidos, cápsulas, suspensões e soluções contendo o componente activo opcionalmente conjuntamente com um ou mais veículos e/ou diluentes inertes convencionais, e. g., com amido de milho, lactose, sacarose, celulose microcristalina, estearato de magnésio, polivinilpirrolidona, ácido cítrico, ácido tartárico, água, água/etanol, água/glicerol, água/sorbitol, água/ polietilenoglicol, propileneglicol, álcool estearílico, carboximetilcelulose ou substâncias gordas tais como gordura sólida ou as suas misturas adequadas.

As composições podem incluir adicionalmente agentes lubrificantes, agentes molhantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensão, agentes conservantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, intensificadores da adsorção, e. g., agentes de penetração em superfícies tais como os mencionados adiante, e outros semelhantes. As composições da invenção podem ser formuladas de modo a proporcionar libertação rápida, controlada ou retardada da substância activa após administração ao doente por utilização de processos bem conhecidos na matéria. Também se pode utilizar agentes solubilizantes e/ou estabilizantes, e. g., ciclodextrinas (CD)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e HP- $\beta$  ciclodextrina. As composições podem estar em qualquer forma de dosagem apropriada, por exemplo como uma emulsão ou em lipossomas, niossomas, microsferas, nanopartículas ou outras semelhantes. O composto da invenção pode então ser absorvido, incorporado ou ligado a estas formas.

A concentração dos compostos tal como aqui descritos anteriormente nas composições, depende da natureza do composto, da composição, do modo de administração, do estado a ser tratado e do doente e pode ser variada ou ajustada de acordo com a



escolha. Geralmente, contudo, são adequadas as gamas de concentração de 0,01 a 50%, e. g., 0,05 a 20%, e. g., 1-10% (p/p). Para aplicações terapêuticas foram consideradas adequadas as gamas de concentração de 0,1 a 50%, e. g., 0,2 a 30% (p/p). Pode utilizar-se doses menores quando os derivados preparados são altamente lipófilos, e. g., uma gama de concentrações de 0,01 a 10%, e. g., 0,02 a 1% (p/p).

A administração tópica a sítios inacessíveis pode ser conseguida por técnicas conhecidas na matéria, e. g., pela utilização de cateteres ou outros sistemas apropriados para administração de fármacos.

Após a administração na superfície, a área tratada é exposta a radiação para se obter o efeito fotoquimioterapêutico. O período de tempo após a administração em que tem lugar a exposição a radiação depende da natureza da composição, o estado a ser tratado e da forma de administração. Este geralmente pode ser da ordem de 0,5 a 48 horas, e. g., 1 a 10 horas.

A irradiação em geral será aplicada a um nível de dose de 40 a 200 Joules/cm<sup>2</sup>, por exemplo a 100 Joules/cm<sup>2</sup>.

O comprimento de onda da radiação utilizada para irradiação pode ser seleccionado para se conseguir um efeito fotoquimioterapêutico mais eficaz. Com vantagem, quando as porfirinas são utilizadas em fotoquimioterapia são irradiadas com radiação a cerca do máximo de absorção da porfirina. Assim, por exemplo no caso da utilização da técnica anterior de ALA na fotoquimioterapia do cancro da pele, utilizou-se comprimentos de onda na região de 350-640 nm, de um modo preferido 610-635 nm. Contudo, por selecção de uma gama ampla de comprimentos de onda

para irradiação, estendendo-se para além do máximo de absorção da porfirina, o efeito fotossensibilizador pode ser aumentado. Embora não querendo ficar limitado pela teoria, crê-se que isto é devido ao facto de quando a Pp, e outras porfirinas, são expostas a radiação com comprimentos de onda dentro do seu espectro de absorção, é degradada em vários foto-produtos incluindo em especial fotoprotoporfirina (PPp). A PPp é uma clorina e tem um considerável efeito fotossensibilizador; o seu espectro de absorção chega a comprimentos de onda mais longos para lá dos comprimentos de onda aos quais Pp absorve *i. e.*, até quase 700 nm (a Pp praticamente não absorve radiação acima de 650 nm). Assim, em fotoquimioterapia convencional, os comprimentos de onda utilizados não excitam a PPp e por isso não se obtém a vantagem do seu efeito fotossensibilizador adicional. Verificou-se que a irradiação com comprimentos de onda de radiação na gama de 500-700 nm é particularmente eficaz. É especialmente importante incluir os comprimentos de onda de 630 e 690 nm.

Um método de tratamento fotoquimioterapêutico de distúrbios ou anomalias de superfícies externas ou internas do corpo, compreende a administração nas áreas afectadas de uma composição tal como aqui definida anteriormente, e expôr as referidas superfícies a radiação, de um modo preferido a radiação na região de comprimentos de onda de 300-800 nm, por exemplo 500-700 nm.

Os métodos para irradiação de diferentes áreas do corpo, *e. g.*, por lâmpadas ou lasers são bem conhecidos na matéria (ver por exemplo Van den Bergh, *Chemistry in Britain*, May 1986 p. 430-439). Para regiões inacessíveis isto pode ser convenientemente conseguido utilizando fibras ópticas.

Os compostos da invenção ou para utilização na invenção

podem ser formulados e/ou administrados com outros agentes fotossensibilizadores, por exemplo ALA ou Photofrin®, ou com outros componentes activos que podem aumentar o efeito fotoquimioterapêutico. Por exemplo, agentes quelantes podem ser incluídos com vantagem para aumentar a acumulação de P<sub>p</sub>; a quelação de ferro pelos agentes quelantes impede a sua incorporação em P<sub>p</sub> para formar heme pela acção da enzima ferroquelatase, conduzindo assim a uma acumulação de P<sub>p</sub>. O efeito fotossensibilizador é assim aumentado.

Os agentes quelantes ácidos aminopolicarboxílicos são especialmente adequados para utilização a este respeito, incluindo quaisquer dos quelatos descritos na literatura para destoxificação de metais ou para a quelação de iões de metais paramagnéticos em agentes de contraste para imagiologia por ressonância magnética. Pode referir-se em particular EDTA, CDTA (ácido ciclo-hexano diamina tetraacético), DTPA e DOTA e os seus derivados/análogos bem conhecidos. É preferido EDTA. Para se conseguir o efeito quelante de ferro, também se pode utilizar desferrioxamina e outros sideróforos, e. g., em conjunção com agentes quelantes ácidos aminopolicarboxílicos tais como EDTA.

O agente quelante pode com vantagem ser utilizado numa concentração de 0,05 a 20% e. g., 0,1 a 10% (p/p).

Adicionalmente, verificou-se que os agentes que ajudam na penetração em superfícies e especialmente os sulfóxidos de dialquilo tais como sulfóxido de dimetilo (DMSO) podem ter um efeito vantajoso no aumento do efeito fotoquimioterapêutico. Isto está descrito em pormenor no documento W095/07077.

O agente que ajuda na penetração em superfícies pode ser

qualquer dos agentes que ajudam na penetração da pele descritos na literatura farmacêutica e. g., quelantes (e. g., EDTA), tensoactivos (e. g., dodecil sulfato de sódio), não tensoactivos, sais biliares (e. g., desoxicolato de sódio) e ácidos gordos (e. g., ácido oleico). Exemplos de agentes que ajudam na penetração em superfícies apropriados incluem HPE-101 (disponível de Hisamitsu), DMSO e outros sulfóxidos de dialquilo, em especial sulfóxido de n-decilmétilo (NDMS), dimetilsulfacetamida, dimetilformamida (DMFA), dimetilacetamida, glicóis, vários derivados de pirrolidona (Woodford et al., *J. Toxicol. Cut. & Ocular Toxicology*, 1986, **5**:167-177) e Azone<sup>®</sup> (Stoughton et al., *Drug Dpv. Ind. Pharm.* 1983, **9**:725-744), ou as suas misturas.

É contudo preferido o DMSO devido às suas actividades anti-histamínica e anti-inflamatória e ao seu efeito estimulador da actividade das enzimas ALA-sintase e ALA-desidrogenase (as enzimas que, respectivamente, formam e condensam ALA ao porfobilinogénio) aumentando assim a formação da forma activa, Pp.

O agente de penetração em superfícies pode com vantagem ser proporcionado numa gama de concentrações de 0,2 a 50% (p/p), e. g., cerca de 10% (p/p).

As composições da invenção ou utilizadas de acordo com a invenção podem adicionalmente ser formuladas e/ou administradas com outros agentes, para melhorar a eficácia da PDT. Além disso, quando se trata tumores por exemplo, pode utilizar-se inibidores da angiogénese (fármacos anti-angiogénicos) que se verificou serem úteis para tratamento de tumores (O'Reilly et al., *Nature Medicine*, **2**, p. 689-692, 1996; Yamamoto et al., *Anticancer Research*, **14**, p. 1-4, 1994; e Brooks et al., *J. Clin. Invest.*,

96, p. 1815-1822, 1995) conjuntamente com as composições da invenção em PDT para lesionar mais o sistema vascular do tumor. Os inibidores da angiogénese que podem ser utilizados incluem TNP-470 (AGM-1470, um análogo sintético de um produto de secreção fúngica chamado fumagilina; Takeda Chemical Industries Ltd., Osaka, Japão), angiostatina (Surgical Research Lab. no Children's Hospital Medical Center da Harvard Medical School) e antagonistas de integrina  $\alpha_v\beta_3$  (e.g. anticorpo monoclonal de integrina  $\alpha_v\beta_3$ , The Scripps Research Institute, LaJolla, CA).

Alternativamente, ou adicionalmente, pode utilizar-se agentes imunoterapêuticos (e.g., anticorpos ou efectores tais como factor activante de macrófagos) ou agentes quimioterapêuticos para melhorar a PDT de acordo com a invenção. A administração destes agentes suplementares deve ser realizada em termos de via, concentração e formulação, de acordo com métodos conhecidos para utilização destes agentes. Estes agentes adicionais podem ser administrados antes, depois ou durante a PDT, dependendo da sua função. Por exemplo, os inibidores de angiogénese podem ser adicionados 5 a 10 dias após a PDT para impedir o recrescimento de tumores.

Outros agentes anti-cancro podem ser utilizados analogamente em associação com uma composição da invenção, quer como matéria da formulação ou como um tratamento separado a ser administrado simultaneamente, separadamente ou sequencialmente.

Verificou-se que a glucose também auxilia a PDT quando aplicada topicamente ou sistemicamente. Embora não querendo ficar limitados pela teoria, parece que a administração de glucose resulta num abaixamento do pH que aumenta as propriedades hidrófobas de protoporfirinas, e.g., ALA, de tal modo que podem

penetrar mais facilmente nas células. Quando é contemplada a administração tópica, com vantagem a formulação, e. g., um creme, pode conter 0,01% a 10% de glucose (p/p).

De acordo com o estado a ser tratado, e a natureza da composição, os compostos para utilização na invenção podem ser co-administrados com esses outros agentes opcionais, por exemplo numa única composição ou podem ser administrados sequencialmente ou separadamente. De facto, em muitos casos pode ser obtido um efeito fotoquimioterapêutico especialmente vantajoso benéfico por pré-tratamento com o agente auxiliar de penetração em superfícies num passo separado, anterior à administração dos compostos para utilização na invenção.

Além disso, em algumas situações pode ser benéfico um pré-tratamento com o agente auxiliar de penetração em superfícies, seguido por administração do agente fotoquimioterapêutico em conjunto com o agente auxiliar de penetração em superfícies. Quando se utiliza um agente auxiliar de penetração em superfícies no pré-tratamento este pode ser utilizado em concentrações elevadas, e. g., até 100% (p/p). Se se utilizar esse passo de pré-tratamento, o agente fotoquimioterapêutico pode ser administrado subsequentemente até várias horas depois do pré-tratamento e. g., num intervalo de 5-60 minutos após o pré-tratamento.

Visto num aspecto adicional, a invenção proporciona assim um produto compreendendo um composto tal como aqui descrito anteriormente ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, conjuntamente com pelo menos um agente auxiliar de penetração em superfícies, e opcionalmente um ou mais agentes quelantes como uma preparação em associação para utilização simultânea, separada

ou sequencial no tratamento de distúrbios ou anomalias de superfícies externas ou internas do corpo que respondem a fotoquimioterapia.

De um ponto de vista alternativo, este aspecto da invenção também proporciona um kit para utilização em fotoquimioterapia de distúrbios ou anomalias de superfícies externas ou internas do corpo compreendendo:

- a) um primeiro recipiente contendo um composto tal como aqui descrito anteriormente ou um seu sal farmacologicamente aceitável,
- b) um segundo recipiente contendo pelo menos um agente auxiliar de penetração em superfícies; e opcionalmente
- c) um ou mais agentes quelantes contidos ou no referido primeiro recipiente ou num terceiro recipiente.

Quando o agente de penetração em superfícies é aplicado num passo de pré-tratamento separado, pode ser aplicado em concentrações mais altas, por exemplo até 100% (p/p).

Entender-se-á que o método de terapêutica utilizando compostos tal como aqui descritos anteriormente envolve inevitavelmente a fluorescência do distúrbio ou anomalia a ser tratado. Embora a intensidade desta fluorescência possa ser utilizada para eliminar células anormais, a localização da fluorescência pode ser utilizada para visualizar o tamanho, a extensão e a localização da anomalia ou distúrbio.

A anomalia ou distúrbio assim identificada ou confirmada no

sítio de investigação pode então ser tratada através de técnicas terapêuticas alternativas e. g., tratamento cirúrgico ou químico, ou pelo método de terapêutica da invenção por acumulação continuada de fluorescência ou através de aplicação adicional de compostos da invenção no sítio apropriado. Entender-se-á que as técnicas de diagnóstico podem requer níveis mais baixos de fluorescência para visualização do que os utilizados nos tratamentos terapêuticos. Assim, geralmente, são adequadas gamas de concentração de 0,2 a 30% e. g., 1-5% (p/p). Os sítios, métodos e modos de administração foram anteriormente considerados em relação às utilizações terapêuticas e são também aplicáveis a utilizações em diagnóstico aqui descritas.

Os compostos da invenção ou para utilização na invenção também podem ser utilizados para técnicas de diagnóstico *in vitro*, por exemplo para exame das células contidas em fluidos corporais. A maior fluorescência associada a tecido não normal pode convenientemente ser indicativa de uma anomalia ou distúrbio. Este método é altamente sensível e pode ser utilizado para detecção precoce de anomalias ou distúrbios, por exemplo carcinoma da bexiga ou pulmão, por exame das células epiteliais em amostras de urina ou expectoração, respectivamente. Outros fluidos corporais úteis que podem ser utilizados para diagnóstico além da urina e da expectoração incluem sangue, sêmen, lágrimas, fluido espinal, etc. As amostras ou preparações de tecidos também podem ser avaliadas, por exemplo tecido de biópsias ou amostras de medula óssea. A presente invenção alarga-se assim à utilização de compostos da invenção, ou dos seus sais para diagnóstico de acordo com os métodos anteriormente referidos para fotoquimioterapia, e produtos e kits para realização do referido diagnóstico.



Um aspecto adicional da invenção refere-se a um método de diagnóstico *in vitro* de anomalias ou distúrbios por doseamento de uma amostra de fluido corporal ou tecido de um doente, compreendendo o referido método pelo menos os passos seguintes:

- i) mistura do referido fluido corporal ou tecido com um composto tal como aqui descrito anteriormente,
- ii) exposição da referida mistura a radiação,
- iii) determinação do nível de fluorescência, e
- iv) comparação do nível de fluorescência com os níveis de controlos.

A invenção será agora descrita em mais pormenor nos seguintes Exemplos não limitativos, com referência aos desenhos em que:

A Figura 1 mostra a formação de porfirina celular induzida por ALA (círculos a cheio), éster 1-metilpentílico de ALA (círculos abertos), éster p-isopropilbenzílico de ALA (triângulos invertidos a cheio) e éster p-metilbenzílico de ALA (triângulos invertidos abertos);

A Figura 2 mostra a formação de porfirina celular induzida por ALA (círculos a cheio), éster benzílico de ALA (triângulos a cheio) e éster 2-feniletílico de ALA (triângulos abertos); as barras indicam o desvio padrão;

A Figura 3 mostra a formação de porfirina celular induzida por ALA (círculos a cheio), éster hexílico de ALA (círculos

abertos), éster ciclo-hexílico de ALA (triângulos invertidos a cheio) e éster 4-metilpentílico de ALA (triângulos invertidos abertos); as barras indicam o erro padrão;

A Figura 4 mostra a formação de porfirina celular induzida por ALA (círculos a cheio), éster p-[trifluorometil]benzílico de ALA (círculos abertos), éster p-[t-butil]benzílico de ALA (triângulos invertidos a cheio) e éster p-nitrobenzílico de ALA (triângulos invertidos abertos);

A Figura 5 mostra a fluorescência na pele após a aplicação tópica de éster hexílico de ALA (quadrados a cheio), éster 1-metilpentílico de ALA (triângulos a cheio), éster 1-etilbutílico de ALA (triângulos invertidos a cheio) e éster 2-metilpentílico de ALA (círculos a cheio); as barras indicam o erro padrão;

A Figura 6 mostra a fluorescência na pele após a aplicação tópica de éster hexílico de ALA (quadrados abertos), éster ciclo-hexílico de ALA (triângulos a cheio), éster 2-feniletílico de ALA (quadrados sombreados) e éster 4-metilpentílico de ALA (círculos a cheio); as barras indicam o erro padrão;

A Figura 7 mostra a fluorescência na pele após a aplicação tópica de éster hexílico de ALA (quadrados abertos) e éster p-metilbenzílico de ALA (triângulos sombreados); as barras indicam o erro padrão;

A Figura 8 mostra a fluorescência na pele após a aplicação tópica de éster hexílico de ALA (quadrados a cheio), éster p-(isopropil)benzílico de ALA (triângulos a cheio) e éster 4-fenilbutílico de ALA (triângulos invertidos sombreados); as

barras indicam o erro padrão;

A Figura 9 mostra a fluorescência na pele após a aplicação tópica de éster hexílico de ALA (quadrados a cheio), éster p-fluorobenzílico de ALA (triângulos a cheio) e éster p-nitrobenzílico de ALA (círculos a cheio); as barras indicam o erro padrão;

A Figura 10 mostra a fluorescência na pele após a aplicação tópica de éster hexílico de ALA (quadrados a cheio), éster p-(t-butil)benzílico de ALA (triângulos sombreados) e éster p-[trifluorometil]benzílico de ALA (círculos a cheio); as barras indicam o erro padrão;

A Figura 11 mostra a fluorescência na pele após a aplicação tópica de éster hexílico de ALA (quadrados a cheio) e éster benzílico de ALA (círculos a cheio); as barras indicam o erro padrão;

A Figura 12 mostra a fluorescência na pele após a aplicação tópica de éster hexílico de ALA a 1% (quadrados a cheio) e de éster 3,3-dimetil-1-butílico de ALA a 3% (triângulos a cheio), as barras indicam o erro padrão;

A Figura 13 mostra a fluorescência na pele após a aplicação tópica de éster hexílico de ALA a 1% (quadrados abertos), éster 2-fluorobenzílico de ALA a 10% (triângulos sombreados), éster 2,3,4,5,6-pentafluorobenzílico de ALA a 10% (losangos sombreados) e éster 4-clorobenzílico de ALA a 10% (círculos a cheio); as barras indicam o erro padrão;

A Figura 14 mostra a fluorescência na pele após a aplicação

tópica de éster hexílico de ALA (triângulos abertos), éster 2-metoxietílico de ALA (quadrados a cheio), éster 3-nitrobenzílico de ALA (losangos sombreados) e éster 3,4-[dicloro]benzílico de ALA (círculos abertos); as barras indicam o erro padrão;

A Figura 15 mostra a fluorescência na pele após a aplicação tópica de éster hexílico de ALA (quadrados a cheio), éster 3,6-dioxa-1-octílico de ALA (triângulos a cheio), éster 3-fluorobenílico (losangos abertos) e 3,6,9-trioxa-1-decílico de ALA (círculos sombreados); as barras indicam o erro padrão;

A Figura 16 mostra a fluorescência na pele após a aplicação tópica de éster hexílico de ALA (quadrados a cheio), éster 3-piridinil-metílico de ALA (triângulos a cheio), éster 4-difenil-metílico de ALA (losangos a cheio) e éster 4-metoxibenílico de ALA (círculos a cheio); as barras indicam o erro padrão; e

A Figura 17 mostra a fluorescência na pele após a aplicação tópica de éster hexílico de ALA a 1% (quadrados abertos), éster 2-metilbenzílico de ALA a 3% (triângulos a cheio), éster benzyl-5-[(1-acetiloxietoxi)-carbonílico] de ALA a 3% (losangos a cheio) e éster 3-metilbenzílico de ALA a 3% (círculos abertos); as barras indicam o erro padrão.

### Exemplo 1: Preparação de Ésteres Cloridrato de 5-Amino-4-oxopentanoato

#### Processo geral I

Adicionou-se cloreto de tionilo (1,0 mL) gota a gota ao álcool com agitação (6,0 mL ou 5-6 g) arrefecido a 0 °C (temperatura do banho), seguido por cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol) numa porção. A mistura foi agitada a 70-90 °C durante 1-4 horas, até se obter uma solução límpida. A mistura reaccional foi verificada por TLC [sílica gel 60 em folha de alumínio eluída com acetona-MeOH (3:2)]. A mistura foi arrefecida até à temperatura ambiente e adicionada a éter dietílico (50 mL) com agitação. A filtração deu o éster em bruto; o excesso de álcool pode ser recuperado do filtrado.

O éster em bruto foi purificado por cromatografia *flash* numa coluna com 150-200 x 25 mm de sílica gel 60 eluída com acetonitrilo (250 mL) e 5-10% de MeOH em acetonitrilo (500-1000 mL). As fracções contendo o produto foram evaporadas e o resíduo foi lavado com éter e seco a 30-40 °C e 0,2 mm Hg.

Os ésteres seguintes foram preparados por este método:

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de etilo*  
(comparativo)

A partir de etanol (6,0 mL) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol) a 70 °C. A reacção estava completa após 2 h. O rendimento foi de 1,0 g (85%).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,19 (3H, t, J = 7,2 Hz), 2,54

(2H, t,  $J = 6,3$  Hz), 2,83 (2H, t,  $J = 6,6$  Hz), 3,96 (2H, br s), 4,05 (2H, q,  $J = 7,0$  Hz), 8,52 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  14,0, 27,1, 34,2, 46,4, 60,0, 171,9, 202,4.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 1-metil-pentilo*  
[composto 1] (comparativo)

A partir de 2-hexanol (6,0 mL) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol) a 70 °C. A reacção estava completa após cerca de 4 h. O rendimento foi de 1,0 g (66%).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0,87 (3H, t,  $J = 6,5$  Hz), 1,15 (3H, d,  $J = 6,2$  Hz), 1,25 (4H, m), 1,51 (2H, m), 2,51 (2H, t,  $J = 6,5$  Hz), 2,81 (2H, t,  $J = 6,6$  Hz), 3,95 (2H, s), 4,78 (1H, m,  $J = 6,5$  Hz), 8,47 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  13,6, 19,4, 21,6, 26,6, 27,0, 33,8, 34,4, 44,9, 69,6, 169,5, 200,1.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 3-hexilo* [composto 12]

A partir de 3-hexanol (6,0 mL) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol) a 100 °C. A reacção estava completa após 2 dias. O rendimento foi de 0,87 g (58%) de óleo âmbar.

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0,83 (3H, t,  $J = 7,4$  Hz), 0,86 (3H, t,  $J = 7,2$  Hz), 1,27 (2H, m,  $J = 7,7$  Hz), 1,48 (4H, m,  $J = 7,5$  Hz), 2,54 (2H, t,  $J = 6,3$  Hz), 2,83 (2H, t,  $J = 6,0$  Hz), 3,95

(2H, s), 4,73 (1H, m,  $J = 5,9$  Hz), 8,55 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  9,3, 13,6, 17,8, 26,2, 26,8, 33,9, 34,8, 45,9, 73,7, 169,8, 200,1.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 2-metil-1-pentilo*  
[composto 13] (comparativo)

A partir de 2-metil-1-pentanol (6,0 mL) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol) a 70 °C. A reacção estava completa após 3,5 h. O rendimento foi de 1,43 g (95%).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0,85-0,90 (6H, m), 1,1-1,4 (4H, m), 1,74 (1H, m), 2,56 (2H, t,  $J = 6,7$  Hz), 2,84 (2H, t,  $J = 6,6$  Hz), 3,75-3,9 (2H, m), 3,95 (2H, br s), 8,52 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  13,9, 16,4, 19,1, 26,7, 31,3, 33,9, 34,5, 45,9, 67,97, 170,0, 200,1.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 4-metil-1-pentilo*  
[Composto 8] (comparativo)

A partir de 4-metil-1-pentanol (6,0 mL) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol) a 70 °C. A reacção estava completa após 2 h. O rendimento foi de 1,32 g (87%).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0,87 (6H, d,  $J=6,6$  Hz), 1,15-1,25 (2H, m), 1,45-1,65 (3H, m), 2,55 (2H, t,  $J=6,5$  Hz), 2,83 (2H, t,  $J=6,4$  Hz), 3,96 (2H, br s), 3,99 (2H, t,  $J=6,8$  Hz), 8,53 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  22,0, 22,2, 25,6, 26,7, 26,8,

34,0, 45,9, 63,5, 169,9, 200,1.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 3,3-dimetil-1-butilo* [composto 16] (comparativo)

A partir de 3,3-dimetil-1-butanol (5,0 g; 49 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol) a 70 °C. A reacção estava completa após 4 h. O rendimento foi de 0,91 g (60%), p.f. 146-148°.

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  0,91 (9H, s), 1,51 (2H, t, J=7,6 Hz), 2,53 (2H, t, J=6,2 Hz), 2,83 (2H, t, J=6,2 Hz), 3,96 (2H, br s), 4,07 (2H, t, J=7,0 Hz), 8,54 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  27,0, 29,3, 29,34, 34,3, 46,4, 61,5, 171,9, 202,4.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de ciclo-hexilo* [composto 7] (comparativo)

A partir de ciclo-hexanol (6,0 mL) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol) a 80 °C. Adicionou-se cloreto de tionilo à temperatura ambiente. A reacção estava completa após 3 h. O rendimento foi de 1,48 g (99%).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  1,1-1,5 (6H, m), 1,5-1,9 (4H, m), 2,52 (2H, t, J=6,3 Hz), 2,82 (2H, t, J=6,3 Hz) 3,95 (2H, br s), 4,64 (1H, m), 8,52 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  22,8, 24,5, 27,1, 30,6, 33,9, 45,9, 71,2, 169,3, 200,1.



*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 2-feniletilo*  
[composto 5]

A partir de 2-feniletanol (5,0 g; 41 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol) a 70 °C. A reacção estava completa após 3 h. O rendimento foi de 1,43 g (88%).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  2,50 (2H, t, J=6,4 Hz), 2,82 (2H, t, J=6,4 Hz), 2,89 (2H, t, J=7,0 Hz), 3,95 (2H, br s), 4,23 (2H, t, J=7,0 Hz), 7,1-7,4 (5H, m) 8,54 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  24,6, 28,0, 35,2, 47,4, 65,5, 127,2, 129,2, 129,7, 172,8, 203,3.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 4-fenil-1-butilo*  
[composto 14] (comparativo)

A partir de 4-fenil-1-butanol (5,0 g; 33 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol) a 70 °C. A reacção estava completa após 29 h. O rendimento foi de 1,22 g (68%).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  1,60 (4H, br s), 2,5-2,6 (4H, m), 2,84 (2H, t, J=6,4 Hz), 3,97 (2H, br s), 4,0 (2H, m), 7,15-7,35 (5H, m), 8,56 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  27,0, 27,2, 27,6, 34,3, 34,6, 46,4, 63,8, 125,6, 128,2, 141,8, 171,9, 202,4.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 2-metoxietilo*  
[composto 20] (comparativo)

A partir de 2-metoxietanol (5,0 g; 66 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol) a 70 °C. A reacção estava completa após 1 h. O rendimento foi de 1,25 g (93%) de óleo amarelado.

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  2,57 (2H, t, J=6,2 Hz), 2,83 (2H, t, J=6,2 Hz), 3,27 (3H, s), 3,54 (5H, br s), 3,95 (2H, br s), 4,12 (2H, br s), 8,52 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  27,1, 34,3, 46,5, 58,0, 63,2, 69,6, 172,0, 202,5.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 3,6-dioxa-1-octilo*  
[composto 23] (comparativo)

A partir de éter monoetílico de dietileno glicol (5,0 g; 37 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol) a 70 °C. A reacção estava completa após 4 h. O rendimento foi de 0,90 g (53%) de sólido castanho dourado claro.

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  1,10 (3H, t, J=7,0 Hz), 2,58 (2H, t, J=6,0 Hz), 3,35-3,65 (8H, m), 3,96 (2, br s), 4,13 (2H, t, J=4,2 Hz), 8,52 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  15,0, 27,1, 34,3, 46,5, 63,4, 65,5, 68,1, 69,1, 69,8, 172,0, 202,5.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 3,6,9-trioxa-1-decilo* [composto 25] (comparativo)

A partir de éter monometílico de trietileno glicol (5,0 g; 30 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol) a 70 °C. A reacção estava completa após 20 h. O rendimento foi de 1,19 g (63%) de óleo acastanhado.

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,58 (2H, t,  $J=6,2$  Hz), 2,84 (2H, t,  $J=6,4$  Hz), 3,25 (3H, s), 3,4-3,65 (10H, m), 3,96 (2H, br s), 4,13 (2H, m), 8,49 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  27,1, 34,3, 46,5, 58,0, 63,4, 68,1, 69,5, 69,6, 69,7, 71,2, 171,9, 202,5.

### Processo geral II

Uma mistura do álcool (5,0 g) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol) foi aquecida a 90-100 °C (até 135 °C se necessário para fundir o álcool) e adicionou-se ácido clorídrico 12 M (0,1 mL). Continuou-se o aquecimento até se obter uma solução límpida (até 5-6 dias). O processamento foi como no procedimento anterior.

Os ésteres seguintes foram preparados por este método:

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de benzilo*  
[composto 4]

A partir de álcool benzílico (50 mL) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (10,0 g; 60 mmol). Após 23 h a 90°, o

excesso de álcool benzílico foi removido por destilação a 90° (temperatura do banho) e 0,33 mm Hg. O rendimento foi de 8,1 g (53%) de pó castanho dourado.

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,63 (2H, t,  $J=6,5$  Hz), 2,87 (2H, t,  $J=6,5$  Hz), 3,98 (2H, br s), 5,11 (2H, s), 7,3-7,4 (5H, br s), 8,52 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  26,7, 33,8, 45,9, 64,8, 126,3, 126,4, 126,8, 134,4, 169,8, 200,1.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 4-nitrobenzilo*  
[composto 11]

A partir de álcool 4-nitrobenzílico (5,0 g; 33 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol). A reacção estava completa após 15 min a 135 °C. O rendimento foi de 0,95 g (52%).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,72 (2H, t,  $J=5,8$  Hz), 2,91 (2H, t,  $J=6,2$  Hz), 4,02 (2H, br s), 5,28 (2H, s), 7,67 (2H, d,  $J=8,0$  Hz), 8,25 (2H, d,  $J=9,1$  Hz), 8,58 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  27,1, 34,3, 46,5, 64,4, 123,5, 128,3, 143,9, 146,9, 171,8, 202,5.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 4-fluorobenzilo*  
[composto 15]

A partir de álcool 4-fluorobenzílico (5,0 g; 40 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol). A reacção estava completa após 3 h a 90 °C. O rendimento foi de 1,02 g (62%).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  2,63 (2H, t,  $J=6,4$  Hz), 2,88 (2H, t,  $J=6,6$  Hz), 3,99 (2H, br s), 5,10 (2H, s), 7,22 (2H, t,  $J=8,8$  Hz), 7,45 (2H, d,  $J=8,0$  Hz), 8,57 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  27,1, 34,3, 46,5, 64,9, 115,0, 115,4, 130,1, 130,2, 132,2, 132,3, 159,3, 164,2, 171,8, 202,4.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 4-metilbenzilo*  
[composto 3]

A partir de álcool 4-metilbenzílico (5,0 g; 41 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol). A reacção estava completa após 2 dias. O rendimento foi de 0,84 g (52%).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  2,30 (3H, s), 2,60 (2H, t,  $J=6,4$  Hz), 2,86 (2H, t,  $J=6,2$  Hz), 3,96 (2H, br s), 5,05 (2H, s), 7,1-7,3 (4H, m), 8,55 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  21,7, 28,1, 35,2, 47,4, 66,4, 128,9, 129,8, 133,9, 138,2, 172,8, 203,4.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 4-isopropilbenzilo*  
[composto 2]

A partir de álcool 4-isopropilbenzílico (5,0 mL) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol). A reacção estava completa após 2 dias. O rendimento foi de 1,0 g (56%).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  1,19 (6H, d,  $J=6,6$  Hz), 2,61 (2H, t,  $J=6,4$  Hz), 2,84 (1H, m), 2,88 (2H, t,  $J=6,8$  Hz), 3,98 (2H, br s), 5,06 (2H, s), 7,2-7,4 (4H, m), 8,56 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  23,7, 27,1, 33,1, 34,3, 46,4, 65,5, 126,2, 128,0, 133,3, 148,2, 171,8, 202,6.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 4-t-butilbenzilo*  
[composto 10]

A partir de álcool 4-t-butilbenzílico (5,0 g; 30 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol). A reacção estava completa após 2 dias. O rendimento foi de 0,84 g (52%).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,27 (9H, s), 2,61 (2H, t,  $J=6,4$  Hz), 2,87 (2H, t,  $J=6,6$  Hz), 3,98 (2H, br s), 5,06 (2H, s), 7,29 (2H, d,  $J=8,4$  Hz), 7,39 (2H, d,  $J=8,4$  Hz), 8,55 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  27,1, 31,0, 34,16, 34,26, 46,4, 65,4, 125,0, 127,7, 133,0, 150,4, 171,8, 202,4.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 4-(trifluorometil)-benzilo* [composto 9]

A partir de álcool 4-(trifluorometil)benzílico (4,9 g; 28 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol). A reacção estava completa após 2 h. O rendimento foi de 1,24 g (64%).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,69 (2H, t,  $J=6,2$  Hz), 2,92 (2H, t,  $J=6,4$  Hz), 4,00 (2H, br s), 5,23 (2H, s), 7,62 (2H, d,  $J=8,2$  Hz), 7,75 (2H, d,  $J=8,2$  Hz), 8,58 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ )  $\delta$  27,1, 34,4, 46,5, 64,7, 121,4, 125,2, 125,3, 125,4, 126,9, 128,2, 140,9, 171,8, 202,5.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 2-fluorobenzilo*  
[composto 17]

A partir de álcool 2-fluorobenzílico (5,7 g; 45 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol). A reacção estava completa após 27 h a 100 °C. O rendimento foi de 0,64 g (44%). P.f. 91-94 °C (dec.)

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,63 (2H, t,  $J=6,0$  Hz), 2,88 (2H, t,  $J=6,0$  Hz), 3,98 (2H, br s), 5,16 (2H, s), 7,2-7,6 (4H, m), 8,56 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  27,0, 34,3, 46,4, 59,7, 59,8, 115,1, 115,5, 122,7, 123,0, 124,5, 130,4, 130,6, 130,7, 130,8, 157,8, 162,7, 171,8, 202,4.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 3-fluorobenzilo*  
[composto 24]

A partir de álcool 3-fluorobenzílico (5,1 g; 40 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol). A reacção estava completa após 20 h a 100 °C. O rendimento foi de 1,04 g (72%). P.f. 115-119 °C.

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,67 (2H, t,  $J=6,2$  Hz) 2,90 (2H, t,  $J=6,2$  Hz), 4,00 (2H, d,  $J=5,0$  Hz), 5,14 (2H, s), 7,1-7,3 (3H, m), 7,4-7,5 (1H, m), 8,54 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  27,1, 34,3, 46,5, 64,7, 114,1, 114,5, 114,9, 123,1, 123,6, 130,4, 130,5, 138,8, 139,0, 159,6, 164,5, 171,8, 202,5.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 2,3,4,5,6-pentafluoro-benzilo* [composto 18]

A partir de álcool 2,3,4,5,6-pentafluorobenzílico (5,1 g; 26 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol). A reacção estava completa após 6 dias a 100 °C. O rendimento foi de 0,25 g (13%). P.f. 146-148 °C.

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  2,59 (2H, t, J=6,4 Hz) 2,85 (2H, t, J=6,4 Hz), 3,95 (2H, br s), 5,22 (2H, s), 8,51 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  26,8, 34,2, 46,5, 53,2, 109,9, 123,2, 134,5, 139,5, 142,7, 147,7, 171,6, 202,4.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 4-clorobenzilo* [composto 19]

A partir de álcool 4-clorobenzílico (5,0 g; 35 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol). A reacção estava completa após 24 h a 100 °C. O rendimento foi de 0,56 g (32%). P.f. 127-129 °C.

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  2,65 (2H, t, J=5,8 Hz), 2,89 (2H, t, J=6,0 Hz), 3,99 (2H, br s), 5,11 (2H, s), 7,44 (4H, s), 8,56 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  27,1, 34,3, 46,5, 64,7, 128,4, 129,7, 132,6, 135,1, 171,8, 202,5.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 3,4-diclorobenzilo* [composto 22]

A partir de álcool 3,4-diclorobenzilo (5,0 g; 28 mmol) e



cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol). A reacção estava completa após 45 h a 100 °C. O rendimento foi de 1,12 g (57%).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,67 (2H, t,  $J=6,4$  Hz) 2,90 (2H, t,  $J=6,4$  Hz), 4,00 (2H, br s), 5,12 (2H, s), 7,2-7,5 (1H, m), 7,5-7,6 (2H, m), 8,50 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  27,1, 34,3, 46,7, 64,1, 129,8, 130,7, 137,3, 173,7, 202,8.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 3-nitrobenzilo*  
[composto 21]

A partir de álcool 3-nitrobenzílico (5,0 g; 33 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol). A reacção estava completa após 20 h a 100 °C. O rendimento foi de 1,00 g (55%).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,68 (2H, br s), 2,90 (2H, br s), 3,98 (2H, br s), 5,26 (2H, s), 7,6-7,9 (2H, m), 8,1-8,3 (2H, m), 8,47 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  27,1, 34,3, 46,5, 64,4, 122,3, 122,8, 130,1, 134,3, 138,4, 147,7, 171,8, 202,5.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 2-metilbenzilo*  
[composto 29]

A partir de álcool 2-metilbenzílico (5,0 g; 41 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol). A reacção estava completa após 4 dias a 100 °C. O rendimento foi de 0,72 g (44%). P.f. 107-109 °C.

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  2,29 (3H, s), 2,62 (2H, t,  $J=6,4$  Hz), 2,86 (2H, t,  $J=6,4$  Hz), 3,96 (2H, br s), 5,10 (2H, s), 7,2-7,4 (4H, m), 8,54 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO-*d*6)  $\delta$  18,4, 27,0, 34,3, 46,4, 64,1, 123,1, 125,8, 128,2, 128,8, 130,0, 133,8, 136,5, 171,8, 202,5.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 3-metilbenzilo*  
[composto 31]

A partir de álcool 3-metilbenzílico (5,0 g; 40 mmol) e cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (1,0 g; 6,0 mmol). A reacção estava completa após 2 dias a 80 °C. O rendimento foi de 1,11 g (68%). P.f. 96-98 °C.

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  2,31 (3H, s), 2,62 (2H, t,  $J=6,2$  Hz), 2,87 (2H, t,  $J=6,4$  Hz), 3,97 (2H, br s), 5,06 (2H, s), 7,1-7,4 (4H, m), 8,55 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  20,9, 27,1, 34,3, 46,4, 65,6, 124,9, 128,3, 128,4, 128,5, 135,9, 137,5, 171,9, 202,5.

### Processo geral III

O álcool benzílico (5,0 mmol) foi adicionado gota a gota a uma mistura de N,N'-diisopropilcarbodiimida (0,63 g; 5,0 mmol) e cloreto de cobre(I) (1 mg) arrefecida a 0 °C (temperatura do banho). Após uma hora a 0 °C, a mistura foi agitada durante cerca de 24 h à temperatura ambiente. A mistura verde escura foi diluída com pentano (3 mL) e filtrada através de uma camada de Celite. O resíduo foi lavado com um pouco de pentano e os filtrados combinados foram evaporados. O resíduo foi dissolvido

em tetra-hidrofurano seco e adicionou-se ácido N-t-BOC-5-amino-4-oxopentanóico (0,43 mmol) em diclorometano seco (10 mL). Após 5 dias em repouso à temperatura ambiente, a mistura foi filtrada e o resíduo lavado com um pouco de éter dietílico. O resíduo foi dissolvido em acetato de etilo (20 mL) e tratado com uma solução de cloreto de hidrogénio em acetato de etilo (2 mL). Um precipitado do cloridrato apareceu após 4 h a 3 dias e foi purificado como indicado adiante.

#### *Ácido N-t-BOC-5-amino-4-oxopentanóico*

Adicionou-se trietilamina (13,9 mL; 10,1 g; 0,10 mol) gota a gota a uma mistura com agitação de cloridrato do ácido 5-amino-4-oxopentanóico (10,0 g; 59,7 mmol) e dicarbonato de di-t-butilo (21,8 g; 0,10 mol) em N,N-dimetilformamida seca (25 mL). A mistura reaccional foi agitada durante 6 h a 50 °C e de um dia para o outro à temperatura ambiente. O solvente foi removido por evaporação a 35-40 °C (temperatura do banho) e 7-1 mm Hg. O resíduo foi acidificado com ácido cítrico a 10% (50 mL) gelado e imediatamente extraído com acetato de etilo (6 x 15 mL). Os extractos combinados foram lavados com água (2 x 5 mL) e solução saturada de NaCl (1 x 5 mL). Após secagem (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) de um dia para o outro num frigorífico, a mistura foi filtrada e evaporada. O óleo vermelho foi purificado por cromatografia *flash* numa coluna de 50 x 60 mm de sílica gel eluída com acetato de etilo-hexane (2:1), recolhendo fracções de 50 mL, para dar 12,2 g (88%) de óleo amarelo viscoso que solidificou parcialmente por armazenagem num frigorífico.

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1,39 (9H, s), 2,42 (2H, t, J=6,4 Hz), 2,63 (2H, t, J=6,4 Hz), 3,78 (2H, d, J=5,8 Hz), 7,04 (1H, t,

J=5,6 Hz), 12,1 (1H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  27,4, 28,1, 38,6, 49,5, 78,1, 155,7, 173,6, 206,1.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 4-metoxibenzilo*  
[composto 28]

Preparado a partir de álcool 4-metoxibenzílico (1,0 g; 7,2 mmol), N,N'-diisopropilcarbodiimida (0,91 g; 7,2 mmol), CuCl (9 mg) e ácido N-t-BOC-5-amino-4-oxopentanóico (1,7 g; 7,2 mmol). A cromatografia *flash* numa coluna de 175 x 25 mm de sílica gel 60 eluída com acetonitrilo (200 mL), 5% de metanol em acetonitrilo (500 mL) e 10% de metanol em acetonitrilo (750 mL) e recolha de fracções de 50 mL deu 0,24 g (11%) de produto. P.f. 110-112 °C.

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  2,58 (2H, t, J=6,4 Hz), 2,83 (2H, t, J=6,4 Hz), 3,75 (3H, s), 3,94 (2H, br s), 5,02 (2H, s), 6,93 (2H, d, J=8,4 Hz), 7,31 (2H, d, J=8,4 Hz), 8,48 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO-*d*6):  $\delta$  27,1, 34,2, 46,4, 55,0, 65,4, 113,7, 127,9, 129,8, 159,1, 171,8, 202,5.

*Dicloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 3-piridinilmetilo* [composto 26]

A partir de 3-piridinilmetanol (0,55 g; 5,0 mmol) e ácido N-t-BOC-5-amino-4-oxopentanóico 0,43 M em dichlorometane (10 mL; 4,3 mmol). A evaporação de solventes do filtrado deu 1,0 g de resíduo, que foi dissolvido em acetato de etilo. Adicionou-se uma solução de cloreto de hidrogénio em acetato de etilo (2 mL) à solução âmbar. Após 4 h em repouso à temperatura ambiente, o

resíduo foi filtrado e seco sobre sílica gel a 30 °C e 0,01 mm Hg para dar 0,63 g (68%) de um sólido higroscópico.

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,69 (2H, t,  $J=6,4$  Hz), 2,91 (2H, t,  $J=6,4$  Hz), 3,9-4,0 (2H, m), 5,35 (2H, s), 8,0-8,2 (1H, m), 8,54 (3H, br s), 8,5-8,7 (1H, m), 8,9-9,0 (2H, m).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  27,0, 34,3, 46,4, 61,9, 126,9, 140,8, 141,3, 144,4, 171,7, 202,5.

*Cloridrato de 5-amino-4-oxopentanoato de 4-difenilmetilo*  
[composto 27]

A partir de 4-difenilmetanol (5,0 g; 40 mmol) e solução de ácido N-t-BOC-5-amino-4-oxopentanóico (10 mL; 4,3 mmol). O cloridrato em bruto foi purificado por cromatografia *flash* numa coluna de 190 x 25 mm de sílica gel 60 eluída com acetonitrilo (300 mL), 10% de metanol em acetonitrilo (1000 mL) e 20% de metanol em acetonitrilo (250 mL), recolhendo fracções de 50 mL. O rendimento foi de 0,39 g (16%). P.f. 163-166 °C.

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz; DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2,65 (2H, t,  $J=6,4$  Hz), 2,88 (2H, t,  $J=6,4$  Hz), 3,98 (2H, br s), 5,16 (2H, s), 7,2-7,5 (5H, m), 7,6-7,8 (4H, m), 8,52 (3H, br s).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz; DMSO- $d_6$ )  $\delta$  27,1, 34,3, 46,4, 65,3, 126,6, 126,7, 127,5, 128,5, 128,9, 135,2, 139,6, 139,8, 171,9, 202,5.

*5-[[1-(Acetiloxi)etoxi]carbonil]amino-4-oxopentanoato de benzilo* [composto 30]

Adicionou-se piridina (0,32 mL; 0,32 g; 4,0 mmol) gota a gota a uma mistura com agitação de cloridrato de 5-amino-4-

oxopentanoato de benzilo (0,52 g; 2,0 mmol) e cloroformato de 1-cloroetilo (0,29 g; 2,0 mmol) em tetra-hidrofurano seco (10 mL). Após agitação durante 2 h à temperatura ambiente, a mistura foi lavada com água (1 x 2 mL) e solução saturada de NaCl (1 x 2 mL) e seca (MgSO<sub>4</sub>). A filtração e evaporação deram 0,65 g de óleo âmbar. O óleo foi dissolvido em ácido acético glacial (10 mL) e adicionou-se acetato de mercúrio(II) (0,64 g; 2,0 mmol). Após agitação durante 3 dias à temperatura ambiente, o excesso de ácido acético foi removido por evaporação a aproximadamente 30 °C (temperatura do banho) e 8-10 mm Hg. O resíduo foi agitado com éter dietílico (10 mL) e filtrado. Após lavagem do resíduo com mais éter (15 mL), os filtrados combinados foram neutralizados com NaHCO<sub>3</sub> e lavados com solução saturada de NaCl (1 x 10 mL). Após secagem (MgSO<sub>4</sub>), filtração e evaporação, o produto em bruto foi purificado por cromatografia *flash* numa coluna de 190 x 25 mm de sílica gel 60 eluída com acetato de etilo-hexano (2:1) (500 mL), recolhendo fracções de 25 mL. O rendimento foi de 0,43 g (61%) de óleo amarelo pálido.

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,41 (3H, d, J=5,6 Hz), 2,00 (3H, s), 2,57 (2H, t, J=6,0 Hz), 2,73 (2H, t, J=6,0 Hz), 3,90 (2H, d, J=6,0 Hz), 5,08 (2H, s), 6,68 (1H, q, J=5,4 Hz), 7,36 (5H, s), 7,71 (1H, t, J=5,8 Hz).

RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 19,6, 20,6, 27,3, 33,7, 49,5, 65,5, 88,8, 127,8, 127,9, 128,4, 136,1, 154,2, 168,6, 172,0, 205,1.

## Exemplo 2 - Determinação da formação de porfirina em cultura de células *in vitro*

### Métodos

Os seguintes compostos foram testados em comparação com ALA:

1. éster 1-metilpentílico de ALA (comparativo)
2. éster p-isopropilbenzílico de ALA (comparativo)
3. éster p-metilbenzílico de ALA
4. éster benzílico de ALA
5. éster 2-feniletílico de ALA
6. éster hexílico de ALA (comparativo)
7. éster ciclo-hexílico de ALA (comparativo)
8. éster 4-metilpentílico de ALA (comparativo)
9. éster p-[tri-fluorometil]benzílico de ALA
10. éster p-[t-butil]benzílico de ALA
11. éster p-nitrobenzílico de ALA

Os compostos de teste foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 100 mM (solução mãe). Obteve-se concentrações apropriadas por diluição das soluções mãe com soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS) ou meio de cultura.

### *Cultura de células*

Células WiDr, derivadas de um adenocarcinoma primário do cólon rectosigmóide, foram subcultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) contendo 10% de soro fetal de vitelo, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 1% de glutamina. As

células foram divididas 1:100 duas vezes por semana, e mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> num ambiente húmido.

#### *Condições de tratamento*

Adicionou-se  $5 \times 10^5$  células WiDr em 2 mL de meio RPMI como descrito no parágrafo anterior a cada poço de placas de plástico para cultura de tecidos com 6 poços (Nunc) e deixou-se durante 48 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> num ambiente húmido para fixação adequada ao substrato. As células foram então lavadas duas vezes com meio RPMI 1640 sem soro, a que se seguiu a adição aos poços das diluições apropriadas dos compostos de teste em 2 mL de meio de cultura fresco para concentrações finais de 0,001, 0,01, 0,1 e 1 mM em duplicado. As células foram incubadas a 37 °C durante quatro horas.

#### *Determinação do teor de porfirinas celulares*

Após tratamento tal como descrito no parágrafo "condições de tratamento" as células foram lavadas duas vezes com PBS e levadas a uma solução de HClO<sub>4</sub> 1 M em MeOH a 50% por raspagem das células do substrato por meio de um raspador de células Costar. Os detritos celulares foram removidos por centrifugação. O teor de porfirinas de cada amostra foi determinado fluorometricamente utilizando um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS50B (excitação a 407 nm, a emissão foi medida a 606 nm utilizando um filtro de corte de passo longo (530 nm) no lado da emissão). A fluorescência de cada amostra foi calculada em relação ao teor de proteína em células de controlo determinado pelo método de Bradford.



## Resultados

Os resultados estão apresentados nas Figuras 1 a 4 para os compostos de teste 1-3, 4 & 5, 6-8 e 9-11, respectivamente.

Pode observar-se da Figura 1 que se obteve curvas de resposta à dose acentuadas para os ésteres p-metilbenzílico e p-isopropilbenzílico. Estes ésteres eram igualmente eficazes na indução da síntese de porfirinas celulares e aproximadamente 200 vezes mais potentes do que o ALA. A curva para o éster 1-metilpentílico aumentou lentamente com o aumento das concentrações de éster. O éster 1-metilpentílico a baixas concentrações só era ligeiramente melhor do que o ALA na indução da formação de porfirinas.

A partir da Figura 2 pode observar-se que os ésteres benzílico e 2-feniletílico era consideravelmente mais eficientes do que o ALA na indução da síntese de porfirinas celulares. De facto, a formação de porfirinas induzida por 0,001 mM de éster bvenzílico é igual à obtida com 0,6 mM de ALA. Analogamente, pode observar-se que a fluorescência após a adição de 0,001 mM de éster 2-feniletílico corresponde à induzida por 0,4 mM de ALA.

A Figura 3 mostra que os ésteres hexílico e 4-metilpentílico são igualmente eficientes. Também se pode observar da Figura que as aptidões destes ésteres para induzir a formação de porfirinas celulares eram aproximadamente 100 vezes superiores à do ALA. O éster ciclo-hexílico era, a baixas concentrações, apenas ligeiramente mais eficiente do que o ALA na indução da formação de porfirinas. A concentrações mais elevadas, o éster ciclo-hexílico era menos eficiente do que o

ALA.

Pode observar-se pela Figura 4 que os ésteres p-[trifluorometil]benzílico, p-[t-butil]benzílico e p-nitrobenzílico eram aproximadamente 200 vezes melhores do que o ALA na indução da formação de porfirinas.

Os resultados podem ser sumariados como se segue:

COMPOSTO (i. e., CADEIA LATERAL DO ÉSTER) [COMPOSTO N°]		POTÊNCIA*
ALA	#	1
1-metilpentilo [1]	#	3
4-metilpentilo [8]	#	100
2-feniletilo [5]		500
benzilo [4]		100-600
hexilo [6]	#	100
p-isopropilbenzilo [2]		200
p-metilbenzilo [3]		200
ciclo-hexilo [7]	#	1
p-nitrobenzilo [11]		200
p-[trifluorometil]benzilo [9]		200
p-[t-butil]benzilo [10]		200

\* Aptidão relativa para induzir a formação de porfirina

# Comparativo

Exemplo 3 - Formação de porfirina após aplicação tópica em  
pele de murino

Métodos

Os compostos seguintes foram testados em relação a ALA (incluindo os compostos 1 a 11 testados no Exemplo 2) (# = comparativo):

1. éster 1-metilpentílico de ALA #
2. éster p-isopropilbenzílico de ALA
3. éster p-metilbenzílico de ALA
4. éster benzílico de ALA
5. éster 2-feniletílico de ALA
6. éster hexílico de ALA #
7. éster ciclo-hexílico de ALA #
8. éster 4-metilpentílico de ALA #
9. éster p-[tri-fluorometil]benzílico de ALA
10. éster p-[t-butil]benzílico de ALA
11. éster p-nitrobenzílico de ALA
12. éster 1-etilbutílico de ALA #
13. éster 2-metilpentílico de ALA #
14. éster 4-fenilbutílico de ALA #
15. éster p-fluorobenzílico de ALA
16. éster 3,3'-dimetil-1-butílico de ALA #
17. éster 2-fluorobenzílico de ALA
18. éster 2,3,4,5,6-pentafluorobenzílico de ALA
19. éster 4-clorobenzílico de ALA
20. éster 2-metoxietílico de ALA #
21. éster 3-nitrobenzílico de ALA
22. éster 3,4-[di-cloro]benzílico de ALA
23. éster 3,6-dioxa-1-octílico de ALA #

24. éster 3-fluorobenzílico de ALA
25. éster 3,6,9-trioxa-1-decílico de ALA #
26. éster 3-piridinil-metílico de ALA
27. éster 4-difenil-metílico de ALA
28. éster 4-metoxi-benzílico de ALA
29. éster 2-metilbenzílico de ALA
30. 5-[(1-acetiloxietoxi)-carbonil]amino levulinato de benzilo
31. éster 3-metilbenzílico de ALA

### Métodos

Os compostos de teste foram formulados com Unguentum Merck (base para cremes disponível de Merck, consistindo em dióxido de sílico, parafina líquida, vaselina, albumina, cetostearol, polissorbato 40, monostearato de glicerol, Miglyol® 812 (uma mistura de ácidos gordos de plantas), polipropilenoglicol e água purificada) na concentração desejada. As concentrações são expressas como % (p/p) calculadas como cloridratos. As formulações foram preparadas no dia anterior ao início da experiência e armazenadas no frigorífico até ao dia da utilização.

Nos estudos utilizou-se murganhos glabros atímicos Balb/c fêmeas, com peso de cerca de 22 g, obtidos no Department of Laboratory Animals, The Norwegian Radium Hospital (Montebello, Oslo, Noruega).

Utilizou-se três murganhos por grupo. Cada murganho recebeu 0,05-0,1 g de formulação aplicada topicamente no flanco direito do corpo, distribuída uniformemente e coberta com uma compressa (Opsite Flexigrid; Smith and Nephew Medical Ltd., Hull,

Inglaterra). O dispositivo de medida com ponta de fibra consistia num feixe de fibras ópticas ligado a um espectrofluorímetro que produziu a radiação de excitação a 407 nm. A radiação de excitação, que é capaz de penetrar 0,1-0,5 mm no tecido, foi conduzida através de metade das fibras para a pele do murganho. O espectro de fluorescência de emissão resultante (550-750) nm foi recolhido e conduzido através das restantes fibras para um fotomultiplicador para quantificação.

Após a aplicação da formulação em creme, o espectro de fluorescência das porfirinas na pele foi determinado pelo método das fibras ópticas a diferentes intervalos de tempo após a administração.

A intensidade de fluorescência variou de experiência para experiência. Por isso incluiu-se 1% (p/p) de 15-aminolevulinato de hexilo-HCl em cada experiência como controlo interno.

## Resultados

Os resultados estão apresentados nas Figuras 5 a 17 para os seguintes compostos de teste: Figura 5 - compostos 1, 6, 12 e 13; Figura 6 - compostos 5-8; Figura 7 - compostos 3 e 6; Figura 8 - compostos 2, 6 e 14; Figura 9 - compostos 6, 11 e 15; Figura 10 - compostos 6, 9 e 10; Figura 11 - compostos 4 e 6; Figura 12 - compostos 6 e 16; Figura 13 - compostos 6 e 17-19; Figura 14 - compostos 6 e 20-22; Figura 15 - compostos 6 e 23-25; Figura 16 - compostos 6 e 26-28; Figura 17 - compostos 6 e 29-31. Todos os compostos foram utilizados a 1% (p/p) excepto nas Figuras 12 e 17 em que o éster 3,3-dimetil-1-butílico de ALA, o éster 2-metilbenzílico de ALA, o éster benzil-5-[(acetiloxietoxi)-

carbonílico] de ALA e éster 3-metilbenzílico de ALA foram utilizados a 3% (p/p), e na Figura 13 em que o éster 2-fluorobenzílico de ALA, o éster 2,3,4,5,6-pentafluorobenzílico de ALA e o éster 4-clorobenzílico de ALA foram utilizados a 10% (p/p).

Pode observar-se a partir da Figura 5 que os ésteres hexílico, 1-metilpentílico, 1-etilbutílico e 2-metilpentílico todos deram formação de porfirina. Além disso, o éster hexílico deu a maior fluorescência seguido pelos ésteres 2-metilpentílico e 1-etilbutílico. O éster 1-metilpentílico deu níveis de fluorescência intermédios neste estudo.

A Figura 6 mostra que o éster hexílico e o éster 4-metilpentílico resultam em níveis de fluorescência elevados enquanto que os ésteres ciclo-hexílico e 2-feniletílico deram níveis de fluorescência baixos.

A Figura 7 mostra que os ésteres hexílico e p-metilbenzílico de ALA deram níveis de fluorescência elevados e semelhantes.

É evidente da Figura 8 que o 5-aminolevulinato de p-isopropilbenzilo resultou em níveis intermédios de fluorescência enquanto que o 5-aminolevulinato de 4-fenil-butilo só deu baixos níveis de fluorescência. É interessante a este respeito que um análogo da última substância (o 5-aminolevulinato de 2-fenil-etilo) também deu valores dos níveis de fluorescência relativamente modestos (Figura 6). Isto mostra que quando o 5-aminolevulinato de benzilo (Figura 11) é "prolongado" com um ou mais grupos metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) entre o benzilo e ALA, resulta uma capacidade reduzida para induzir a formação de porfirina.

A Figura 9 mostra que os ésteres p-nitrobenzílico e hexílico ambos deram níveis de fluorescência elevados. Obteve-se níveis ligeiramente mais baixos com o éster p-fluorobenzílico.

A Figura 10 mostra que se obteve formação elevada de porfirina (indicada por altos níveis de fluorescência) com os ésteres hexílico e p-[tri-fluorometil]benzílico. Obteve-se níveis de fluorescência intermédios com o éster p-(terc-butil)benzílico. Isto é possivelmente devido ao grupo éster muito volumoso.

É evidente da Figura 11 que foram obtidos níveis de fluorescência elevados com os ésteres hexílico e benzílico.

Observa-se a partir da Figura 12 que foram obtidos valores de fluorescência semelhantes para o éster hexílico a 1% e para a formação de éster 3,3'-dimetil-1-t-butílico a 3%. Assim, os dois ésteres são aproximadamente igualmente eficazes na indução da formação de porfirina na pele.

Pode observar-se a partir da Figura 13 que o éster 4-clorobenzílico deu níveis de fluorescência elevados, enquanto que os ésteres 2,3,4,5,6-pentafluorobenzílico e 2-fluorobenzílico deram actividades intermédias/altas.

Pode observar-se a partir das Figuras 14 e 15 que todos os ésteres de ALA testados, que não o éster hexílico, deram fluorescência intermédia na pele após aplicação tópica.

É evidente da Figura 16 que o éster hexílico deu níveis de fluorescência elevados e os ésteres 3-piridinil-metílico e 4-

metoxi-benzílico deram fluorescência intermédia. O éster 4-difenil-metílico deu fluorescência relativamente baixa.

Pode verificar-se da Figura 17 que o éster benzílico de ALA N-substituído deu fluorescência intermédia/alta, enquanto que os outros três ésteres deram níveis de fluorescência elevados.

Os resultados podem ser sumariados como se segue:

COMPOSTO (i. e., CADEIA LATERAL DO ÉSTER) [COMPOSTO N°]	NÍVEL DE FLUORESCÊNCIA		
	BAIXO	INT.	ALTO
1-metilpentilo [1] #	X		
2-metilpentilo [13] #			X
4-metilpentilo [8] #			X
1-etilbutilo [12] #			X
hexilo [6] #			X
3,3-dimetil-1-butilo [16] #		X	
2-feniletilo [5]	X		
4-fenilbutilo [14] #	X		
benzilo [4]			X
p-isorpopilbenzilo [2]		X	
p-metilbenzilo [3]			X
p-nitrobenzilo [11]			X
p-[trifluorometil]benzilo [9]			X
p-[t-butil]benzilo [10]		X	
p-fluorobenzilo [15]			X
ciclo-hexilo [7] #	X		
2-fluorobenzilo [17]		X	
3-fluorobenzilo [24]		X	



COMPOSTO ( <i>i. e.</i> , CADEIA LATERAL DO ÉSTER) [COMPOSTO N°]	NÍVEL DE FLUORESCÊNCIA		
	BAIXO	INT.	ALTO
2,3,4,5,6-pentafluorobenzilo [18]		X	
4-clorobenzilo [19]			X
3,4-diclorobenzilo [22]		X	
3-nitrobenzilo [21]		X	
4-metoxibenzilo [28]		X	
3-piridinilmetilo [26]		X	
4-difenilmetilo [27]	X		
3-metilbenzilo [31]			X
2-metilbenzilo [29]			X
2-metoxietilo [20]		X	
3,6-dioxa-1-octilo [23] #		X	
3,6,9-trioxa-1-decilo [25] #		X	
5-[(1-acetiloxietoxi)-carbonil]-aminolevulinato de benzilo [30]		X	

Lisboa, 5 de Janeiro de 2007

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Composto para utilização em fotoquimioterapia ou diagnóstico, tendo o referido composto a fórmula



(em que  $R^1$  representa um grupo  $C_1$  ou  $C_2$  alquilo substituído por um ou mais grupos arilo; e

$R^2$  representa independentemente um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo opcionalmente substituído) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

2. Composto como reivindicado na reivindicação 1 em que no grupo  $R^1$  o referido grupo alquilo está substituído terminalmente pelo referido grupo arilo.
3. Composto como reivindicado na reivindicação 1 ou reivindicação 2 em que no grupo  $R^1$  o referido grupo alquilo é metilo.
4. Composto como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 em que o referido grupo arilo está substituído por um ou mais grupos alquilo, alcoxilo, fluoro, cloro, nitro ou trifluorometilo.
5. Composto como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 em que o referido grupo arilo é fenilo, difenilo ou um grupo heteroaromático monocíclico com 5-7 membros.

6. Composto como reivindicado na reivindicação 5 em que o referido grupo arilo é fenilo.
7. Composto como reivindicado na reivindicação 5 em que o referido grupo heteroaromático é piridinilo.
8. Composto como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 7 em que cada  $R^2$  representa um átomo de hidrogénio.
9. Composto de fórmula I:



(em que

$R^1$  representa um grupo  $C_1$  ou  $C_2$  alquilo substituído por arilo, em que o referido grupo arilo está substituído;

$R^2$ , que podem ser iguais ou diferentes, representam um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo opcionalmente substituído;

em que os referidos substituintes são seleccionados de grupos hidroxilo, alcoxilo, aciloxilo, alcoxicarboniloxilo, amino, arilo, nitro, oxo, fluoro,  $-SR^3$ ,  $-NR^3_2$  e  $-PR^3_2$ ,

e o referido grupo alquilo está opcionalmente interrompido por um ou mais grupos  $-O-$ ,  $-NR^3-$ ,  $-S-$  ou  $-PR^3-$ ; e

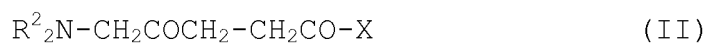
$R^3$  representa um átomo de hidrogénio ou um grupo

C<sub>1-6</sub>alquilo) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

10. Composto como reivindicado na reivindicação 9 em que R<sup>1</sup> representa um grupo C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> alquilo substituído com arilo não heteroaromático em que o referido grupo arilo está substituído.
11. Composto de como reivindicado na reivindicação 9 ou a reivindicação 10 em que em R<sup>1</sup> o referido grupo arilo está substituído por um ou mais grupos alquilo, alcoxilo, fluoro, cloro, nitro ou trifluorometilo.
12. Composto como reivindicado na reivindicação 4 ou a reivindicação 11 em que o referido grupo substituinte alquilo é um grupo C<sub>1-2</sub> alquilo.
13. Composto como reivindicado na reivindicação 4 ou a reivindicação 11 em que o referido grupo substituinte alcoxilo é um grupo metoxilo.
14. Composto como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 9 ou 11 a 13 em que o referido grupo arilo é fenilo, difenilo ou um grupo heteroaromático monocíclico com 5-7 membros.
15. Composto como reivindicado na reivindicação 14 em que o referido grupo arilo é fenilo.
16. Composto como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 9 a 15 em que na fórmula I, cada R<sup>2</sup> representa um átomo de hidrogénio.

17. Composto como reivindicado na reivindicação 16 em que no grupo  $R^1$  o referido grupo arilo é fenilo e o referido grupo alquilo é metilo.
18. Composto como reivindicado na reivindicação 9 que é seleccionado de éster p-metilbenzílico de ALA, éster p-nitrobenzílico de ALA, éster p-[trifluorometil]benzílico de ALA, éster p-fluorobenzílico de ALA, éster 4-clorobenzílico de ALA, éster 3-metilbenzílico de ALA e éster 2-metilbenzílico de ALA.
19. Composto como reivindicado na reivindicação 18 ou éster benzílico de ALA para utilização em fotoquimioterapia ou diagnóstico.
20. Processo para a preparação de composto de fórmula I como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 9 a 18, compreendendo o referido processo pelo menos um dos seguintes passos:

(a) reacção de um composto de fórmula II



(em que X representa um grupo de saída ou COX representa um grupo anidrido de ácido e  $R^2$  é como definido na reivindicação 11)

com um composto de fórmula III



(em que  $R^1$  é como definido na reivindicação 11); e

(b) conversão de um composto de fórmula I num seu sal farmaceuticamente aceitável.

21. Processo de acordo com a reivindicação 20 em que o referido grupo de saída é seleccionado de um grupo hidroxilo, um átomo de halogéneo ou um grupo alcoxilo.
22. Composição farmacêutica compreendendo um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 19 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, conjuntamente com pelo menos um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável.
23. Utilização de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 19, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, para a preparação de um agente terapêutico para utilização em fotoquimioterapia, ou de um agente de diagnóstico para utilização em diagnóstico.
24. Utilização como definido na reivindicação 23 em que a fotoquimioterapia ou o diagnóstico é realizado em distúrbios ou anomalias de superfícies externas ou internas do corpo que respondem a fotoquimioterapia.
25. Produto compreendendo um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 19, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, conjuntamente com, pelo menos, um agente auxiliar de penetração em superfícies, e, opcionalmente, um ou mais agentes quelantes, como uma preparação de associação para utilização simultânea, separada ou sequencial no tratamento de distúrbios ou

anomalias de superfícies externas ou internas do corpo que respondem a fotoquimioterapia.

26. Kit para utilização em fotoquimioterapia de distúrbios ou anomalias de superfícies externas ou internas do corpo compreendendo:

- a) um primeiro recipiente contendo um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 19 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável,
- b) um segundo recipiente contendo, pelo menos, um agente auxiliar de penetração em superfícies; e, opcionalmente,
- c) um ou mais agentes quelantes contidos ou no referido primeiro recipiente ou num terceiro recipiente.

27. Método de diagnóstico *in vitro* de anomalias ou distúrbios por doseamento de uma amostra de fluido corporal ou tecido de um doente, compreendendo o referido método, pelo menos, os seguintes passos:

- i) mistura do referido fluido corporal ou tecido com um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 19,
- ii) exposição da referida mistura a radiação,
- iii) determinação do nível de fluorescência, e
- iv) comparação do nível de fluorescência com os níveis de

controlo.

Lisboa, 5 de Janeiro de 2007



Figura 1

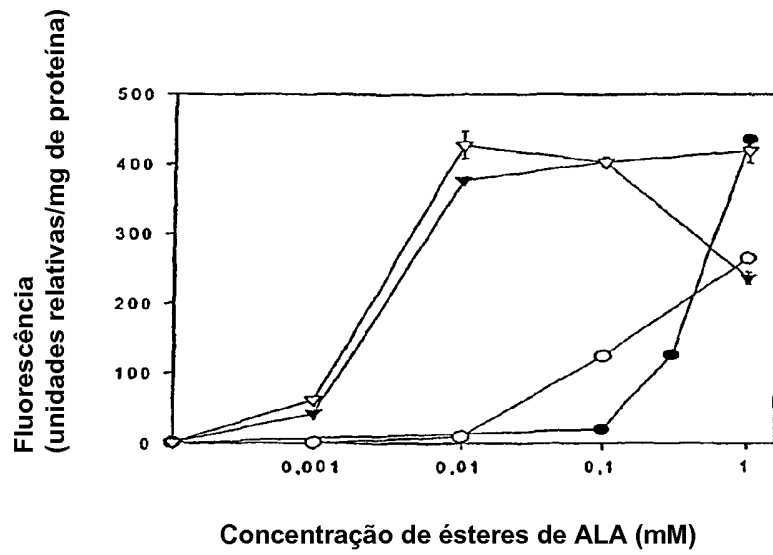


Figura 2

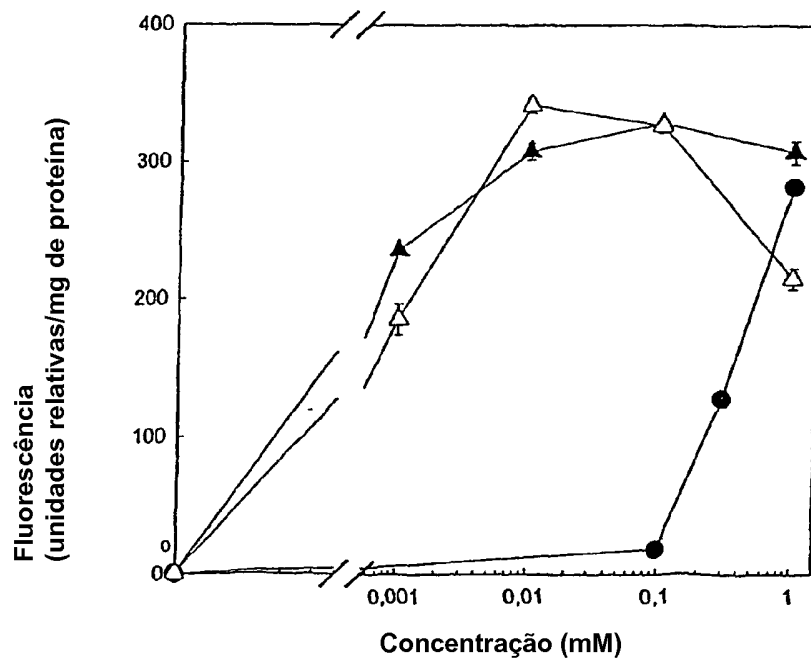


Figura 3

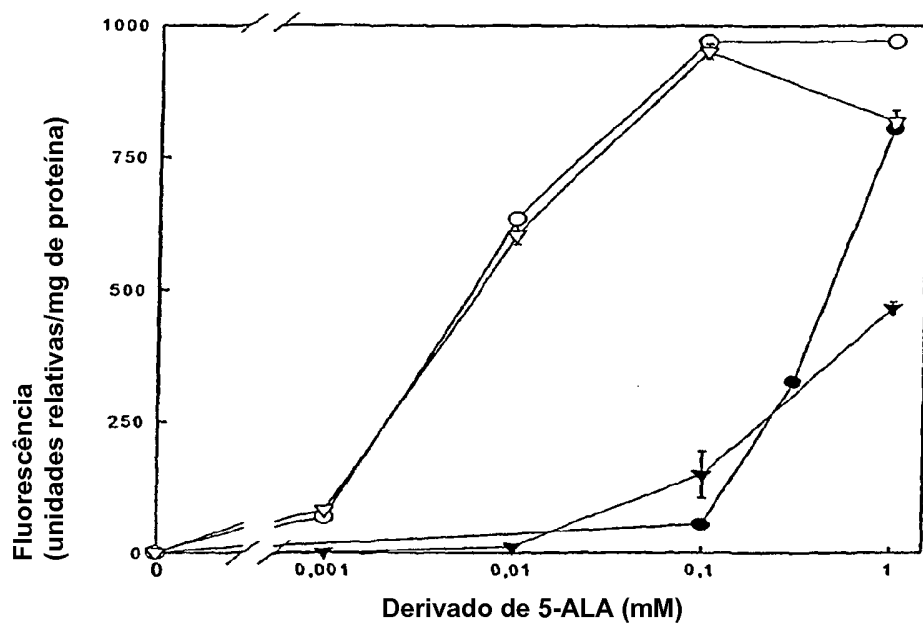


Figura 4

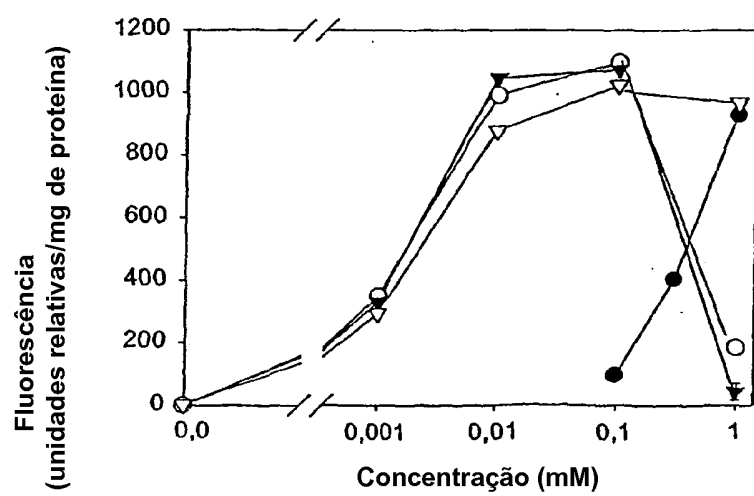


Figura 5

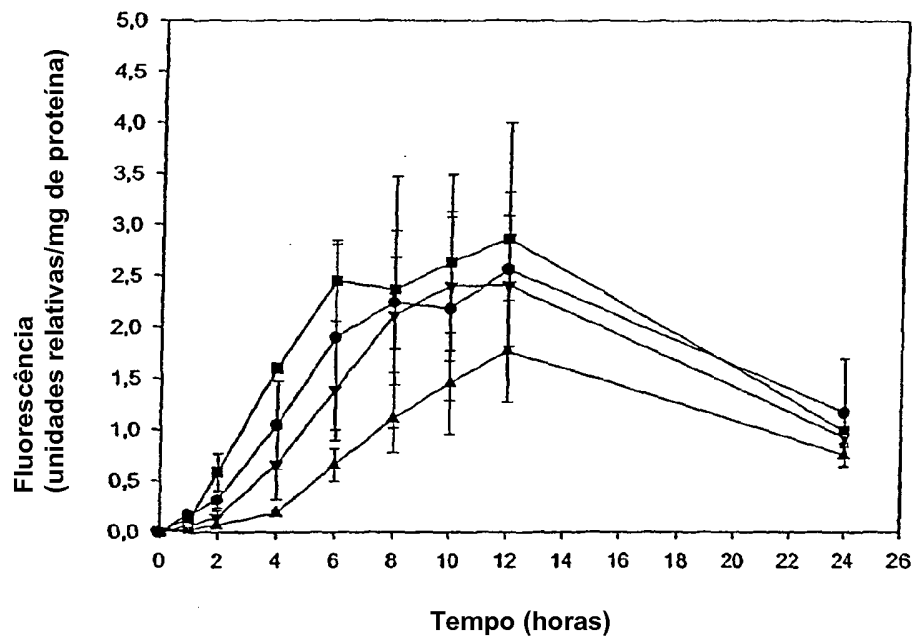


Figura 6

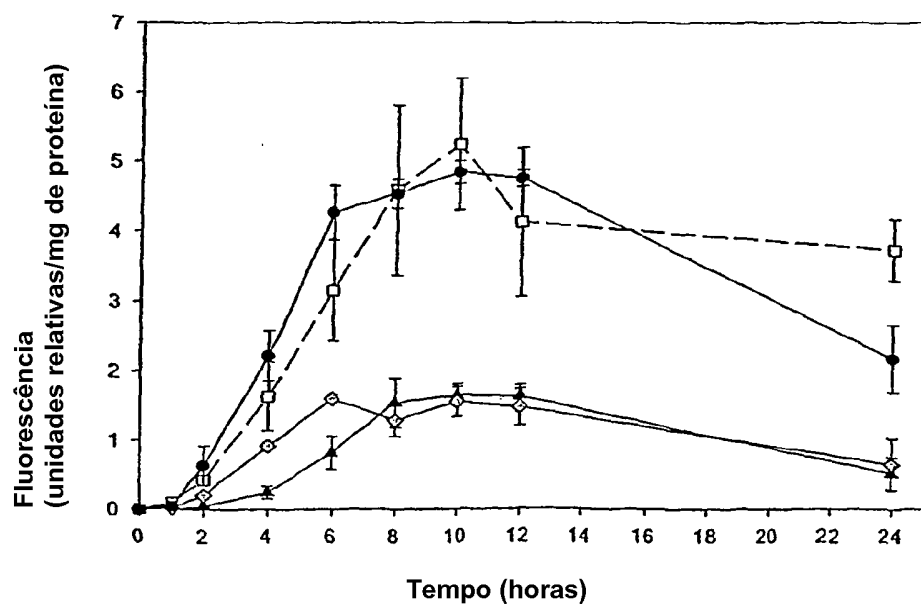


Figura 7

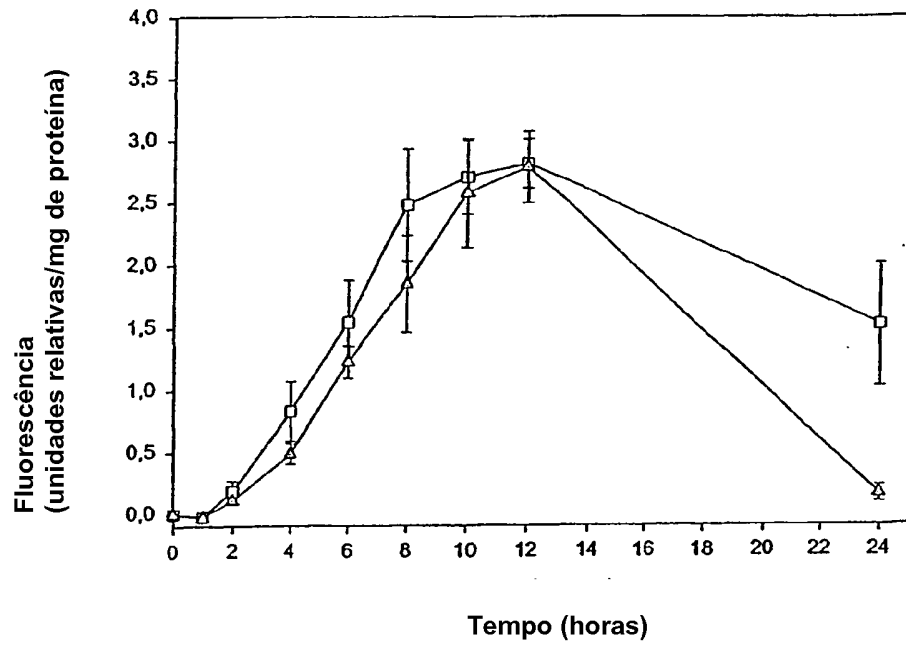


Figura 8

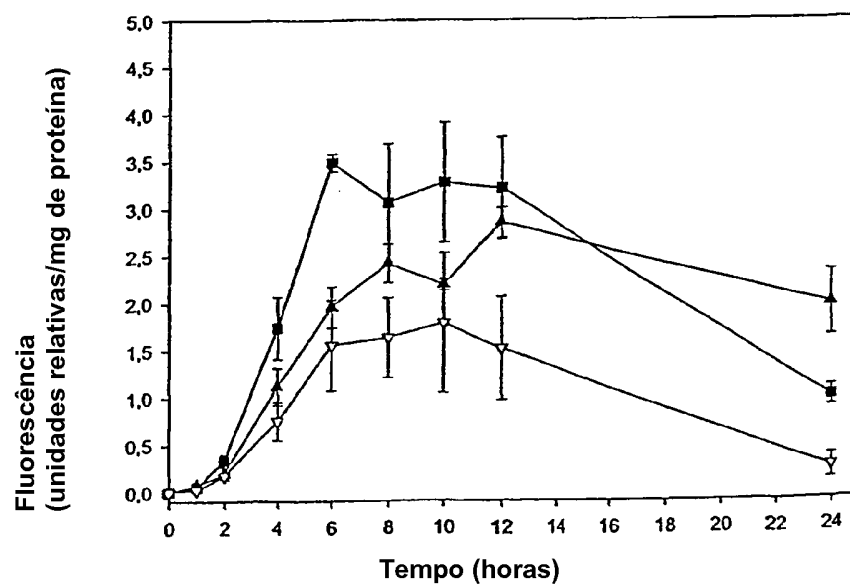


Figura 9

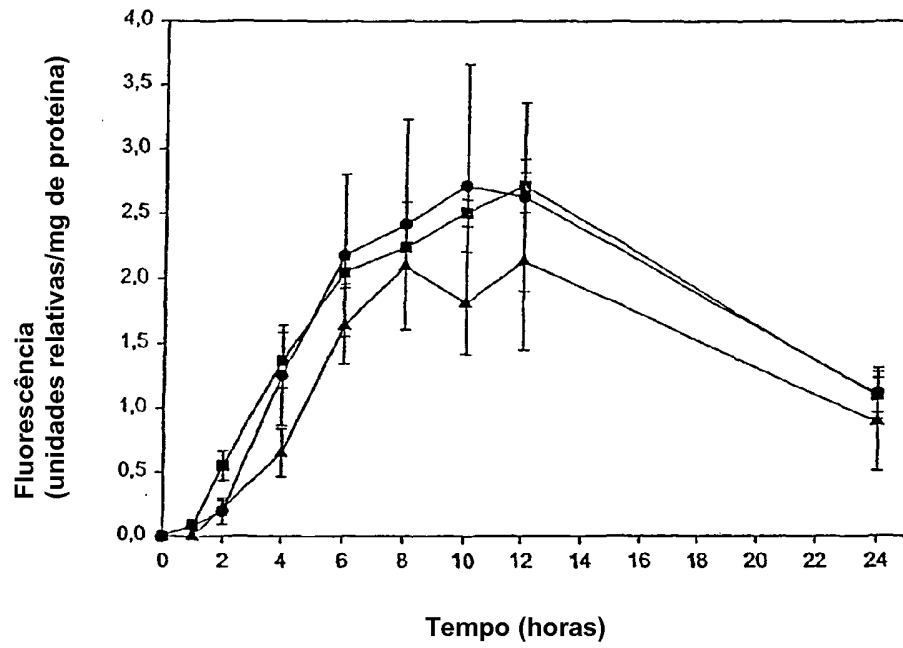


Figura 10

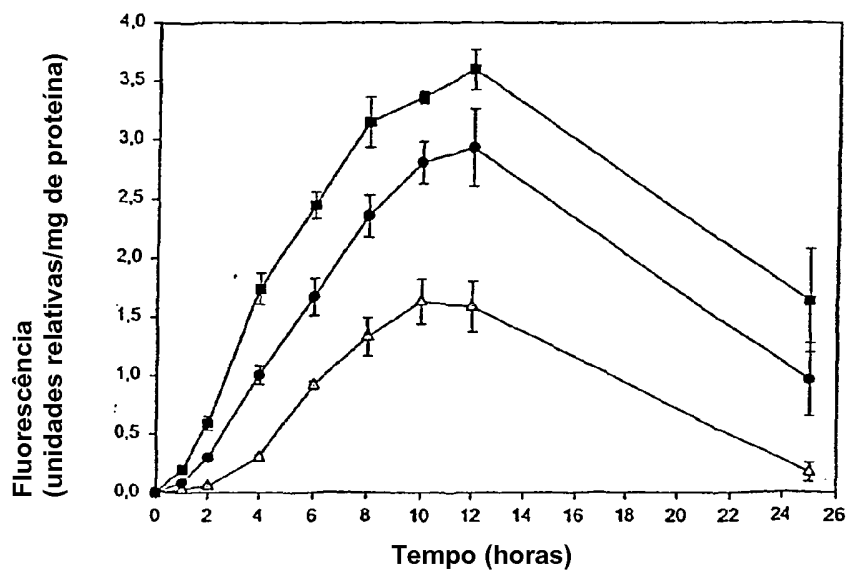


Figura 11

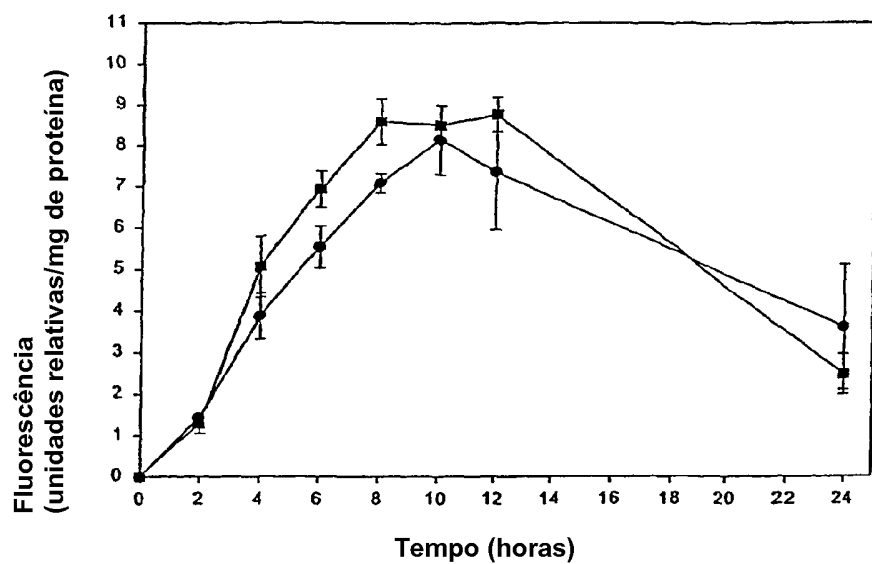


Figura 12

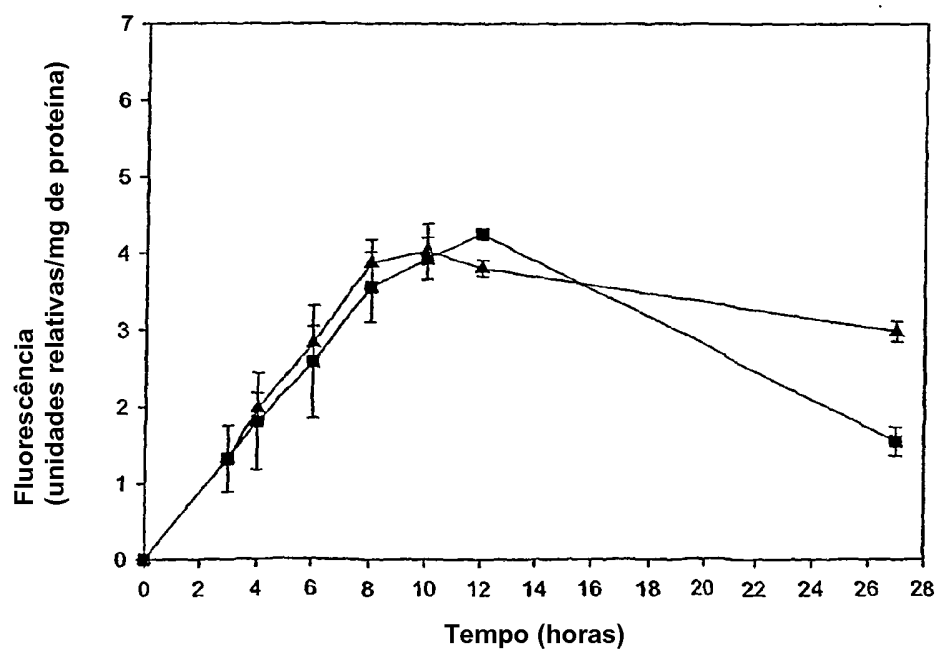


Figura 13

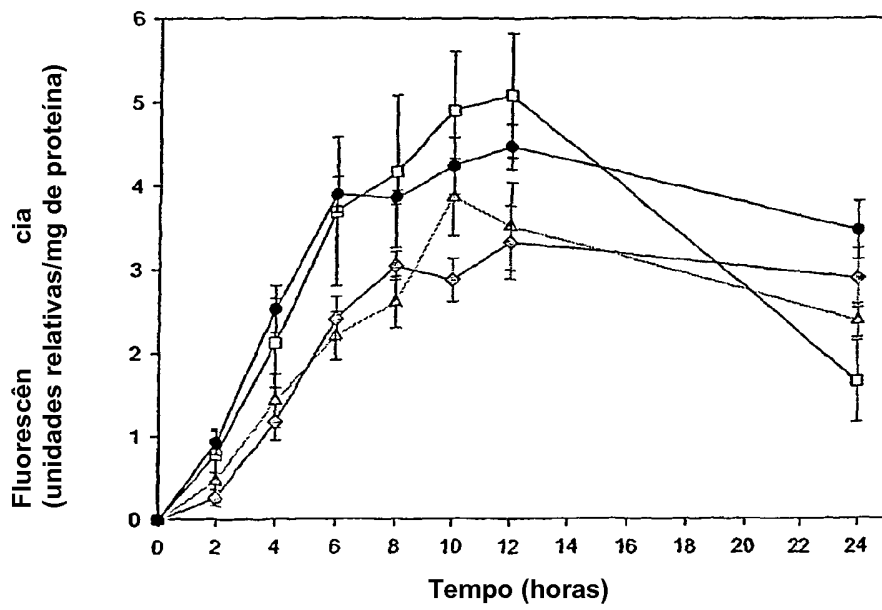


Figura 14

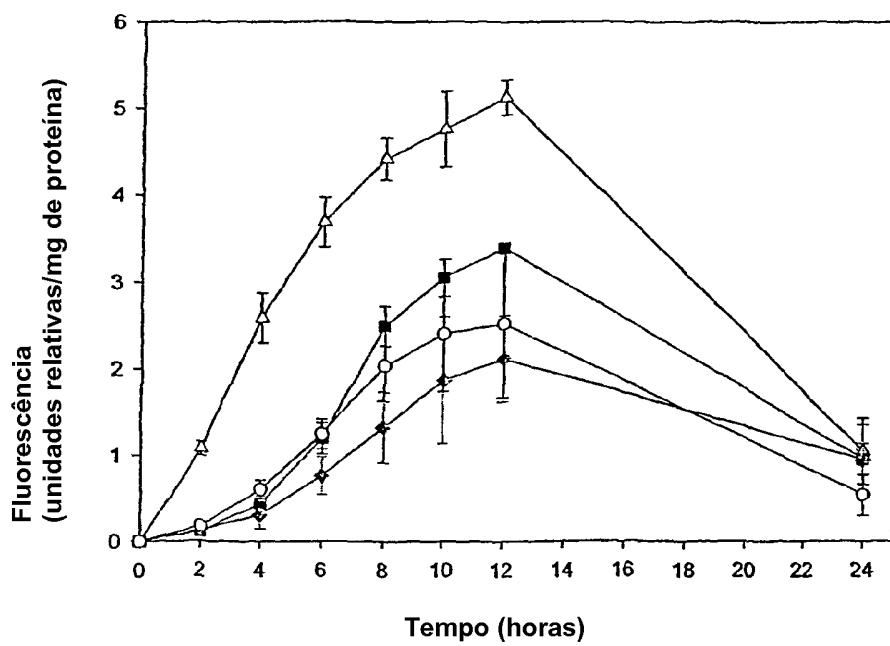


Figura 15

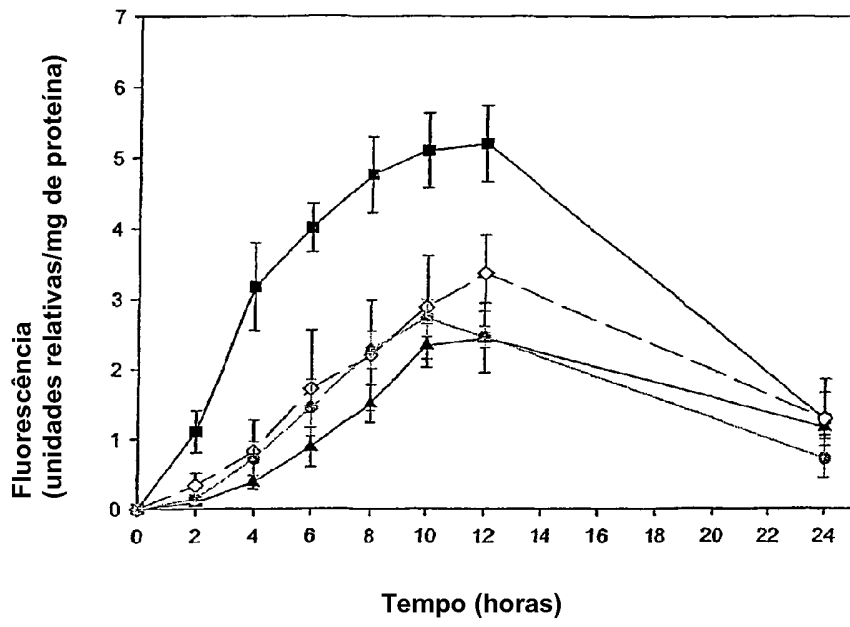


Figura 16

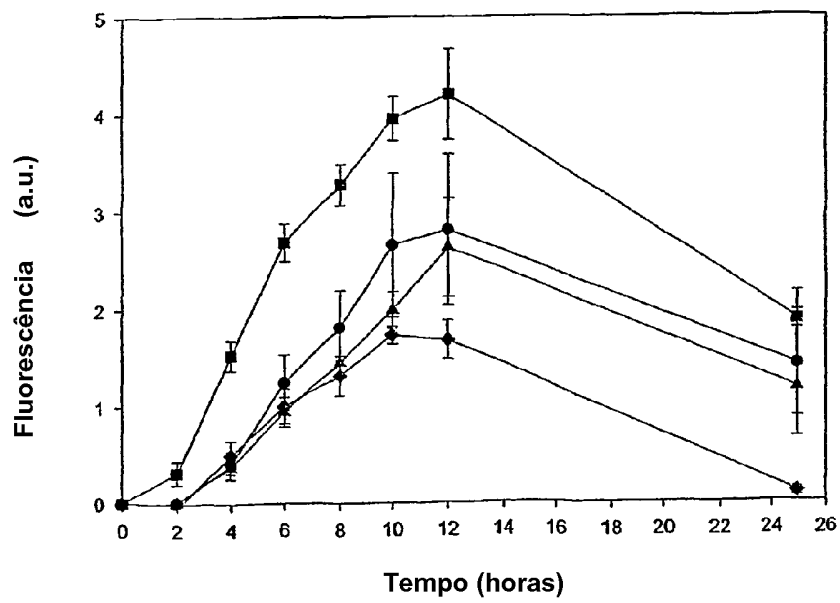




Figura 17

