

(11) Número de Publicação: **PT 1529044 E**

(51) Classificação Internacional:

**C07D 403/06** (2006.01) **C07D 405/12** (2006.01)  
**C07D 401/12** (2006.01) **C07D 409/12** (2006.01)  
**C07D 403/12** (2006.01) **C07D 487/04** (2006.01)  
**A61K 31/496** (2006.01) **A61P 31/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **2003.08.01**

(30) Prioridade(s): **2002.08.02 US 401074 P**  
**2002.09.16 US 411128 P**  
**2003.02.24 US 450063 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.05.11**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.10.03**  
**009/2008**

(73) Titular(es):

**NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.**  
10480 WATERIDGE CIRCLE SAN DIEGO, CA  
92121 **US**

(72) Inventor(es):

**MICHAEL PALLADINO** **US**  
**YOSHIO HAYASHI** **US**  
**JENNIFER GRODBERG** **US**

(74) Mandatário:

**PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA**  
RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA **PT**

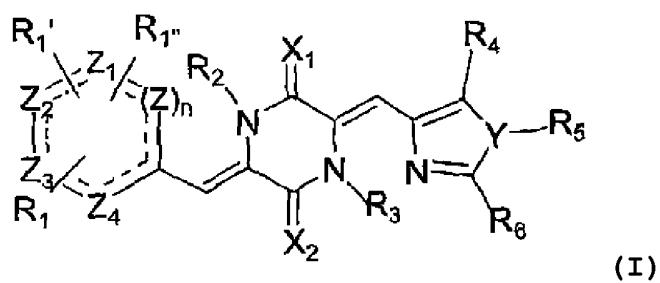
(54) Epígrafe: **DESIDROFENILA-HISTINAS E OS SEUS ANÁLOGOS E A SÍNTESE DE  
DESIDROFENILA-HISTINAS E OS SEUS ANÁLOGOS**

(57) Resumo:

## RESUMO

**“DESIDROFENILA-HISTINAS E OS SEUS ANÁLOGOS E A SÍNTSESE DE  
DESIDROFENILA-HISTINAS E OS SEUS ANÁLOGOS”**

São divulgados compostos representados pela estrutura (I), assim como métodos para preparar esses compostos, em que os referidos métodos compreendem fazer reagir uma diacildicetopiperazina com um primeiro aldeído para produzir um intermediário; e fazer reagir o intermediário com um segundo aldeído para produzir a classe de compostos com a estrutura genérica, em que o primeiro aldeído e o segundo aldeído são seleccionados do grupo consistindo num oxazolecarboxaldeído, imidazolecarboxaldeído, um benzaldeído, derivados de imidazolecarboxaldeído, e derivados de benzaldeído, formando assim o composto acima, em que  $R_1$ ,  $R_1'$ ,  $R_1''$ ,  $R_2$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  e  $R_6$ ,  $X_1$  e  $X_2$ ,  $Y$ ,  $Z$ ,  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$ , e  $Z_4$  pode ser, cada, separadamente, definido de modo consistente com a descrição apresentada no presente documento. São também divulgados compostos e métodos para tratamento do cancro e infecções fúngicas.



## **DESCRIÇÃO**

### **"DESIDROFENILA-HISTINAS E OS SEUS ANÁLOGOS E A SÍNTSESE DE DESIDROFENILA-HISTINAS E OS SEUS ANÁLOGOS"**

#### Antecedentes da Invenção

#### Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a compostos e métodos de preparação sintética nos campos da química e medicina. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a compostos e processos para a preparação de compostos úteis no tratamento do cancro e no tratamento de infecções fúngicas.

#### Breve Descrição da Técnica Relacionada

Crê-se que um mecanismo celular universal único controla a regulação do processo do ciclo celular eucariótico. Ver, e. g., Hartwell, L.H. et al., *Science* (1989), 246: 629-34. Também é sabido que quando surge uma anomalia no mecanismo de controlo do ciclo celular, pode ocorrer um cancro ou um distúrbio imunitário. Desta forma, como também é sabido, os agentes antitumorais e os imunossupressores podem estar entre as substâncias que regulam o ciclo celular. Assim, são necessários novos métodos para produzir inibidores do ciclo celular eucariótico como compostos antitumorais e imunoestimuladores, que deverão ser úteis no tratamento do cancro humano como

agentes quimioterapêuticos, antitumorais. Ver, e. g., Roberge, M. et al., *Cancer Res.* (1994), 54, 6115-21.

Os fungos, especialmente fungos patogénicos e infecções relacionadas, representam um desafio clínico crescente. Os agentes antifúngicos existentes são de eficácia e toxicidade limitada, bem como a descoberta e/ou o desenvolvimento de linhagens de fungos patogénicos resistentes aos fármacos, correntemente disponíveis ou em desenvolvimento. A título de exemplo, os fungos que são patogénicos em humanos incluem entre outros, *Candida spp.*, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei* e *C. galbrata*; *Aspergillus spp.*, incluindo *A. fumigatus* e *A. flavus*; *Cryptococcus neoformans*; *Blastomyces spp.*, incluindo *Blastomyces dermatitidis*; *Pneumocystis carinii*; *Coccidioides immitis*; *Basidiobolus ranarum*; *Conidiobolus spp.*; *Histoplasma capsulatum*; *Rhizopus spp.*, incluindo *R. oryzae* e *R. microsporus*; *Cunninghamella spp.*; *Rhizomucor spp.*; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Pseudallescheria boydii*; *Rhinosporidium seeberi*; e *Sporothrix schenckii* (Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E. 1992 *Medical Mycology*, Lea e Febiger, Malvern, PA).

Recentemente, foi descrito que as triprostatinas A e B (que são dicetopiperazinas consistindo de resíduos de prolina e triptofano isoprenilado), e cinco outras dicetopiperazinas estruturalmente relacionadas, inibiram a progressão do ciclo celular na fase M, ver Cui, C. et al., 1996 *J. Antibiotics* 45:527-33; Cui, C. et al. 1996 *J. Antibiotics* 49:534-40 e que estes compostos também afetam a montagem microtubular, ver Usui, T. et al. 1998 *Biochem J.* 333:543-48; Kondon, M. et al. 1998 *J. Antibiotics* 51:801-04. Além disso, foram descritos compostos naturais e sintéticos que inibem a mitose, inibindo

assim o ciclo celular eucariótico, por ligação ao sítio de ligação da colchicina (sítio CLC) na tubulina, que é uma macromolécula que consiste de duas sub-unidades de 50 kDa (αβ e γ tubulina) e é o principal componente dos microtúbulos. Ver, e. g., Iwasaki, S., 1993 Med. Res. Rev. 13:163-198; Hameal, E. 1996 Med. Res. Rev. 16:207-31; Weisenberg, R.C. et al., 1969 Biochemistry 7:4466-79. Crê-se que os microtúbulos estejam envolvidos em várias funções celulares essenciais, tais como no transporte axonal, mobilidade celular e determinação da morfologia celular. Assim, os inibidores das funções dos microtúbulos podem ter uma ampla actividade biológica e ser aplicáveis para objectivos medicinais e agroquímicos. Também é possível que ligandos do sítio CLC da colchicina, tais como CLC, esteganacina, ver Kupchan, S.M. et al., 1973 J. Am. Chem. Soc. 95:1335-36, podofilotoxina, ver Sackett, D.L., 1993 Pharmacol. Ther. 59:163-228, e combretastatinas, ver Pettit, G.R. et al., 1995 J. Med. Chem. 38:166-67, podem provar ser valiosos como inibidores do ciclo celular eucariótico e, assim, podem ser úteis como agentes quimioterapêuticos.

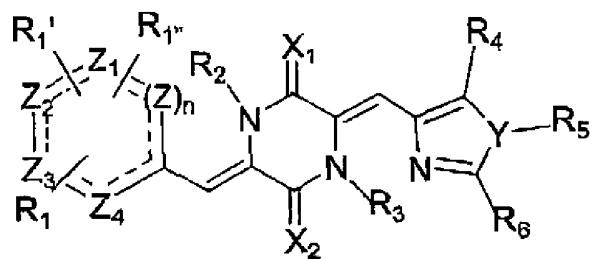
Embora metabolitos do tipo dicetopiperazina tenham sido isolados de vários fungos como micotoxinas, ver Horak R. M. et al., 1981 J. C. S. Chem. Comm. 1265-67, All M. et al., 1898 Toxicology Letters 48:235-41 ou como metabolitos secundários, ver Smedsgaard J. et al., 1996 J. Microbiol. Meth. 25:5-17, sabe-se pouco acerca da estrutura específica dos metabolitos do tipo dicetopiperazina ou os seus derivados e a sua actividade antitumoral, particularmente *in vivo*. Estes compostos não foram apenas isolados como micotoxinas, mas foi descrita a síntese química de um tipo de metabolito do tipo dicetopiperazina, fenila-histina, por Hayashi et al. em J. Org. Chem. (2000) 85, página 8402. Na técnica, foi preparado um tal derivado de

metabolito do tipo dicetopiperazina, desidrofenila-histina, por desidrogenação enzimática da sua fenila-histina precursora. Com o aumento da incidência do cancro, existe uma necessidade particular de produzir quimicamente uma classe de derivados de metabolito do tipo dicetopiperazina substancialmente purificados tendo actividade inibidora de proliferação de células animais específicas e grande selectividade e actividade antitumoral. Existe então uma necessidade particular de um método eficiente de produzir sinteticamente derivados de metabolito do tipo dicetopiperazina substancialmente purificados e caracterizados estruturalmente e biologicamente.

Além disso, a publicação PCT WO/0153290 (26 de Julho de 2001), descreve um método não-sintético para produzir desidrofenila-histina por exposição de fenila-histina ou um análogo particular da fenila-histina à desidrogenase obtida de *Streptomyces albulus*.

#### Resumo da Invenção

São divulgados compostos e métodos para a produção sintética de compostos, para uma classe de compostos tendo a estrutura de fórmula (I):



(I)

Os compostos divulgados têm a estrutura de fórmula (I) em que:

$R_1$ ,  $R_4$  e  $R_6$  são, cada um separadamente, seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo $C_1-C_{24}$  saturado, alcenilo $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos, hidroxilo, carboxilo,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluindo alquilo poli-halogenado, carbonilo halogenado e carbonilo  $-CCO-R_7$ , em que  $R_7$  é seleccionado de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo $C_1-C_{24}$  saturado, alcenilo $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos;

$R_1'$  e  $R_1''$  são independentemente seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo $C_1-C_{24}$  saturado, alcenilo $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos, hidroxilo, carboxilo,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluindo alquilo poli-halogenado, carbonilo halogenado e carbonilo  $-CCO-R_7$ , em que  $R_7$  é seleccionado de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo $C_1-C_{24}$  saturado, alcenilo $C_1-C_{24}$  insaturado,

cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos;

$R_2$ ,  $R_3$  e  $R_5$  são, cada, separadamente, seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo saturado $C_1-C_{12}$ , alcenilo $C_1-C_{12}$  insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro e grupos nitro substituídos, sulfonilo e grupos sulfonilo substituídos;

$X_1$  e  $X_2$  são separadamente seleccionados do grupo consistindo de um átomo de oxigénio, um átomo de azoto e um átomo de enxofre, cada, substituído ou não substituído com um grupo  $R_5$ , como definido acima;

$Y$  é seleccionado do grupo consistindo de um átomo de azoto, um átomo de azoto substituído com um grupo  $R_5$  de cima, um átomo de oxigénio, um átomo de enxofre, um átomo de enxofre oxidado, um grupo metileno e um grupo metileno substituído;

$n$  é um número inteiro igual a zero, um ou dois;

$Z$ , para cada  $n$  separado, se não for zero e  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  e  $Z_4$  são separadamente seleccionados de um átomo de carbono, um átomo de enxofre, um átomo de azoto ou um átomo de oxigénio; e

as ligações a tracejado podem ser ligações simples ou duplas;

O método comprehende os passos de:

fazer reagir uma diacildicetopiperazina com um primeiro aldeído para produzir um intermediário; e

fazer reagir o referido intermediário com um segundo aldeído para produzir o referido composto, em que

o referido primeiro aldeído e o referido segundo aldeído são seleccionados do grupo consistindo de um oxazolecarboxaldeído, imidazolecarboxaldeído, um benzaldeído, derivados de imidazolecarboxaldeído e derivados de benzaldeído, formando assim o composto.

Os compostos divulgados têm a estrutura de fórmula (I), em que:

$R_1$ ,  $R_4$  e  $R_6$  são, cada, separadamente, seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo $C_1-C_{24}$  saturado, alcenilo $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos, hidroxilo, carboxilo,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluindo alquilo poli-halogenado, carbonilo halogenado e carbonilo  $-CCO-R_7$ , em que  $R_7$  é seleccionado de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo $C_1-C_{24}$  saturado, alcenilo $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo

substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos;

$R_1'$  e  $R_1''$  são, cada, independentemente seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo $C_1-C_{24}$  saturado, alcenilo $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos, hidroxilo, carboxilo,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluindo alquilo poli-halogenado, carbonilo halogenado e carbonilo  $-CCO-R_7$ , em que  $R_7$  é seleccionado de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo $C_1-C_{24}$  saturado, alcenilo $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos;

$R_2$ ,  $R_3$  e  $R_5$  são, cada, separadamente, seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo saturado $C_1-C_{12}$ , alcenilo $C_1-C_{12}$  insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro e grupos nitro substituídos, sulfonilo e grupos sulfonilo substituídos;

$X_1$  e  $X_2$  são separadamente seleccionados do grupo consistindo de um átomo de oxigénio, um átomo de azoto e um átomo de enxofre, cada, substituído ou não substituído com um grupo  $R_5$ , como definido acima;

Y é seleccionado do grupo consistindo de um átomo de azoto, um átomo de azoto substituído com um grupo R<sub>5</sub> de cima, um átomo de oxigénio, um átomo de enxofre, um átomo de enxofre oxidado, um grupo metileno e um grupo metileno substituído;

n é um número inteiro igual a zero, um ou dois;

Z, para cada n separado, se não for zero e Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> e Z<sub>4</sub> são separadamente seleccionados de um átomo de carbono, um átomo de enxofre, um átomo de azoto ou um átomo de oxigénio; e

as ligações a tracejado podem ser ligações simples ou duplas;

Em formas de realização preferidas do composto e do método, o imidazolecarboxaldeído é 5-(1,1-dimetil-2-etyl)imidazole-4-carboxaldeído e o benzaldeído compreende um único grupo metoxilo. Formas de realização adicionais preferidas dos compostos aqui descritos, incluem compostos tendo um grupo t-butilo, um grupo dimetoxilo, um grupo cloro e um grupo metiltiofeno e métodos para fazer tais compostos, assim como os compostos descritos nas Tabelas 2, 3 e 4, assim como métodos para fazer tais compostos.

São também divulgados métodos e materiais para tratamento de tecido neoplásico ou prevenção de cancros ou infecções por fungos patogénicos. Estes métodos e materiais são, particularmente, bem adequados para o tratamento de indivíduos mamíferos, mais particularmente em humanos e envolvem a administração ao indivíduo de desidrofenila-histina ou seu análogo. O método compreende a administração ao indivíduo, de

uma composição compreendendo uma quantidade efectiva antitumoral ou antifúngica de desidrofenila-histina ou o seu análogo.

#### Breve Descrição dos Desenhos

Os desenhos anexos que são aqui incorporados e formam parte da descrição, apenas ilustram determinadas formas de realização preferidas da presente invenção. Conjuntamente com o resto da descrição, servem para explicar os modos preferidos de produzir determinados compostos da invenção pelos especialistas na técnica. Nos desenhos:

A figura 1 ilustra um esquema de reacção para produzir desidrofenila-histinas pela reacção de uma diacildicetopiperazina 1 com um imidazolecarboxaldeído 2 para obter um intermediário 3 que é feito reagir com um benzaldeído 4 para produzir uma desidrofenila-histina.

A figura 2 representa o perfil de HPLC da desidrofenila-histina sintética em bruto.

A figura 3 ilustra um esquema de reacção para produzir desidrofenila-histinas pela reacção de uma diacildicetopiperazina 1 com um benzaldeído 4 para obter um intermediário 17 que é feito reagir com um imidazolecarboxaldeído 15 para produzir uma desidrofenila-histina.

A figura 4 representa o perfil de HPLC da tBu-desidrofenila-histina sintética em bruto produzida a partir da Via A e da Via B.

A figura 5 ilustra duas estratégias de modificação para a desidroPLH para actividade citotóxica potente.

A figura 6 representa a putativa conformação activa da desidroPLH na unidade fenilo.

A figura 7 representa o metabolismo do Citocromo P450 da fenila-histina.

A figura 8 ilustra a migração Z-E da tBu-desidroPLH.

A figura 9 representa o diagrama de síntese e do pró-fármaco da acilo-E-tBu-desidroPLH.

A figura 10 representa o gradiente de temperatura da 3-Z-benzilideno-6-[5''-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4''-Z-ilmetileno]-piperazina-2,5-diona.

A figura 11 representa o gradiente de temperatura da 3-Z-Benzilideno-6-(5''-terc-butil-1H-imidazol-4''-Z-ilmetileno)-piperazina-2,5-diona.

A figura 12 representa o efeito de KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina em comparação com colchicina e taxol na permeabilidade da mono-camada HuVEC para FITC-Dextrano.

A figura 13 representa o efeito de KPU-2 isolada e em combinação com CPT-11 no crescimento tumoral estimado no modelo de Xenoenxerto do Tumor de Cólón Humano HT-29.

A figura 14 representa o efeito de KPU-2 isoladamente e em combinação com CPT-11 no peso de tumores retirados na autópsia de murganhos individuais no modelo de Xenoenxerto do Tumor de Cólón Humano HT-29.

A figura 15 representa o efeito de KPU-2 isolada e em combinação com CPT-11 no crescimento tumoral estimado no modelo de Xenoenxerto do Tumor de Cólón Humano HT-29.

A figura 16 representa o efeito de KPU-2 isolada e em combinação com CPT-11 no peso de tumores retirados na autópsia de murganhos individuais no modelo de Xenoenxerto do Tumor de Cólón Humano HT-29.

A figura 17 representa os efeitos de: A. KPU-2, B. KPU-35 e C. t-butil-fenila-histina isolada e em combinação com CPT-11 no crescimento tumoral estimado no modelo de Xenoenxerto do Tumor de Cólón Humano HT-29.

A figura 18 representa os efeitos de A. KPU-2, B. KPU-35 e C. t-butil-fenila-histina isolada e em combinação com CPT-11 no peso de tumores retirados na autópsia de murganhos individuais no modelo de Xenoenxerto do Tumor de Cólón Humano HT-29.

A figura 19 representa os efeitos de KPU-2 isolada e em combinação com CPT-11 no crescimento tumoral no modelo de Xenoenxerto do Tumor de Cólón Humano HT-29: comparação de três estudos.

A figura 20 representa os efeitos de KPU-2 isolada e em combinação com CPT-11 em pesos finais de tumor no modelo de

Xenoenxerto do Tumor de Cólón Humano HT-29: comparação de três estudos.

A figura 21 representa os efeitos de KPU-2 isoladamente ou em combinação com Taxotere no crescimento tumoral estimado no modelo de Xenoenxerto do Tumor da Próstata Humano DU-145.

A figura 22 representa os efeitos de: A. KPU-2, B. KPU-35 e C. t-butil-fenila-histina isolada e em combinação com Taxotere no crescimento tumoral estimado baseado em observações feitas durante a porção em vida do modelo de Xenoenxerto do Tumor da Próstata Humano DU-145.

A figura 23 representa os efeitos de KPU-2 isolada e em combinação com Taxotere nos pesos individuais de tumores retirados em autópsia no modelo de Xenoenxerto do Tumor da Próstata Humano DU-145.

A figura 24 representa os efeitos de KPU-35 isolada e em combinação com Taxotere nos pesos individuais de tumores retirados em autópsia no modelo de Xenoenxerto do Tumor da Próstata Humano DU-145.

A figura 25 representa os efeitos de: A. KPU-2, B. KPU-35 e C. t-butil-fenila-histina isolada e em combinação com Taxotere no modelo de Xenoenxerto do Tumor da Mama Humano MCF-7.

A figura 26 representa os efeitos de KPU-2 isolada e em combinação com Taxotere no crescimento tumoral estimado no modelo de Xenoenxerto do Tumor Pulmonar Humano A549.

A figura 27 representa os efeitos de KPU-2 isolada e em combinação com Taxotere nos pesos de tumor retirados em autópsia no modelo de Xenoenxerto do Tumor Pulmonar Humano A549.

A figura 28 representa os efeitos de KPU-2 isolada e em combinação com Paclitaxel no peso estimado de um tumor no modelo de Xenoenxerto do Tumor da Mama Humano MDA-231 implantado numa almofada adiposa mamária de murino.

A figura 29 representa efeitos de: A. KPU-2, B. KPU-35 e C. t-butil-fenila-histina isolada e em combinação com Paclitaxel no modelo de Tumor Metastático B16 F10 de Melanoma de Murino. Em determinadas Figuras, os compostos são identificados utilizando uma designação alternativa. É apresentado a seguir um quadro completo para converter estas designações alternativas:

<b>Designação Alternativa</b>	<b>Designação aqui utilizada</b>
NPI-2350	(-)-fenila-histina
NPI-2352	KPU-01
NPI-2353	KPU-03
NPI-2354	KPU-04
NPI-2355	KPU-05
NPI-2356	KPU-06
NPI-2357	KPU-07
NPI-2358	KPU-02
NPI-2359	KPU-08
NPI-2360	KPU-09
NPI-2361	KPU-10
NPI-2362	KUP-11
NPI-2363	KPU-12

(continuação)

<b>Designação Alternativa</b>	<b>Designação aqui utilizada</b>
NPI-2364	KPU-13
NPI-2365	KPU-14
NPI-2366	KPU-15
NPI-2367	KPU-16
NPI-2368	KPU-17
NPI-2369	KPU-18
NPI-2370	KPU-19
NPI-2371	KPU-21
NPI-2372	KPU-22
NPI-2373	KPU-23
NPI-2374	KPU-24
NPI-2375	KPU-25
NPI-2376	KPU-28
NPI-2377	KPU-26
NPI-2378	KPU-27
NPI-2379	KPU-29
NPI-2380	KPU-20
NPI-2381	KPU-30
NPI-2382	KPU-31
NPI-2383	KPU-32
NPI-2384	KPU-33
NPI-2385	KPU-34
NPI-2386	KPU-35
NPI-2387	KPU-36
NPI-2388	KPU-37
NPI-2389	KPU-38
NPI-2390	KPU-39
NPI-2391	KPU-40

(continuação)

<b>Designação Alternativa</b>	<b>Designação aqui utilizada</b>
NPI-2392	KPU-41
NPI-2393	KPU-42
NPI-2394	KPU-43
NPI-2395	KPU-44
NPI-2396	KPU-45
NPI-2397	KPU-46
NPI-2398	KPU-47
NPI-2399	KPU-48
NPI-2400	KPU-49
NPI-2401	KPU-50
NPI-2402	KPU-51
NPI-2403	KPU-52
NPI-2404	KPU-53
NPI-2405	KPU-54
NPI-2406	KPU-55
NPI-2407	KPU-56
NPI-2408	KPU-57
NPI-2409	KPU-58
NPI-2410	KPU-59
NPI-2411	KPU-60
NPI-2412	KPU-61
NPI-2413	KPU-62
NPI-2414	KPU-63
NPI-2415	KPU-64
NPI-2416	KPU-65
NPI-2417	KPU-66
NPI-2418	KPU-67
NPI-2419	KPU-68

(continuação)

<b>Designação Alternativa</b>	<b>Designação aqui utilizada</b>
NPI-2420	KPU-69
NPI-2421	KPU-70
NPI-2422	KPU-71
NPI-2423	KPU-72
NPI-2424	KPU-73
NPI-2425	KPU-74
NPI-2426	KPU-75
NPI-2427	KPU-76
NPI-2428	KPU-77
NPI-2429	KPU-79
NPI-2430	KPU-80
NPI-2431	KPU-81
NPI-2432	KPU-82
NPI-2433	KPU-83
NPI-2434	KPU-84
NPI-2435	KPU-86
NPI-2436	KPU-87
NPI-2437	KPU-88
NPI-2438	KPU-89
NPI-2439	KPU-90
NPI-2440	KPU-91
NPI-2441	KPU-92
NPI-2442	KPU-80
NPI-2455	KPU-94
NPI-2456	KPU-95
NPI-2457	KPU-96
NPI-2458	KPU-97
NPI-2459	KPU-98

(continuação)

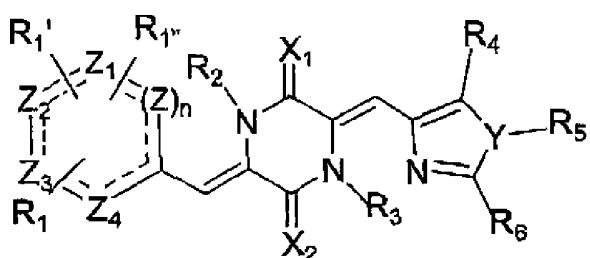
<b>Designação Alternativa</b>	<b>Designação aqui utilizada</b>
NPI-2460	t-butil-fenila-histina

Descrição Detalhada da Forma de Realização Preferida

A descrição proporciona métodos para a preparação sintética de compostos, incluindo novos compostos, incluindo desidrofenila-histina e análogos de desidrofenila-histina e proporciona métodos para produzir inibidores de ciclo celular farmaceuticamente aceitáveis, agentes antitumorais e agentes antifúngicos com rendimento relativamente alto, em que os referidos compostos e/ou os seus derivados estão entre os ingredientes activos nestes inibidores de ciclo celular, agentes antitumorais e agentes antifúngicos. Outros objectivos incluem proporcionar novos compostos não obteníveis pelos métodos não sintéticos, actualmente disponíveis. É também um objectivo proporcionar um método de tratamento do cancro, particularmente cancro humano, compreendendo o passo de administrar uma quantidade eficaz para inibir o crescimento tumoral de um membro de uma classe de novos compostos antitumorais. Esta invenção também proporciona um método para prevenir ou tratar um fungo patogénico num indivíduo envolvendo a administração ao indivíduo uma quantidade eficaz de antifúngico de um membro de uma classe de novos compostos antifúngicos, e. g., administrando uma desidrofenila-histina ou o seu análogo numa quantidade e modo que proporcionem o efeito antifúngico pretendido. Estes objectivos são alcançados na forma de realização preferida dos compostos e métodos de preparação e utilização desses compostos

aqui divulgados, mas não necessariamente em todas as formas de realização da presente invenção.

Também são aqui divulgados compostos e métodos de produzir uma classe de compostos, em que os compostos são representados pela Fórmula (I):



(I)

em que:

$R_1$ ,  $R_4$  e  $R_6$  são, cada, separadamente, seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alceniloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos, hidroxilo, carboxilo, -CO-O-R<sub>7</sub>, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluindo alquilo poli-halogenado, carbonilo halogenado e carbonilo -CCO-R<sub>7</sub>, em que R<sub>7</sub> é seleccionado de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alceniloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos;

$R_1'$  e  $R_1''$  são, cada, independentemente seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo $C_1-C_{24}$  saturado, alcenilo $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos, hidroxilo, carboxilo,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluindo alquilo poli-halogenado, carbonilo halogenado e carbonilo  $-CCO-R_7$ , em que  $R_7$  é seleccionado de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo $C_1-C_{24}$  saturado, alcenilo $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos;

$R_1'$  e  $R_1''$  são ou não covalentemente ligados um ao outro;

$R_2$ ,  $R_3$  e  $R_5$  são, cada, separadamente, seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo saturado $C_1-C_{12}$ , alcenilo $C_1-C_{12}$  insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro e grupos nitro substituídos, sulfonilo e grupos sulfonilo substituídos;

$X_1$  e  $X_2$  são separadamente seleccionados do grupo consistindo de um átomo de oxigénio, um átomo de azoto e um átomo de enxofre, cada, substituído ou não substituído com um grupo  $R_5$ , como definido acima;

Y é seleccionado do grupo consistindo de um átomo de azoto, um átomo de azoto substituído com um grupo R<sub>5</sub> de cima, um átomo de oxigénio, um átomo de enxofre, um átomo de enxofre oxidado, um grupo metileno e um grupo metileno substituído;

n é um número inteiro igual a zero, um ou dois;

Z, para cada n separado, se não for zero e Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> e Z<sub>4</sub> são separadamente seleccionados de um átomo de carbono, um átomo de enxofre, um átomo de azoto ou um átomo de oxigénio; e

as ligações a tracejado podem ser ligações simples ou duplas.

O método comprehende um método de produzir compostos de Fórmula (I) através dos passos de:

fazer reagir uma diacildicetopiperazina com um primeiro aldeído para produzir um intermediário; e  
fazer reagir o referido intermediário com um segundo aldeído para produzir o referido composto, em que

o referido primeiro aldeído e o referido segundo aldeído são seleccionados do grupo consistindo de um oxazolecarboxaldeído, imidazolecarboxaldeído, um benzaldeído, derivados de imidazolecarboxaldeído, e derivados de benzaldeído, formando assim um composto de Fórmula (I) em que

$R_1$ ,  $R_4$  e  $R_6$  são, cada, separadamente, seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alceniloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos, hidroxilo, carboxilo, -CO-O-R<sub>7</sub>, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluindo alquilo poli-halogenado, carbonilo halogenado e carbonilo -CCO-R<sub>7</sub>, em que R<sub>7</sub> é seleccionado de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alceniloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos;

$R_1'$  e  $R_1''$  são, cada, independentemente seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alceniloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos, hidroxilo, carboxilo, -CO-O-R<sub>7</sub>, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluindo alquilo poli-halogenado, carbonilo halogenado e carbonilo -CCO-R<sub>7</sub>, em que R<sub>7</sub> é seleccionado de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alceniloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo

substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos;

$R_2$ ,  $R_3$  e  $R_5$  são, cada, separadamente, seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo saturado $C_1-C_{12}$ , alcenilo $C_1-C_{12}$  insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro e grupos nitro substituídos, sulfonilo e grupos sulfonilo substituídos;

$X_1$  e  $X_2$  são separadamente seleccionados do grupo consistindo de um átomo de oxigénio, um átomo de azoto e um átomo de enxofre, e

$Y$  é seleccionado do grupo consistindo de um átomo de azoto, um átomo de azoto substituído com um grupo  $R_5$  de cima, um átomo de oxigénio, um átomo de enxofre, um átomo de enxofre oxidado, um grupo metíleno e um grupo metíleno substituído;

$Z$ , para cada  $n$  separado, se não for zero e  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  e  $Z_4$  são, cada, separadamente seleccionados de um átomo de carbono, um átomo de enxofre, um átomo de azoto ou um átomo de oxigénio; e

as ligações a tracejado podem ser ligações simples ou duplas.

São também proporcionados sais farmaceuticamente aceitáveis e ésteres de pró-fármaco do composto de Fórmulas (I) e (II) e proporcionados métodos de sintetizar esses compostos pelos métodos aqui divulgados.

O termo "éster de pró-fármaco", especialmente quando se refere a um éster de pró-fármaco do composto de Fórmula (I) sintetizado pelos métodos aqui divulgados, refere-se a um derivado químico do composto que é transformado rapidamente *in vivo* para obter o composto, por exemplo, por hidrólise no sangue ou dentro de tecidos. O termo "éster de pró-fármaco" refere-se a derivados dos compostos aqui divulgados formados pela adição de vários grupos formadores de éster que são hidrolisados sob condições fisiológicas. Exemplos de grupos de éster de pró-fármaco incluem pivoiloximetilo, acetoximetilo, ftalidilo, indanilo e metoximetilo, assim como esses outros grupos conhecidos na técnica, incluindo um grupo (5-R-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo. Outros exemplos de grupos éster de pró-fármaco podem ser encontrados, por exemplo, em T. Higuchi e V. Stella, em "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14, A. C. S. Symposium Series, American Chemical Society (1975); e "Bioreversible Carriers in Drug Design; Theory of Application", editado por E. B. Roche, Pergamon Press, Nova Iorque, 14-21 (1987) (proporcionando exemplos de ésteres úteis como pró-fármacos para compostos contendo grupos carboxilo).

O termo "éster de pró-fármaco", como aqui utilizado, também se refere a um derivado químico do composto que é rapidamente transformado *in vivo* para obter o composto, por exemplo, por hidrólise no sangue. O termo "éster de pró-fármaco" refere-se a derivados dos compostos aqui divulgados formados pela adição de qualquer um de vários grupos formadores de éster que são hidrolisados sob condições fisiológicas. Exemplos de grupos éster de pró-fármaco incluem pivoiloximetilo, acetoximetilo, ftalidilo, indanilo e metoximetilo, assim como esses outros grupos conhecidos na técnica, incluindo um grupo (5-R-2-oxo-1,3-

dioxolen-4-il)metilo. Outros exemplos de grupos éster de pró-fármaco podem ser encontrados, por exemplo, em T. Higuchi e V. Stella, em "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14, A. C. S. Symposium Series, American Chemical Society (1975); e "Bioreversible Carriers in Drug Design; Theory of Application", editado por E. B. Roche, Pergamon Press, Nova Iorque, 14-21 (1987) (proporcionando exemplos de ésteres úteis como pró-fármacos para compostos contendo grupos carboxilo).

O termo "sal farmaceuticamente aceitável", especialmente quando se refere a um sal farmaceuticamente aceitável do composto de Fórmula (I) sintetizado pelos métodos aqui divulgados, 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. Exemplos preferidos de sais farmaceuticamente aceitáveis são os sais de metais alcalinos (sódio ou potássio), os sais de metais alcalino-terrosos (cálcio ou magnésio) ou sais de amónio derivados de amoniaco ou de aminas orgânicas farmaceuticamente aceitáveis, por exemplo, alquilaminaC<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>, ciclo-hexilamina, trietanolamina, etilenodiamina ou tris-(hidroximetil)-aminometano. Relativamente a compostos sintetizados pelo método que são aminas básicas, os exemplos preferidos de sais farmaceuticamente aceitáveis são sais de adição de ácido de ácidos inorgânicos ou orgânicos farmaceuticamente aceitáveis, por exemplo, ácidos de halogéneo, sulfúrico, fosfórico ou alifático ou ácido carboxílico aromático ou sulfónico, por exemplo, ácido acético, succínico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, nicotínico, metanossulfónico, p-toluenossulfónico ou naftalenossulfónico.

O termo "sal farmaceuticamente aceitável", como aqui utilizado, também se refere a quaisquer sais farmaceuticamente

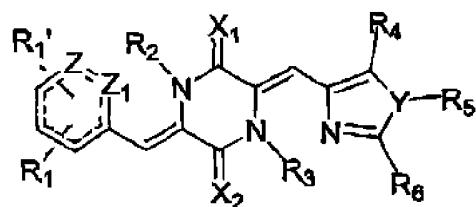
aceitáveis de um composto e, de um modo preferido, refere-se a um sal de adição de ácido de um composto. Exemplos preferidos de sais farmaceuticamente aceitáveis são os sais de metal alcalino (sódio ou potássio), os sais de metais alcalino-terrosos (cálcio ou magnésio) ou sais de amónio derivados do amoníaco ou de aminas orgânicas farmaceuticamente aceitáveis, por exemplo, alquilaminaC<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>, ciclo-hexilamina, trietanolamina, etilenodiamina ou tris-(hidroximetil)-aminometano. Em relação aos compostos que são aminas básicas, os exemplos preferidos de sais farmaceuticamente aceitáveis são sais de adição de ácido de ácidos inorgânicos ou orgânicos farmaceuticamente aceitáveis, por exemplo, ácidos de halogéneos, sulfúrico, fosfórico ou ácido alifático ou carboxílico aromático ou sulfónico, por exemplo, ácido acético, succínico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, nicotínico, metanossulfónico, p-toluenossulfónico ou ácido naftalenossulfónico.

As composições farmacêuticas preferidas, aqui divulgadas incluem sais farmaceuticamente aceitáveis e ésteres de pró-fármaco do composto de Fórmula (I) sintetizado pelo método aqui divulgado. Por conseguinte, se a produção de formulações farmacêuticas envolve a mistura íntima de excipientes farmacêuticos e do ingrediente activo na sua forma de sal, então é preferido utilizar excipientes farmacêuticos que não são básicos, ou seja, excipientes acídicos ou neutros.

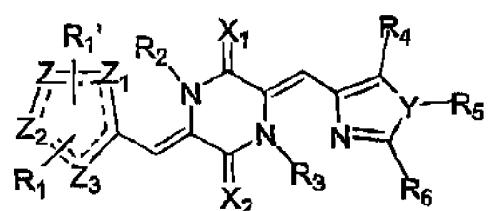
Em formas de realização preferidas dos métodos dos compostos aqui divulgados, pode ser formada uma pseudo-estrutura planar de três anéis, relativamente rígida. Para estabilizar tal pseudo-estrutura planar de três anéis, relativamente rígida, R<sub>3</sub> pode ser escolhido, de um modo preferido, como sendo hidrogénio.

Noutras formas de realização preferidas dos compostos e métodos aqui divulgados, n é igual a zero ou um, de um modo mais preferido um, e  $Z_2$ ,  $Z_3$  e  $Z_4$ , cada um separadamente seleccionados de um átomo de oxigénio, um átomo de azoto e um átomo de carbono, de um modo mais preferido, pelo menos, um dos  $Z_2$ ,  $Z_3$  e  $Z_4$  sendo um átomo de carbono e, de um modo mais preferido, pelo menos, dois dos  $Z_2$ ,  $Z_3$  e  $Z_4$  sendo um átomo de carbono. Todos os Z podem ser simultaneamente átomos de carbono.

Ainda outras formas de realização preferidas dos métodos e composições aqui divulgados envolvem compostos que têm as estruturas das Fórmulas (Ia) e (Ib), abaixo:



(1a)



(b)

em que os grupos variáveis são como definidos aqui.

O termo "átomo de halogéneo", como aqui utilizado, significa qualquer um dos átomos rádio-estáveis da coluna 7 da Tabela Periódica dos Elementos, *i. e.*, flúor, cloro, bromo ou iodo, sendo preferidos flúor e cloro.

O termo "alquilo", como aqui utilizado, significa qualquer hidrocarboneto saturado, ramificado ou não, substituído ou não, sendo preferidos hidrocarbonetos  $C_1-C_6$  não substituídos, não-ramificados, saturados, sendo muito preferidos metilo, etilo, isobutilo e terc-butilo. Entre os hidrocarbonetos saturados, substituídos, são preferidos os hidrocarbonetos  $C_1-C_6$  saturados mono- e di- e per-halogéneo substituídos e hidrocarbonetos amino-substituídos, sendo muito preferidos perflurometilo, perclorometilo, perfluoro-terc-butilo, percloro-terc-butilo. O termo "substituído" tem o seu significado comum, como encontrado em numerosas patentes contemporâneas da técnica relacionada. Ver, por exemplo, as patentes U.S. Nº 6583143; 6509331; 6506787; 6500825; 5922683; 5886210; 5874443; e 6350759. Especificamente, a definição de "substituído" é tão ampla quanto aquela proporcionada na patente U.S. Nº 6583143 que define o termo "substituído" como quaisquer grupos, tais como alquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterociclo e heterocicloalquilo em que, pelo menos, um átomo de hidrogénio é substituído com um substituinte. O termo "substituído" é também tão amplo quanto a definição proporcionada na patente U.S. Nº 6509331 que define o termo "alquilo substituído" de tal modo que se refere a um grupo alquilo, de um modo preferido, de 1 a 10 átomos de carbono, tendo de 1 a 5 substituintes, e de um modo preferido 1 a 3 substituintes, seleccionados do grupo consistindo em alcoxilo, alcoxilo substituído, cicloalquilo, cicloalquilo substituído, cicloalcenilo, cicloalcenilo substituído, acilo, acilamina, aciloxilo, amina, amina substituída, aminoacilo, aminoaciloxilo, oxiacilamina, ciano, halogéneo, hidroxilo, carboxilo, carboxilolquilo, ceto, tioqueto, tiol, tioalcoxilo, tioalcoxilo substituído, arilo, ariloxilo, heteroarilo, heteroariloxilo, heterocíclico,

heterociclo-oxilo, hidroxiamina, alcoxiamina, nitro, -SO-alquilo, -SO-alquilo substituído, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo substituído, -SO<sub>2</sub>-arilo e -SO<sub>2</sub>-heteroarilo. As outras patentes listadas acima também proporcionam definições convencionais para o termo "substituído" que são bem compreendidas pelos especialistas na técnica. O termo "cicloalquilo" refere-se a qualquer anel de hidrocarboneto não-aromático tendo, de um modo preferido, cinco a doze átomos compreendendo o anel. O termo "acilo" refere-se a grupos arilo ou alquilo derivados de um oxoácido, sendo preferido um grupo acetilo.

O termo "alcenilo", como aqui utilizado, significa qualquer hidrocarboneto insaturado ramificado ou não ramificado, substituído ou não substituído, incluindo hidrocarbonetos poli-insaturados, sendo preferido hidrocarboneto com C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> não-ramificado, não substituído, mono-instaurado e diinsaturado e, sendo mais preferido hidrocarboneto di-halogeno-substituído, mono-instaurado. Nas posições R<sub>1</sub> e R<sub>4</sub>, do composto de estrutura (I) é particularmente preferida uma molécula de z-isoprenilo. O termo "cicloalcenilo" refere-se a qualquer anel de hidrocarboneto não-aromático, de um modo preferido, tendo cinco a doze átomos compreendendo o anel.

Os termos "arilo", "arilo substituído", "heteroarilo" e "heteroarilo substituído", como aqui utilizados, referem-se a anéis de hidrocarbonetos aromáticos, de um modo preferido tendo cinco, seis ou sete átomos e, de um modo mais preferido, tendo seis átomos compreendendo o anel. "Heteroarilo" e "heteroarilo substituído" referem-se a anéis de hidrocarbonetos aromáticos nos quais, pelo menos, um heteroátomo, e. g., um átomo de

oxigénio, enxofre ou azoto, está no anel com, pelo menos, um átomo de carbono.

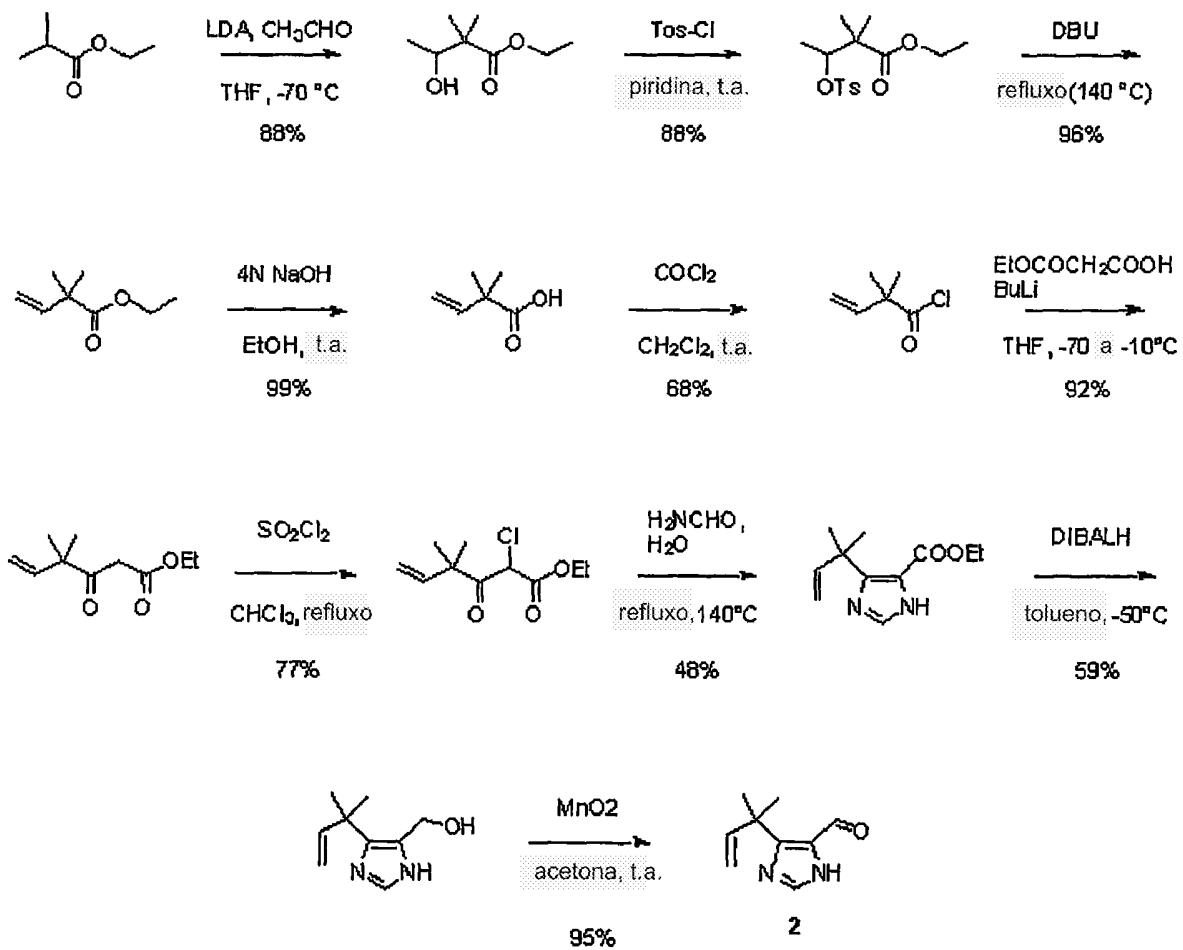
O termo "alcoxilo" refere-se a um éter saturado ou insaturado, ramificado ou não ramificado, substituído ou não substituído, sendo preferido éter com C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> não-ramificado, saturado, não substituído, sendo preferido metoxilo e também sendo preferidos éteres de dimetilo, dietilo, metil-isobutilo, e metil-terc-butilo. O termo "cicloalcoxilo" refere-se a qualquer anel de hidrocarboneto não-aromático tendo, de um modo preferido, cinco a doze átomos compreendendo o anel.

Os termos "purificado", "substancialmente purificado" e "isolado", como aqui utilizados, referem-se ao composto estando livre de outros compostos não semelhantes, com os quais o composto está normalmente associado no seu estado natural, de modo que o composto da invenção compreenda, 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 determinada amostra.

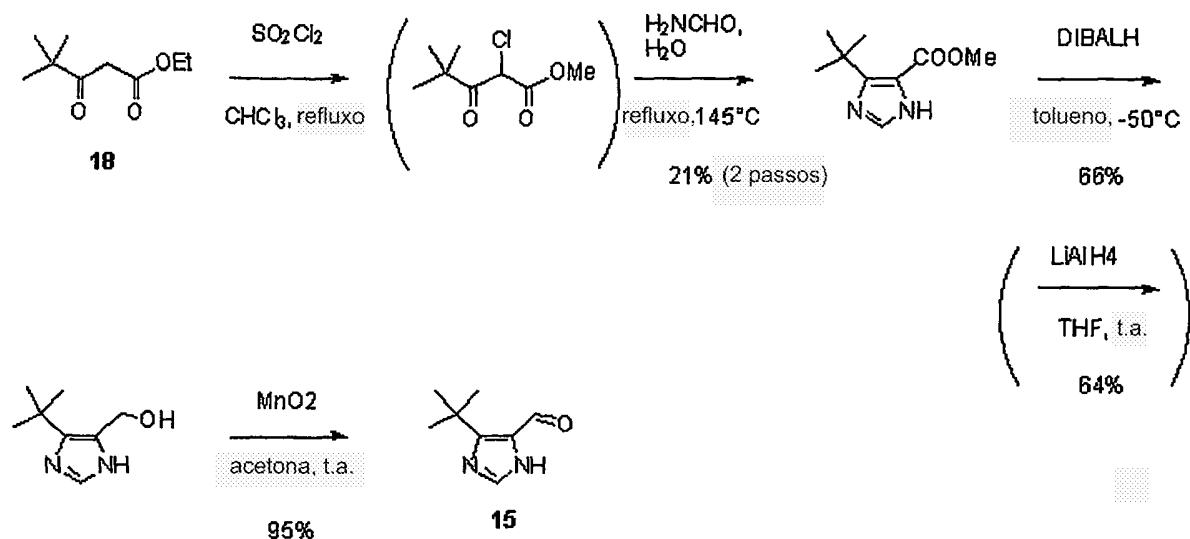
O composto de Fórmula (I) pode ser sintetizado quimicamente ou pode ser produzido a partir de reagentes conhecidos e disponíveis na técnica. Por exemplo, foram descritas modificações de diacildicetopiperazina (diacetildicetopiperazina), por exemplo, por Loughlin *et al.*, 2000 Bioorg. Med. Chem. Lett. 10:91 ou por Brocchini *et al.* no documento WO 95/21832. A diacildicetopiperazina (diacetildicetopiperazina) pode ser preparada, por exemplo, por diacetilação de 2,5-piperazinediona de baixo custo (catálogo TCI, N° G0100, 25 g) com acetato de sódio e anidrido de sódio. A estrutura diacetilo da dicetopiperazina activada pode ser

substituída com outros grupos acilo, para incluir carbamatos como Boc (t-butoxicarbonilo), Z (benzoiloxicarbonilo).

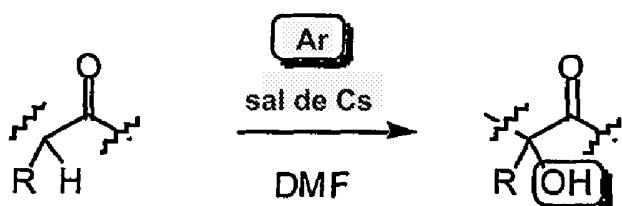
O imidazolecarboxaldeído pode ser preparado, por exemplo, de acordo com o processo divulgado em Hayashi *et al.*, 2000 J. Organic Chem. 65:8402 como descrito abaixo:



Outro exemplo de um derivado de imidazolecarboxaldeído é um derivado **15** imidazole-4-carboxaldeído que pode ser produzido, por exemplo, de um beta-cetoéster **18** (catálogo TCI, N° P1031, 25 mL) comercialmente disponível, pela seguinte via:



O método sintético aqui divulgado pode ser realizado, de um modo preferido, na presença de carbonato de césio como uma base em DMF e numa atmosfera desoxigenada. A atmosfera inerte evita a oxidação provável de átomos activados de  $\alpha$ -carbono do anel de dicetopiperazina durante o tratamento com carbonato de césio (ver abaixo) como descrito, por exemplo, por Watanabe *et al.*, 18th International Congress of Heterocyclic Chemistry, em Yokohama, Japão (30 de Julho de 2001), Resumo, página 225.



Oxidação ao Ar de Compostos de Carbonilo Activados com Sais de Césios

Outras formas de realização do método sintético envolvem modificações aos compostos utilizados ou, caso contrário, envolvidos na síntese de compostos representados pela

Fórmula (I). Esses derivados podem incluir modificações no anel de fenilo, introdução de outros sistemas de anel aromático, posição do anel aromático, alterações para o sistema de anel de imidazole e/ou modificações adicionais para a posição 5 no anel de imidazole. Exemplos de tais modificações são discutidos, por exemplo, no Exemplo 4. O resultado dessa modificações inclui um conteúdo de azoto aumentado do anel de fenilo e/ou o composto que pode aumentar a solubilidade do composto. Outras modificações podem incorporar derivados conhecidos de inibidores de tubulina, mimetizando assim a actividade dos inibidores de tubulina. Outras modificações podem simplificar a síntese do  $\beta$ -cetoéster envolvido na produção do imidazolecarboxaldeído utilizado nos métodos aqui divulgados.

#### Composições Farmacêuticas

A presente invenção também engloba os compostos aqui divulgados, opcionalmente e, de um modo preferido, produzidos pelos métodos aqui divulgados, em composições farmacêuticas compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável preparado para armazenamento e subsequente administração, que têm uma quantidade farmaceuticamente eficaz dos produtos acima divulgados num diluente ou veículo farmaceuticamente aceitável. Os veículos ou diluentes aceitáveis para utilização terapêutica são bem conhecidos na técnica farmacêutica e, são descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro, edit. 1985). Podem ser proporcionados conservantes, estabilizadores, corantes e mesmo agentes aromatizantes na composição farmacêutica. Por exemplo, podem ser adicionados como conservantes benzoato de sódio, ácido ascórbico

e ésteres de ácido p-hidroxibenzóico. Além disso, podem ser utilizados antioxidantes e agentes de suspensão.

As composições de desidrofenila-histina ou análogos da desidrofenila-histina podem ser formuladas e utilizadas como comprimidos, cápsulas ou elixires para administração oral; supositórios para administração rectal; soluções estéreis, suspensões para administração injectável; pensos para administração transdérmica, e depósitos subdérmicos e semelhantes. Os injectáveis podem ser preparados em formas convencionais, como soluções líquidas ou suspensões, formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injecção ou infusão, ou como emulsões. Os excipientes adequados são, por exemplo, água, soro fisiológico, dextrose, manitol, lactose, lecitina, albumina, glutamato de sódio, cloridrato de cisteína, albumina de soro humano e semelhantes. Adicionalmente, se desejado, as composições farmacêuticas injectáveis podem conter pequenas quantidades de substâncias auxiliares não tóxicas, tais como agentes de humidificação, agentes tamponantes de pH e semelhantes. Se desejado, podem ser utilizadas preparações aumentadoras de absorção (por exemplo, lipossomas).

As formulações farmacêuticas para administração parentérica incluem soluções aquosas dos compostos activos em forma solúvel em água. Adicionalmente, podem ser preparadas suspensões dos compostos activos como suspensões oleosas para injecção apropriadas. Os solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos gordos, tal como óleo de sésamo, ou outros óleos orgânicos, tais como óleos de soja, toranja ou amêndoas, ou ésteres sintéticos de ácido gordo, tais como oleato de etilo ou triglicéridos ou lipossomas. As suspensões de injecção aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da

suspensão, tais como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol ou dextrano. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizadores adequados ou agentes que aumentam a solubilidade dos compostos para permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

As preparações farmacêuticas para utilização oral podem ser obtidas por combinação dos compostos activos com um excipiente sólido, opcionalmente tritando uma mistura resultante, e processando a mistura de grânulos, depois de adicionar auxiliares adequados, se desejado, para obter comprimidos ou núcleos de drageias. Os excipientes adequados são, em particular, agentes de enchimento 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, hidroxipropilmetylcelulose, carboximetilcelulose de sódio e/ou polivinilpirrolidona (PVP). Se desejado, podem ser adicionados agentes de desintegração, tais como polivinilpirrolidona reticulada, agar ou ácido algínico ou um seu sal tal como alginato de sódio. Os núcleos de drageias são proporcionados com revestimentos adequados. Para este objectivo, podem ser utilizadas soluções concentradas de açúcar, que podem conter opcionalmente goma-arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenoglicol e/ou dióxido de titânio, soluções de laca e solventes orgânicos adequados ou misturas de solventes. Podem ser adicionados corantes ou pigmentos ao revestimento dos comprimidos ou drageias para identificação ou para caracterizar diferentes combinações de doses de composto activo. Para este objectivo, podem ser utilizadas soluções concentradas de açúcar, que podem conter opcionalmente goma-arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol,

polietilenoglicol e/ou dióxido de titânio, soluções de laca, e solventes orgânicos adequados ou misturas de solventes. Essas formulações podem ser preparadas 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 lipofílicos); 5576012 (Agentes poliméricos solubilizantes); 5707615 (Formulações antivirais); 5683676 (Medicamentos particulados); 5654286 (Formulações tópicas); 5688529 (Suspensões orais); 5445829 (Formulações de liberação prolongada); 5653987 (Formulações líquidas); 5641515 (Formulações de liberação controlada) e 5601845 (Formulações esferóides).

São aqui, ainda, divulgadas várias composições farmacêuticas bem conhecidas na técnica farmacêutica para utilizações que incluem distribuição intraocular, intranasal e intra-auricular. As formulações farmacêuticas incluem soluções oftálmicas aquosas dos compostos activos em forma solúvel em água, como colírios, ou em goma de gelano (Shedden *et al.*, 2001 *Clin. Ther.* 23(3):440-50) ou hidrogéis (Maier *et al.*, 1996 *Ophthalmologica* 210:101-3); ungüentos oftálmicos; suspensões oftálmicas, tais como microparticulados, pequenas partículas poliméricas contendo fármaco que são suspensas num meio veículo líquido (Joshi, A., 1994 *J. Ocul. Pharmacol.* 10:29-45), formulações solúveis em lípido (Alm *et al.*, 1989 *Prog. Clin. Biol. Res.* 312:447-58), e microesferas (Mordenti, 1999 *Toxicol. Sci.* 52:101-6); e insertos oftálmicos. Essas formulações farmacêuticas adequadas são muito frequentemente e, de um modo preferido, formuladas para serem estéreis, isotónicas e tamponadas para maior estabilidade e conforto. As composições farmacêuticas também podem incluir gotas e pulverizadores frequentemente preparadas para estimular,

em muitos aspectos, secreções nasais para assegurar manutenção da acção ciliar normal. Como divulgado em Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing, 18<sup>a</sup> Edição) e bem conhecido dos especialistas na técnica, as formulações adequadas são muito frequentemente e, de um modo preferido, isotónicas, ligeiramente tamponadas para manter um pH de 5,5 a 6,5, e muito frequentemente e, de um modo preferido, incluem conservantes antimicrobianos e estabilizadores de fármaco apropriados. As formulações farmacêuticas para libertação intra-auricular incluem suspensões e unguedos para aplicação tópica no ouvido. Os solventes comuns para essas formulações auriculares incluem glicerina e água.

Quando utilizado como um inibidor de ciclo celular, um inibidor de crescimento tumoral ou um composto inibidor de crescimento fúngico, o composto de Fórmula (I) pode ser administrado por vias orais ou não orais. Quando administrado oralmente, pode ser administrado em cápsula, comprimido, granulado, pulverizador, xarope ou outras formas relacionadas. Quando administrado não oralmente, pode ser administrado como uma suspensão aquosa, uma preparação oleosa ou equivalente, ou como gotas, supositório, bálsamo, unguento ou semelhantes, quando administrado por injecção ou infusão, subcutaneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente ou formas semelhantes. Do mesmo modo, pode ser administrado topicamente, rectalmente ou vaginalmente, como considerado apropriado pelos especialistas na técnica para colocar o composto em contacto óptimo com um tumor, inibindo assim o crescimento tumoral. Está também contemplada a administração local no sítio do tumor, antes ou depois da ressecção do tumor, assim como formulações de libertação controlada, formulações de depósito e distribuição por bomba de infusão.

## Métodos de Administração

A presente invenção também abrange métodos para preparar e para administrar os compostos químicos divulgados e as composições farmacêuticas divulgadas. Esses métodos divulgados incluem, entre outros, (a) administração por vias orais, cuja administração inclui a administração em cápsula, comprimido, granulado, pulverizador, xarope, ou outras dessas formas; (b) administração por vias não orais, cuja administração inclui a administração como uma suspensão aquosa, uma preparação oleosa ou semelhante, ou como gotas, supositório, bálsamo, unguento ou semelhantes; administração por injecção ou infusão, subcutaneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente, intradermicamente ou semelhantes; assim como (c) administração tópica, (d) administração rectal, ou (e) administração vaginal, como considerado apropriado pelos especialistas na técnica para colocar o composto em contacto óptimo com o tecido vivo; e (f) administração através de formulações de libertação controlada, formulações de depósito e distribuição por bomba de infusão. Como exemplos adicionais desses modos de administração e como divulgação adicional de modos de administração, são aqui divulgados vários métodos para administração dos compostos químicos e composições farmacêuticas divulgadas incluindo modos de administração através de vias intraoculares, intranasais e intra-auriculares.

A quantidade farmaceuticamente eficaz da composição de desidrofenila-histina ou análogo da desidrofenila-histina requerida como uma dose, irá depender da via de administração, do tipo de animal, incluindo humano, a ser tratado, e das características físicas do animal específico em consideração. A dose pode ser adaptada para alcançar um efeito desejado, mas irá

depender de factores como peso, dieta, medicação simultânea e outros factores que os especialistas nas técnicas médicas irão reconhecer.

Na aplicação dos métodos, os produtos ou composições podem ser utilizados isolados ou em combinação uns com os outros, ou em combinação com outros agentes terapêuticos ou de diagnóstico. Por exemplo, como aqui divulgado, os compostos aqui divulgados são eficazes no tratamento do cancro quando utilizados em combinação com outros compostos activos, especificamente outros quimioterapêuticos, por exemplo, produtos biológicos e os quimioterapéticos específicos CPT-11, Taxotene (docataxel) e pacitaxel. Os compostos aqui divulgados também são eficazes no tratamento do cancro quando utilizados em combinação com outros compostos activos, incluindo agentes antivasculares, agentes antiangiogénicos, como Erbuitux (Imclone/bristol-Myers) e Iressa (AstraZeneca), outros inibidores de VEGF e produtos biológicos, mais especificamente, pelo menos, um anticorpo anti-VEGF, especialmente anticorpos monoclonais para o receptor de VEGF, incluindo DC101, um anticorpo monoclonal de rato que bloqueia o receptor 2 de VEGF (flk-1) de murganho. Essas combinações podem ser utilizadas *in vivo*, habitualmente num mamífero, de um modo preferido num humano ou *in vitro*. Utilizando-os *in vivo*, os compostos divulgados, isoladamente ou em combinação com outros quimioterapêuticos ou outros produtos biológicos, podem ser administrados ao mamífero numa variedade de modos, incluindo parentericamente, intravenosamente, por infusão ou injecção, subcutaneamente, intramuscularmente, pelo cólon, rectalmente, vaginalmente, nasalmente ou intraperitonealmente, utilizando uma variedade de formas de dosagem. Esses métodos também podem ser aplicados para testar a actividade química *in vivo*.

Como será prontamente evidente para os especialistas na técnica, a dosagem útil *in vivo* para ser administrada e o modo particular de administração irá variar dependendo da idade, peso e espécie de mamífero tratada, dos compostos particulares utilizados e da utilização específica para a qual estes compostos são utilizados. A determinação dos níveis de dosagem eficaz, isto é, os níveis de dosagem necessários para alcançar o resultado desejado, pode ser realizada por um especialista na técnica utilizando métodos farmacológicos de rotina. Tipicamente, as aplicações clínicas humanas de produtos são iniciadas a níveis de dosagem mais baixos, sendo o nível de dosagem aumentado até que seja alcançado o efeito desejado. Alternativamente, podem ser utilizados estudos *in vitro* aceitáveis para estabelecer doses úteis e vias de administração das composições identificadas pelos presentes métodos utilizando métodos farmacológicos estabelecidos.

Em estudos de animais não humanos, as aplicações de potenciais produtos são iniciadas a níveis de dosagem mais elevados, sendo a dosagem diminuída até que o efeito desejado já não seja mais alcançado ou que os efeitos colaterais adversos desapareçam. A dosagem pode variar amplamente, dependendo dos efeitos desejados e da indicação terapêutica. Tipicamente, as dosagens podem estar entre, aproximadamente, 10 microgramas/kg e 100 mg/kg do peso corporal, de um modo preferido entre cerca de 100 microgramas/kg e 10 mg/kg do peso corporal. Alternativamente, as dosagens podem ser baseadas e calculadas por área de superfície do doente, como entendido pelos especialistas na técnica. A administração pode ser oral a cada três dias, dia sim dia não, diariamente, duas vezes ao dia ou três vezes ao dia.

A formulação exacta, via de administração e dosagem pode ser escolhida pelo médico individual considerando o estado do doente. Ver, por exemplo, Fingl *et al.*, em *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1975. Deve ser notado que o médico assistente deve saber como e quando terminar, interromper ou ajustar a administração devido à toxicidade ou a disfunções dos órgãos. Reciprocamente, o médico assistente também sabe ajustar o tratamento a níveis mais altos se a resposta clínica não for adequada (evitando a toxicidade). A magnitude de uma dose administrada na gestão do distúrbio de interesse irá variar com a gravidade do estado a ser tratado e com a via de administração. A gravidade do estado pode, por exemplo, ser avaliada, em parte, através de métodos convencionais de avaliação de prognóstico. Além disso, a dose e talvez a frequência da dose, irão variar também de acordo com a idade, peso corporal e resposta de cada doente individual. Um programa comparável àquele acima discutido pode ser utilizado em medicina veterinária.

Dependendo das condições específicas a ser tratadas, esses agentes podem ser formulados e administrados sistematicamente ou localmente. Podem ser encontradas uma variedade de técnicas para formulação e administração em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18<sup>a</sup> Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990). As vias de administração adequadas podem incluir a administração oral, rectal, transdérmica, vaginal, transmucosal ou intestinal; distribuição parentérica, incluindo intramuscular, subcutânea, injecções intramedulares, assim como injecções intratecais, intraventriculares directas, intravenosas, via infusão, intraperitoneais, intranasais ou intra-oculares.

Para injecção ou infusão, os agentes podem ser formulados em soluções aquosas, por exemplo, em tampões fisiologicamente compatíveis, tais como solução de Hanks, solução de Ringer ou tampão fisiológico salino. Para tal administração transmucosal, são utilizados na formulação, penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada. Esses penetrantes são geralmente conhecidos na técnica. A utilização de veículos farmaceuticamente aceitáveis para formular os compostos aqui divulgados para a prática da invenção em dosagens adequadas para administração sistémica está dentro do âmbito da invenção. Com a escolha apropriada do veículo e da prática de produção adequada, as composições aqui divulgadas, em particular, aquelas formuladas como soluções, podem ser administradas parentericamente, tais como por injecção intravenosa ou infusão. Os compostos podem ser prontamente formulados utilizando veículos farmaceuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica em dosagens adequadas para administração oral. Esses veículos permitem aos compostos ser formulados como comprimidos, pílulas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas, suspensões e semelhantes, para ingestão oral por um doente a ser tratado.

Os agentes pretendidos para ser administrados intracelularmente podem ser administrados utilizando técnicas bem conhecidas dos especialistas na técnica. Por exemplo, tais agentes podem ser encapsulados em lipossomas, depois administrados como descrito acima. Todas as moléculas presentes numa solução aquosa no momento da formação dos lipossomas são incorporadas no interior aquoso. Os conteúdos lipossomais são ambos protegidos do micro-ambiente externo e, porque os liposomas se fundem com as membranas celulares, são eficazmente libertados no citoplasma celular. Adicionalmente, devido à sua

hidrofobicidade, pequenas moléculas orgânicas podem ser directamente administradas intracelularmente.

A determinação das quantidades eficazes está bem no âmbito dos especialistas na técnica, especialmente à luz da divulgação detalhada aqui proporcionada. Além dos ingredientes activos, estas composições farmacêuticas podem conter veículos farmaceuticamente aceitáveis adequados, compreendendo excipientes e auxiliares que facilitam o processamento dos compostos activos em preparações que podem ser utilizadas farmaceuticamente. As preparações formuladas para administração oral podem estar na forma de comprimidos, drageias, cápsulas ou soluções. As composições farmacêuticas podem ser produzidas de um modo que seja conhecido, por exemplo, por meio de processos convencionais de mistura, dissolução, granulação, produção de drageias, suspensão, emulsificação, encapsulamento, captura ou liofilização.

Os compostos aqui divulgados podem ser avaliados quanto à eficácia e toxicidade utilizando métodos conhecidos. Por exemplo, a toxicologia de um composto particular, ou de um subconjunto de compostos, partilhando certas unidades químicas, pode ser estabelecida por determinação da toxicidade *in vitro* para uma linha celular, tal como de mamífero e, de um modo preferido, uma linha celular humana. Os resultados desses estudos são frequentemente previsíveis da toxicidade em animais, tais como mamíferos ou, mais especificamente, humanos. Alternativamente, a toxicidade de compostos particulares num modelo animal, tais como murganhos, ratos, coelhos ou macacos, pode ser determinada utilizando métodos conhecidos. A eficácia de um composto particular pode ser estabelecida utilizando vários métodos reconhecidos na técnica, tais como métodos

*in vitro*, modelos animais ou ensaios clínicos em humanos. Os modelos *in vitro* reconhecidos na técnica existem para quase qualquer classe de estado, incluindo os estados acalmados pelos compostos aqui divulgados, incluindo cancro, doença cardiovascular e diversas infecções fúngicas. Do mesmo modo, podem ser utilizados modelos animais aceitáveis para estabelecer a eficácia de químicos para tratar esses estados. Ao seleccionar um modelo para determinar a eficácia, o especialista na técnica pode ser orientado pelo estado da técnica para escolher um modelo apropriado, dose e via de administração e regime. É claro que também podem ser utilizados ensaios clínicos em humanos para determinar a eficácia de um composto em humanos.

Quando utilizado como um agente anticanerígeno, ou um composto inibidor do crescimento tumoral, os compostos aqui divulgados podem ser administrados por vias orais ou não orais. Quando administrados oralmente, podem ser administrados em cápsula, comprimido, granulado, pulverizador, xarope ou outra dessas formas. Quando administrados não oralmente, podem ser administrados como uma suspensão aquosa, uma preparação oleosa ou semelhante, ou como gotas, supositório, bálsamo, unguento ou semelhante, quando administrados por injeção ou infusão, subcutaneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente, intradermicamente ou semelhantes. Do mesmo modo, podem ser administrados topicamente, rectalmente ou vaginalmente, como for considerado apropriado pelos especialistas na técnica de modo a colocar o composto em contacto óptimo com um tumor, inibindo assim o crescimento do tumor. Está também contemplada a administração local no sítio do tumor, antes ou depois da ressecção do tumor ou como parte de um tratamento reconhecido na técnica do estado de doença. Estão

igualmente contempladas formulações de libertação controlada, formulações de depósito e distribuição por bomba de infusão.

Quando utilizado como agente anticancerígeno ou como um agente antitumoral, pode ser administrado oralmente ou não oralmente a um doente humano na quantidade de cerca de 0,0007 mg/dia até cerca de 7000 mg/dia do ingrediente activo e, de um modo mais preferido, cerca de 0,07 mg/dia até cerca de 70 mg/dia do ingrediente activo, de um modo preferido, uma vez por dia ou, de um modo menos preferido, mais de duas e até dez vezes por dia. Alternativamente e também de um modo preferido, o composto pode, de um modo preferido, ser administrado continuamente nas referidas quantidades através, por exemplo, de uma infusão intravenosa. Assim, para um doente pesando 70 quilogramas, a dose diária preferida do ingrediente activo antitumoral seria de 0,0007 mg/kg/dia até cerca de 35 mg/kg/dia incluindo 1,0 mg/kg/dia e 0,5 mg/kg/dia e, de um modo mais preferido, de 0,007 mg/kg/dia até 0,05 mg/kg/dia, incluindo 0,035 mg/kg/dia. No entanto, como será entendido pelos especialistas na técnica, em determinadas situações pode ser necessário administrar o composto antitumoral em quantidades que excedem, ou excedem muito, a gama de dosagem preferida para tratar eficazmente e agressivamente tumores particularmente avançados ou letais.

Quando utilizada como um agente antifúngico, a quantidade eficaz preferida da desidrofenila-histina ou seu análogo no tratamento ou prevenção de um patogénio fúngico particular irá depender em parte das características do fungo e da extensão da infecção e, pode ser determinada através de técnicas clínicas convencionais. Os ensaios *in vitro* ou *in vivo* podem ser opcionalmente utilizados para ajudar a identificar gamas de

dosagem óptimas. As doses eficazes podem ser extrapoladas de curvas de resposta à dose derivadas de análise *in vitro* ou, de um modo preferido, de modelos animais. O nível preciso de dosagem deve ser determinado pelo médico assistente ou outro prestador de cuidados médicos e irá depender de factores bem conhecidos, incluindo via de administração e a idade, peso corporal, sexo e saúde geral do indivíduo; a natureza, gravidade e fase clínica da infecção; e da utilização (ou não) de terapias simultâneas.

A dose eficaz da desidrofenila-histina ou seu análogo estará tipicamente na gama de cerca de 0,01 até cerca de 50 mg/kg, de um modo preferido de 0,1 até cerca de 10 mg/kg de peso corporal do mamífero por dia, administrado em doses únicas ou múltiplas. Geralmente, o composto pode ser administrado a doentes com necessidade desse tratamento numa gama de dose diária de cerca de 1 até cerca de 2000 mg por doente.

Para formular a dosagem incluindo os compostos aqui divulgados como um composto inibidor de crescimento tumoral, podem ser utilizados agentes tensioactivos, excipientes, agentes amaciadores, agentes de suspensão conhecidos e substâncias formadoras de filme e auxiliares de revestimento farmaceuticamente aceitáveis e semelhantes. De um modo preferido, podem ser utilizados como agentes tensioactivos álcoois, ésteres, álcoois alifáticos sulfatados e semelhantes; podem ser utilizados como excipientes sacarose, glicose, lactose, amido, celulose cristalizada, manitol, silicato anidro leve, aluminato de magnésio, metassilicatoaluminato de magnésio, silicato de alumínio sintético, carbonato de cálcio, carbonato de ácido de sódio, hidrogenofosfato de cálcio, carboximetilcelulose de cálcio e semelhantes; podem ser

utilizados como agentes amaciadores estearato de magnésio, talco, óleo endurecido e semelhantes; podem ser utilizados como agentes de suspensão ou lubrificantes óleo de coco, azeite, óleo de sésamo, óleo de amendoim, soja; podem ser utilizados como agentes de suspensão acetoftalato de celulose como um derivado de um carboidrato, tais como celulose ou açúcar, ou copolímero de metilacetato-metacrilato como um derivado de polivinilo; e podem ser utilizados como agentes de suspensão, agentes de plasticidade tais como ftalatos de éster e semelhantes. Além dos ingredientes preferidos anteriores, podem ser adicionados edulcorantes, fragrâncias, corantes, conservantes e semelhantes, à formulação administrada do composto, particularmente quando o composto é para ser administrado oralmente.

As composições aqui divulgadas em composições farmacêuticas também podem compreender um veículo farmaceuticamente aceitável. Essas composições podem ser preparadas para armazenamento e para subsequente administração. Os veículos ou diluentes aceitáveis para utilização terapêutica são bem conhecidos na técnica farmacêutica e são descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (edição de A. R. Gennaro 1985). Por exemplo, essas 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 em formas convencionais, como soluções líquidas ou suspensões, formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injecção ou infusão, 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 e semelhantes. Além disso, se desejado,

as composições farmacêuticas injectáveis podem conter pequenas quantidades de substâncias auxiliares não tóxicas, tais como agentes humidificadores, agentes de tamponamento de pH e semelhantes. Se desejado, podem ser utilizadas preparações aumentadoras de absorção (por exemplo, lipossomas).

A quantidade farmaceuticamente eficaz da composição requerida como uma dose irá depender da via de administração, do tipo de animal a ser tratado e das características físicas do animal específico sob consideração. A dose pode ser adaptada para alcançar um efeito desejado, mas irá depender de factores como o peso, dieta, medicação simultânea e outros factores que os especialistas nas técnicas médicas irão reconhecer.

Os produtos ou composições, como acima descritos, podem ser utilizados isolados ou em combinação uns com os outros, ou em combinação com outros agentes terapêuticos ou de diagnóstico. Especificamente, os produtos dos compostos divulgados podem ser utilizados isolados ou em combinação com outros quimioterapêuticos ou produtos biológicos, incluindo anticorpos, para o tratamento do cancro, ou em combinação com outro produto anti-infeccioso para o tratamento de infecções fúngicas. Estes produtos ou composição podem ser utilizados *in vivo* ou *in vitro*. As dosagens úteis e os modos de administração mais úteis irão variar dependendo da idade, peso e animal tratado, dos compostos particulares utilizados e da utilização específica para a qual estes compostos são utilizados. A magnitude de uma dose na gestão ou tratamento de um distúrbio particular irá variar com a gravidade do estado a ser tratado e da via de administração, e dependendo dos estados de doença e da sua gravidade, as composições podem ser formuladas e administradas sistemicamente ou localmente. Uma variedade de técnicas para formulação e

administração pode ser encontrada em Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990).

Para formular os compostos de Fórmula (I) produzidos, de um modo preferido, sinteticamente de acordo com os métodos aqui divulgados, como um inibidor de ciclo celular, um inibidor de crescimento tumoral ou um composto antifúngico, podem ser utilizados agentes tensioactivos, excipientes, agentes amaciadores, agentes de suspensão conhecidos e substâncias formadoras de filme e assistentes de revestimento farmaceuticamente aceitáveis e semelhantes. De um modo preferido, podem ser utilizados como agentes tensioactivos álcoois, ésteres, álcoois alifáticos sulfatados e semelhantes; podem ser utilizados como excipientes sacarose, glicose, lactose, amido, celulose cristalizada, manitol, silicato anidro leve, aluminato de magnésio, metassilicatoaluminato de magnésio, silicato de alumínio sintético, carbonato de cálcio, carbonato de ácido de sódio, hidrogenofosfato de cálcio, carboximetilcelulose de cálcio e semelhantes; podem ser utilizados como agentes amaciadores estearato de magnésio, talco, óleo endurecido e semelhantes; podem ser utilizados como agentes de suspensão ou lubrificantes óleo de coco, azeite, óleo de sésamo, óleo de amendoim, soja; podem ser utilizados como agentes de suspensão acetoftalato de celulose como um derivado de um carboidrato, tais como celulose ou açúcar, ou copolímero de metilacetato-metacrilato como um derivado de polivinilo; e podem ser utilizados como agentes de suspensão, agentes de plasticidade tais como ftalatos de éster e semelhantes. Além dos ingredientes preferidos anteriores, podem ser adicionados edulcorantes, fragrâncias, corantes, conservantes, e semelhantes, à formulação administrada do composto,

particularmente quando o composto é para ser administrado oralmente.

Os inibidores de ciclo celular, os agentes antitumoriais e os agentes antifúngicos que podem ser produzidos pelo método, podem ser administrados oralmente ou não a um doente humano na quantidade de cerca de 0,001 mg/kg/dia até cerca de 10.000 mg/kg/dia do ingrediente activo e, de um modo mais preferido, cerca de 0,1 mg/kg/dia até 100 mg/kg/dia do ingrediente activo, de um modo preferido, uma vez a cada três dias numa base cíclica, dia sim dia não, uma vez por dia, duas vezes por dia ou, de um modo menos preferido, mais de duas até dez vezes por dia. Alternativamente e também de um modo preferido, o composto produzido pelo método pode ser, de um modo preferido, administrado continuamente nas quantidades referidas através, por exemplo, de infusão intravenosa. Assim, para o exemplo de um doente pesando 70 quilogramas, a dose diária preferida do ingrediente activo antitumoral seria de cerca de 0,07 mg/dia até 700 gramas/dia e, de um modo mais preferido, de 7 mg/dia até cerca de 7 gramas/dia. No entanto, como será entendido pelos especialistas na técnica, em determinadas situações pode ser necessário administrar o composto antitumoral produzido pelo método em quantidades que excedem, ou excedem muito, a gama de dosagem preferida para tratar eficazmente e agressivamente tumores particularmente avançados ou letais.

No caso de utilização do inibidor de ciclo celular produzido pelos métodos, como um reagente de teste bioquímico, o composto produzido pelos métodos da invenção inibe a progressão do ciclo celular quando está dissolvido num solvente orgânico ou num solvente orgânico aquoso e é aplicado directamente a qualquer um de diversos sistemas de células em cultura. Os solventes

orgânicos utilizáveis incluem, por exemplo, metanol, metilsulfóxido e semelhantes. A formulação pode ser, por exemplo, um pó, granulado ou um outro inibidor sólido, ou um inibidor líquido preparado utilizando um solvente orgânico ou um solvente orgânico aquoso. Embora uma concentração preferida do composto produzido pelo método da invenção para utilização como um inibidor de ciclo celular esteja geralmente na gama de cerca de 1 a cerca de 100 µg/mL, a quantidade de utilização mais apropriada varia dependendo do tipo de sistema de células em cultura e do objectivo de utilização, como será entendido pelos especialistas na técnica. Além disso, em determinadas aplicações pode ser necessário ou pode ser preferido por especialistas na técnica a utilização de uma quantidade fora da gama mencionada.

De uma perspectiva farmacêutica, determinadas formas de realização proporcionam métodos para prevenir ou tratar infecções fúngicas e/ou um fungo patogénico num indivíduo, envolvendo a administração ao indivíduo de uma composição incluindo uma desidrofenila-histina ou seu análogo, por exemplo, administrando a desidrofenila-histina ou seu análogo numa quantidade e modo que proporcione o efeito antifúngico pretendido.

Outras formas de realização incluem o tratamento ou prevenção de infecção num doente por um fungo patogénico, tais como aqueles listados acima ou referidos abaixo.

Outra forma de realização refere-se ao tratamento ou prevenção de infecção num doente por um fungo patogénico que é resistente a um ou mais outros agentes antifúngicos, especialmente um agente diferente da desidrofenila-histina ou seu análogo, incluindo, e. g., anfotericina B ou os seus

análogos ou derivados (incluindo éster metílico de 14(s)-hidroxi-anfotericina B, a hidrazida de anfotericina B com 1-amino-4-metilpiperazina, e outros derivados) ou outros antibióticos macrólidos poliénicos, incluindo, e. g., nistatina, candicidina, pimaricina e natamicina; flucitosina; griseofulvina; equinocandinas ou aureobasidinas, incluindo análogos de ocorrência natural e semi-sintéticos; desidrobenzo[a]naftacenoquinonas; antifúngicos peptído-nucleósidos incluindo as polioxinas e nicomicinas; alilaminas como naftifina e outros inibidores da esqualeno epoxidase; e azoles, imidazoles e triazoles, tais como, e. g., clotrimazole, miconazole, cetoconazole, econazole, butoconazole, oxiconazole, terconazole, itraconazole ou fluconazole e semelhantes. Para agentes antifúngicos convencionais adicionais e novos agentes em desenvolvimento, ver e. g., Turner e Rodriguez, 1996 Current Pharmaceutical Design, 2:209-224. Outra forma de realização envolve o tratamento ou prevenção de infecção num doente por um fungo patogénico, nos casos em que o doente é alérgico ou intolerante ou que não responde a um ou mais agentes antifúngicos ou no qual é contra-indicada a utilização de outros agentes antifúngicos. Esses outros agentes antifúngicos incluem, entre outros, aqueles agentes antifúngicos aqui divulgados acima e noutras partes.

Nos métodos anteriores para tratamento ou prevenção, uma desidrofenila-histina ou o seu análogo é administrada ao indivíduo numa quantidade eficazmente antifúngica.

Outras formas de realização referem-se ao tratamento ou prevenção de infecção por um fungo patogénico num doente por administração de uma desidrofenila-histina ou seu análogo, em conjunto com a administração de um ou mais outros agentes

antifúngicos, incluindo por exemplo, quaisquer dos agentes ou tipos de agentes previamente mencionados (e. g., em combinação com tratamento com anfotericina B, de um modo preferido, numa formulação de lipossoma ou lípidos; uma azole ou triazole, tal como fluconazole, por exemplo; uma aureobasidina; desidrobenzo[a]naftacenoquinona; ou uma equinocardina) assim como com uma desidrofenila-histina diferente ou o seu análogo.

A desidrofenila-histina ou o seu análogo pode ser administrada antes, depois ou ao mesmo tempo que é administrado outro agente antifúngico. Em determinadas formas de realização, a terapia de combinação permitirá a utilização de quantidades reduzidas de um ou ambos componentes antifúngicos, relativamente à quantidade utilizada, quando utilizados isolados.

Ainda outras formas de realização referem-se à administração de uma desidrofenila-histina ou o seu análogo a um indivíduo para o tratamento ou prevenção de infecção por um fungo patogénico, em que o indivíduo é imunossuprimido ou imunocomprometido, e. g., como resultado de distúrbio genético, doença, tais como diabetes ou VIH ou outra infecção, quimioterapia ou tratamento por radiação para o cancro ou outra doença, ou imunossupressão induzida por fármaco ou qualquer forma em relação ao transplante de tecidos ou órgãos ou o tratamento de um distúrbio autoimune. Nos casos em que o doente está a ser tratado ou irá ser tratado com um agente imunossupressor, e. g., em relação ao transplante de um tecido ou órgão, uma desidrofenila-histina ou o seu análogo pode ser co-administrada com o(s) agente(s) imunossupressor(es) para tratar ou prevenir uma infecção fúngica patogénica.

Outro aspecto desta invenção é o tratamento ou prevenção de infecção por um fungo patogénico num doente infectado ou suspeito de estar infectado com VIH, por administração de uma desidrofenila-histina antifúngica ou seu análogo, em conjunto com a administração de uma ou mais terapêuticos anti-VIH (incluindo, e. g., inibidores de protease de VIH, inibidores de transcriptase reversa ou agentes antivirais). A desidrofenila-histina ou seu análogo pode ser administrada antes, depois ou ao mesmo tempo que a administração do(s) agente(s) anti-VIH.

Outro aspecto desta invenção é o tratamento ou prevenção de infecção por um fungo patogénico num doente por administração de uma desidrofenila-histina antifúngica ou o seu análogo, em conjunto com a administração de um ou mais compostos antibióticos, especialmente um ou mais agentes antibacterianos, de um modo preferido numa quantidade e regime eficazes para tratar ou prevenir infecções bacterianas. Novamente, a desidrofenila-histina ou o seu análogo pode ser administrada antes, depois ou ao mesmo tempo que a administração do(s) outro(s) agente(s).

As infecções fúngicas patogénicas que podem ser tratadas ou prevenidas pelos métodos divulgados incluem, entre outras, Aspergiloses, incluindo aspergiloses pulmonares invasivas; Blastomicoses, incluindo infecções profundas ou rapidamente progressivas e blastomicoses no sistema nervoso central; Candidases, incluindo candidases retrógradas do tracto urinário, e. g., em doentes com pedras nos rins, obstrução do tracto urinário, transplante renal ou diabetes mellitus pouco controlada; Coccidioidomicoses, incluindo doença crónica que não responde bem a outra quimioterapia; Criptococoses; Histoplasmoses; Mucormicoses, incluindo e. g., mucormicose

craniofacial e mucormicose pulmonar; Paracoccidioidomicoses; e Esporotricoses. Deve ser notado que a administração de uma composição compreendendo uma quantidade antifúngica de uma ou mais desidrofenila-histinas ou os seus análogos pode ser particularmente útil para tratar ou prevenir uma infecção fúngica patogénica num indivíduo mamífero, em que o fungo é resistente a uma ou mais terapias antifúngicas ou em que a utilização de uma ou mais terapias antifúngicas é contraindicada, e. g., como mencionado acima.

As composições farmacêuticas antifúngicas que contêm, pelo menos, uma desidrofenila-histina antifúngica ou o seu análogo, também são proporcionadas para utilização na prática dos métodos divulgados. Essas composições farmacêuticas podem ser embaladas em conjunto com um folheto informativo apropriado contendo, *inter alia*, instruções e informações relativas à sua utilização antifúngica. São também proporcionadas composições farmacêuticas que contêm uma ou mais desidrofenila-histinas ou os seus análogos em conjunto com um segundo agente antifúngico.

#### Métodos de Tratamento de Infecções Fúngicas

Determinadas formas de realização aqui descritas referem-se a métodos para tratar ou prevenir uma infecção fúngica patogénica, incluindo por exemplo Aspergiloses, incluindo aspergiloses pulmonares invasivas; Blastomicoses, incluindo infecções profundas ou rapidamente progressivas e blastomicoses no sistema nervoso central; Candidases, incluindo candidases retrógradas do tracto urinário, por exemplo, em doentes com pedras nos rins, obstrução do tracto urinário, transplante renal ou diabetes mellitus pouco controlada; Coccidioidomicoses,

incluindo doença crónica que não responde bem a outra quimioterapia; Criptococoses; Histoplasmoses; Mucormicoses, incluindo e. g., mucormicose craniofacial e mucormicose pulmonar; Paracocidioiomicoses; e Esporotricoses. Os métodos podem envolver a administração de, pelo menos, uma desidrofenila-histina antifúngica ou o seu análogo, como descrita acima, a um indivíduo humano de modo que a infecção fúngica seja tratada ou prevenida. Em determinadas formas de realização, a desidrofenila-histina ou o seu análogo pode ser administrada em conjunto com a administração de uma ou mais não-desidrofenila-histinas ou os seus agentes antifúngicos análogos, tal como anfotericina B, ou um agente imidazole ou triazole como aqueles previamente mencionados.

A infecção fúngica patogénica pode ser tópica, e. g., provocada por, entre outros organismos, espécies de *Candida*, *Trichophyton*, *Microsporum* ou *Epiderinophyton* ou mucosal, e. g., provocada por *Candida albicans* (e. g., aftas e candidíases vaginais). A infecção pode ser sistémica, por exemplo, provocada por *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma* ou *Blastomyces* spp. A infecção também pode envolver micetoma eumicótica, cromoblastomicose, meningite criptocócica ou ficomicose.

Formas de realização adicionais referem-se a métodos para tratar ou prevenir uma infecção fúngica patogénica seleccionada do grupo consistindo em *Candida* spp. incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei* e *C. galbrata*; *Aspergillus* spp. incluindo *A. fumigatus* e *A. flavus*; *Cryptococcus neoformans*; *Blastomyces* spp. incluindo *Blastomyces dermatitidis*; *Pneumocystis carinii*; *Coccidioides immitis*; *Basidiobolus*

*ranarum*; *Conidiobolus spp.*; *Histoplasma capsulatum*; *Rhizopus spp.* incluindo *R. oryzae* e *R. microsporus*; *Cunninghamella spp.*; *Rhizoniucor spp.*; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Pseudallescheria boydii*; *Rhinosporidium seeberi*; e *Sporothrix schenckii*. Novamente, o método pode envolver administração de uma desidrofenila-histina antifúngica não-imunossupressora ou seu análogo a um doente com a sua necessidade, de modo que a infecção fúngica seja tratada ou prevenida sem induzir um efeito imunossupressor desfavorável.

Formas de realização adicionais referem-se a métodos para tratar ou prevenir uma infecção fúngica patogénica que é resistente a outras terapias antifúngicas, incluindo infecções fúngicas patogénicas que são resistentes a um ou mais agentes antifúngicos aqui mencionados, tais como anfotericina B, flucitosina e um dos imidazoles ou triazoles (incluindo, e. g., fluconazole, cetoconazole, itraconazole e os outros exemplos previamente mencionados). Os métodos podem envolver a administração ao doente de uma ou mais desidrofenila-histinas antifúngicas ou os seus análogos, numa quantidade e regime de dosagem tais que uma infecção fúngica resistente a outras terapias antifúngicas no indivíduo seja tratada ou prevenida.

Formas de realização adicionais referem-se a métodos para tratar ou prevenir uma infecção fúngica patogénica num doente que é alérgico, intolerante ou que não responde a outra terapia antifúngica ou no qual é contra-indicada a utilização de outros agentes antifúngicos, incluindo um ou mais agentes antifúngicos aqui mencionados, tais como anfotericina B, flucitosina, um dos imidazoles ou triazoles (incluindo, e. g., fluconazole, cetoconazole, itraconazole e os outros exemplos previamente mencionados). Os métodos podem envolver a administração a esse

doente de uma ou mais desidrofenila-histinas antifúngicas ou seus análogos, numa quantidade tal que uma infecção fúngica seja tratada ou prevenida.

Desidrofenila-histina embalada ou os seus análogos

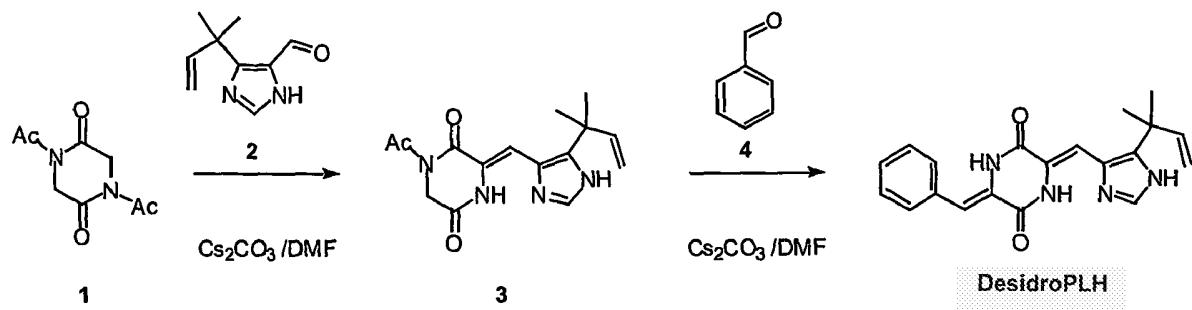
Determinadas formas de realização referem-se à desidrofenila-histina embalada ou os seus análogos, de um modo preferido desidrofenila-histina antifúngica não-imunossupressora embalada ou os seus análogos, cujo termo pretende incluir, pelo menos, uma desidrofenila-histina ou seu análogo, como descrita acima, embalada com instruções para administrar a desidrofenila-histina ou o(s) seu(s) análogo(s) como um agente antifúngico sem causar efeitos imunossupressores desfavoráveis num indivíduo humano. Nalgumas formas de realização, a desidrofenila-histina antifúngica não-imunossupressora ou o seu análogo é um membro de um dos subconjuntos preferidos de compostos descritos acima. A desidrofenila-histina ou o seu análogo pode ser embalada isoladamente com as instruções ou pode ser embalada com outra desidrofenila-histina ou o seu análogo, rapamicina ou outro ingrediente ou aditivo, e. g., um ou mais dos ingredientes das composições farmacêuticas. A embalagem pode conter um ou mais recipientes cheios com um ou mais ingredientes das composições farmacêuticas. Pode estar associada, opcionalmente, com esses recipientes uma notificação na forma prescrita por uma agência governamental, regulamentando a produção, utilização ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, cuja notificação reflecte a aprovação pela agência da produção, utilização ou venda para administração humana.

Os seguintes exemplos não limitativos pretendem descrever os métodos preferidos utilizando determinadas formas de realização preferidas. As variações nos detalhes dos métodos particulares utilizados e das composições químicas precisas obtidas serão, sem dúvida, entendidas pelos especialistas na técnica.

#### EXEMPLO 1

##### A. Síntese de Desidrofenila-histina

A desidrofenila-histina foi sintetizada através de condensação de acordo com o seguinte esquema de reacção básico, como mostrado na Figura 1:



##### $\text{N},\text{N}'$ -diacetil-2,5-piperazinodiona

Foram misturados 25,0 g de 2,5-piperazinodiona global **1** [2,5-piperazinodiona (Aldrich G640-6), 25,0 g, 0,218 mol] em 100 mL de anidrido acético ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) com acetato de sódio ( $\text{NaOAc}$ ) (17,96 g, 0,0218 mol). A mistura foi aquecida a 110 °C durante 8 h utilizando um condensador de dupla serpentina sob uma atmosfera de árgon. Depois do  $\text{Ac}_2\text{O}$  ser removido por evaporação, o resíduo foi dissolvido em  $\text{AcOEt}$ , lavado com 10% de ácido

cítrico, 10% de  $\text{NaHCO}_3$  e  $\text{NaCl}$  saturado (três vezes cada), seco sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrado *in vacuo*. O resíduo foi triturado com éter para formar um sólido. Este sólido foi recristalizado de  $\text{EtOAc}$  com éter-hexano para produzir 26,4 g (61%) de  $\text{N,N}'\text{-diacetil-2,5-piperazinodiona}$  **1**.

1-Acetyl-3-[(Z)-1-[5-(1,1-dimethyl-2-propenyl)-1H-4-imidazolyl]methylidene]-2,5-piperazinodiona **2**

A uma solução de 5-(1,1-dimethyl-2-propenyl)imidazole-4-carboxaldeído (100 mg, 0,609 mmol) em DMF (2 mL) foi adicionado o composto **1** (241 mg, 1,22 mmol) e a solução foi submetida a vácuo, repetidamente, num curto período de tempo para remover oxigénio e borbulhada com árgon, seguida pela adição de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (198 mg, 0,609 mmol) e o processo de vácuo-borbulhação foi novamente repetido. A mistura resultante foi agitada durante 5 h à temperatura ambiente. Depois do solvente ser removido por evaporação, o resíduo foi dissolvido na mistura de  $\text{EtOAc}$  e 10% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e a fase orgânica foi lavada novamente com 10% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{NaCl}$  saturado por três vezes, seco sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrado *in vacuo*. O óleo residual foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica utilizando  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (100:0 a 50:1) como um eluente para produzir 60 mg (33%) de um sólido **2** amarelo pálido.

Desidrofenila-histina

A uma solução de **2** (30 mg, 0,099 mmol) em DMF (0,8 mL) foi adicionado benzaldeído (51  $\mu\text{L}$ , 0,496 mmol, 5 eq) e a solução foi submetida a vácuo, repetidamente, num curto período de tempo

para remover oxigénio e borbulhada com árgon, seguido pela adição de  $\text{CS}_2\text{CO}_3$  (53 mg, 0,149 mmol, 1,5 eq) e o processo de vácuo-borbulhação foi novamente repetido. A mistura resultante foi aquecida durante 2,5 h a 80 °C. (A temperatura deve ser aumentada lentamente. O aquecimento rápido aumenta a produção de isómero-*E* na unidade de benzilideno). Depois do solvente ser removido por evaporação, o resíduo foi dissolvido em EtOAc, lavado com água por duas vezes e saturado com NaCl por três vezes, seco sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrado *in vacuo*. Em TLC utilizando  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (10:1), pode-se observar uma mancha com luminescência verde-amarelo brilhante a UV de 365 nm. A pureza deste produto bruto foi de mais de 75% a partir da análise por HPLC. O resíduo resultante foi dissolvido em 90% de MeOH aq. e aplicado à coluna de HPLC de fase reversa (YMC-Pack, ODS-AM, 20 x 250 mm) e eluído utilizando um gradiente linear de 70 a 74% de MeOH em água durante 16 min a um caudal de 12 mL/min, e a fracção desejada foi recolhida e concentrada por evaporação para produzir 19,7 mg (60%) de desidrofenila-histina de cor amarela. O perfil de HPLC da desidrofenila-histina sintética bruta é mostrado na Figura 2.

Na purificação da desidrofenila-histina, como mostrado na Figura 4, um pico principal era o composto de forma-*Z* desejado da desidrofenila-histina. A formação de um isómero-*E* foi observada como um componente secundário (cerca de 10%) que foi eluído como um pico mais polar do que o isómero-*Z*. Como outros picos menores, também foram observados os compostos-*Z* e -*E* reduzidos, nos quais foi reduzida a parte dimetilalilo da desidrofenila-histina. A formação destes compostos reduzidos foi devido ao aldeído **2** com uma impureza reduzida que foi gerada durante a redução com DIBAL-H e não foi separada no processo subsequente.

Estes compostos secundários poderiam ser removidos através de purificação por HPLC preparativa, produzido a desidrofenila-histina com a configuração-Z na parte de benzílico com rendimento de 60% (20% de rendimento em dois passos) com mais de 95% de pureza. Os compostos com configuração-E no lado do imidazole do anel de dicetopiperazina não foram observados neste perfil de HPLC, sugerindo que a primeira reacção do composto **1** até **3** na Figura 1 é Z-selectiva.

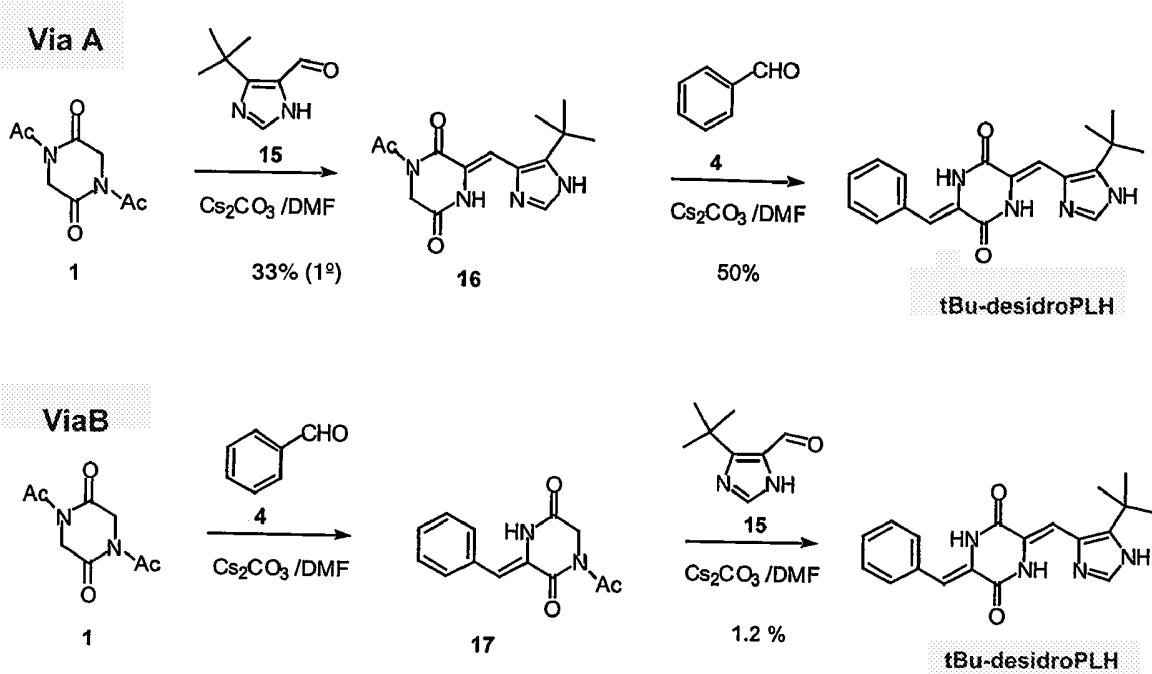
B. Características químicas:

O composto de desidrofenila-histina acima é um sólido amarelo pálido. Sua estrutura é confirmada por análises convencionais de RMN.

EXEMPLO 2

Síntese e Caracterização Física de Derivados de tBu-desidrofenila-histina

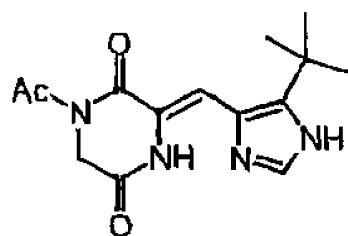
Foram sintetizados derivados estruturais de desidrofenila-histina de acordo com os seguintes esquemas de reacção para produzir tBu-desidrofenila-histina. A síntese pela Via A (ver Figura 1) é semelhante em certos aspectos à síntese da desidrofenila-histina sintetizada como no Exemplo 1.



Via A:

A N,N'-diacetil-2,5-piperazinodiona **1** foi preparada como no Exemplo 1.

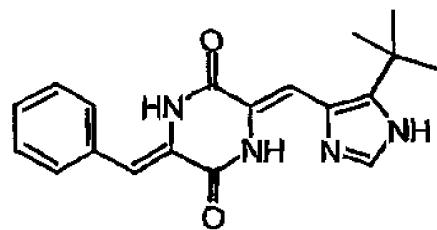
1) 1-Acetyl-3-[(Z)-1-[5-terc-butyl-1H-4-imidazolil]-metilideno]-2,5-piperazinodiona (16)



A uma solução de 5-terc-butil-imidazole-4-carboxaldeído **15** (3,02 g, 19,8 mmol) em DMF (30 mL) foi adicionado o composto **1** (5,89 g, 29,72 mmol) e a solução foi submetida a vácuo,

repetidamente, num curto período de tempo para remover oxigénio e borbulhada com árgon, seguido pela adição de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (9,7 g, 29,72 mmol) e o processo de vácuo-borbulhação foi novamente repetido. A mistura resultante foi agitada durante 5 h à temperatura ambiente. Depois do solvente ser removido por evaporação, o resíduo foi dissolvido na mistura de EtOAc e 10% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e a fase orgânica foi lavada novamente com 10% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{NaCl}$  saturado por três vezes, seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrada *in vacuo*. O óleo residual foi purificado através de coluna de cromatografia em silica utilizando  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (100:0 a 50:1) como um eluente para produzir 1,90 g (33%) de um sólido amarelo pálido 16. RMN de  $^1\text{H}$  (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) δ 12,14 (d, br-s, 1H), 9,22 (br-s, 1H), 7,57 (s, 1H), 7,18, (s, 1H), 4,47 (s, 2H), 2,65 (s, 3H), 1,47 (s, 9H).

## 2) t-Bu-desidrofenila-histina



A uma solução de 1-Acetyl-3-[(Z)-1-[5-terc-butil-1H-4-imidazolil]metilideno]-2,5-piperazinodiona (16) (11 mg, 0,038 mmol) em DMF (1,0 mL) foi adicionado benzaldeído (19 mL, 0,19 mmol, 5 eq) e a solução foi submetida a vácuo, repetidamente, num curto período de tempo para remover oxigénio e borbulhada com árgon, seguido pela adição de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (43 mg, 0,132 mmol, 3,5 eq) e o processo de vácuo-borbulhação foi novamente repetido. A mistura resultante foi aquecida durante

2,5 h a 80 °C. Depois do solvente ser removido por evaporação, o resíduo foi dissolvido em EtOAc, foi lavado com água por duas vezes e NaCl saturado por três vezes, seco sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrado *in vacuo*. O resíduo resultante foi dissolvido em 90% de MeOH aq. e aplicado numa coluna de HPLC de fase reversa (YMC-Pack, ODS-AM, 20 x 250 mm) e eluído utilizando um gradiente linear de 70 a 74% de MeOH em água durante 16 min a um caudal de 12 mL/min, e a fracção desejada foi recolhida e concentrada por evaporação para produzir 6,4 mg (50%) de terc-butil-desidrofenila-histina de cor amarela. RMN de <sup>1</sup>H (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) □12,34 br-s, 1H), 9,18 □br-s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,31 - 7,49 (m, 5H), 7,01 s, 2H), 1,46 □s, 9H).

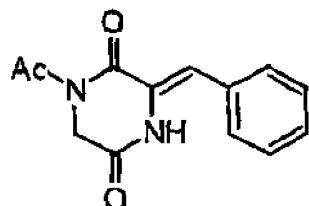
A reacção de desidrofenila-histina para produzir tBu-desidrofenila-histina é idêntica à do Exemplo 1.

O rendimento total de tBu-desidrofenila-histina recuperada foi de 16,5%.

Via B:

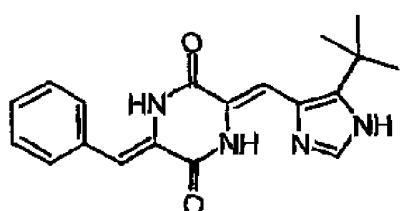
A N,N'-diacetil-2,5-piperazinodiona **1** foi preparada como no Exemplo 1.

1) 1-Acetyl-3-[(Z)-benzilideno]-2,5-piperazinodiona (17)



A uma solução de benzaldeído 4 (0,54 g, 5,05 mmol) em DMF (5 mL) foi adicionado o composto **1** (2,0 g, 10,1 mmol) e a solução foi submetida a vácuo, repetidamente, num curto período de tempo para remover oxigénio e borbulhada com árgon, seguido pela adição de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (1,65 g, 5,05 mmol) e o processo de vácuo-borbulhação foi novamente repetido. A mistura resultante foi agitada durante 3,5 h à temperatura ambiente. Depois do solvente ser removido por evaporação, o resíduo foi dissolvido na mistura de EtOAc e 10% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e a fase orgânica foi lavada novamente com 10% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{NaCl}$  saturado por três vezes, seco sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrado *in vacuo*. O resíduo sólido foi recristalizado de éter-MeOH para obter um sólido esbranquiçado de **17**; rendimento 1,95 g (79%).

2) t-Bu-desidrofenila-histina



A uma solução de 1-Acetyl-3-[(Z)-benzilideno]-2,5-piperazinodiona (17) (48 mg, 0,197 mmol) em DMF (1,0 mL) foi adicionado 5-terc-butylimidazole-4-carboxaldeído 15 (30 mg,

0,197 mmol) e a solução foi submetida a vácuo, repetidamente, num curto período de tempo para remover oxigénio e borbulhada com árgon, seguido pela adição de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (96 mg, 0,296 mmol) e o processo de vácuo-borbulhação foi novamente repetido. A mistura resultante foi aquecida durante 14 h a 80 °C. Depois do solvente ser removido por evaporação, o resíduo foi dissolvido em EtOAc, foi lavado com água por duas vezes e NaCl saturado por três vezes, seco sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrado *in vacuo*. O resíduo resultante foi dissolvido em 90% de MeOH aq. e aplicado a uma coluna de HPLC de fase reversa (YMC-Pack, ODS-AM, 20 x 250 mm) e eluído utilizando um gradiente linear de 70 a 74% de MeOH em água durante 16 min a um caudal de 12 mL/min, e a fracção desejada foi recolhida e concentrada por evaporação para produzir 0,8 mg (1,2%) de terc-butil-desidrofenila-histina de cor amarela.

O rendimento total de tBu-desidrofenila-histina recuperada foi de 0,9%.

O perfil de HPLC da tBu-desidrofenila-histina sintética bruta da Via A e da Via B é mostrado na Figura 4.

Foram sintetizados dois outros derivados de tBu-desidrofenila-histina de acordo com o método da Via A. Na síntese dos derivados adicionais de tBu-desidrofenila-histina, foram feitas modificações para o composto **4** de benzaldeído.

A Figura 4 ilustra as semelhanças dos perfis de HPLC (Coluna: YMC-Pack ODS-AM (20 x 250mm); Gradiente: 65% a 75% num sistema de água-metanol durante 20 min, depois 10 min num sistema de 100% de metanol; Caudal: 12 mL/min; O.D. 230 nm) da desidrofenila-histina sintetizada do Exemplo 1 (Fig. 2) e do

composto de tBu-desidrofenila-histina acima exemplificado produzido através da Via A.

A sequência de introdução dos aldeídos é relevante para o rendimento e é então um aspecto da síntese. Um análogo de desidrofenila-histina foi sintetizado, como um modelo ou controlo, em que o grupo dimetilalilo foi mudado para o grupo terc-butilo com um impedimento estérico semelhante na posição 5 do anel de imidazole.

A síntese desta "terc-butilo (tBu)-desidrofenila-histina" utilizando a "Via A" foi como mostrada acima; particularmente, a sequência de introdução do aldeído segue exactamente a síntese de desidrofenila-histina, e apresentou um rendimento total de 16,5% de tBu-desidrofenila-histina. Este rendimento foi semelhante àquele da desidrofenila-histina (20%). Utilizando a "Via B" em que a sequência de introdução dos aldeídos é oposta à da "Via A" para a síntese de desidrofenila-histina, apenas uma quantidade vestigial da tBu-desidrofenila-histina desejada foi obtida com um rendimento total de 0,9%, apesar da introdução do primeiro benzaldeído 4 produzir um rendimento de 76% do intermediário **17**. Este resultado indicou que pode ser difícil introduzir os imidazole-4-carboxaldeídos **15** muito volumosos com um grupo substituinte tendo um carbono quaternário na posição 5 adjacente ao anel de imidazole no intermediário **17**, sugerindo que a sequência para introdução de aldeídos é um aspecto importante para obter um rendimento alto de desidrofenila-histina ou um análogo de desidrofenila-histina utilizando a síntese aqui descrita.

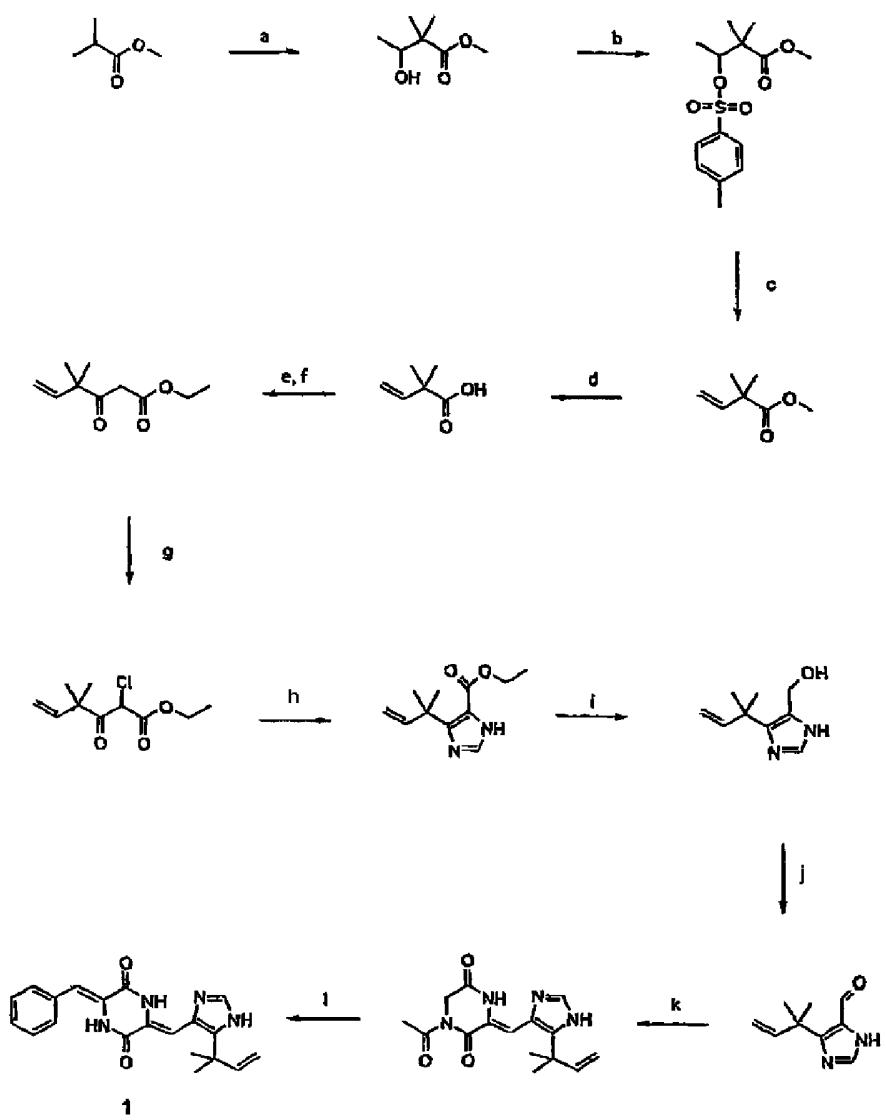
Da análise de HPLC dos produtos brutos finais, como mostrado na Figura 4, foi observado um conteúdo muito alto de

tBu-desidrofenila-histina e uma pequena quantidade de formações de subprodutos na amostra bruta da Via A (à esquerda). Porém, foi observada uma quantidade relativamente menor da tBu-desidrofenila-histina desejada e vários outros subprodutos na amostra obtida utilizando a Via B (à direita).

#### EXEMPLO 3

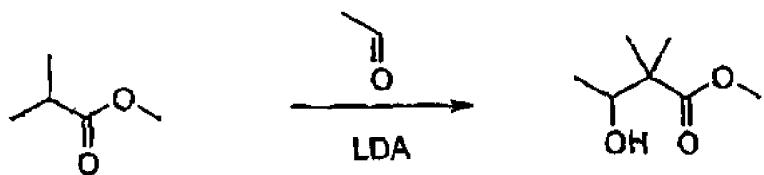
#### Síntese Alternativa a Escala Maior de Desidrofenila-histina e Análogos

*Síntese de 3-Z-Benzilideno-6-[5"- (1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4"-Z-ilmetileno]-piperazina-2,5-diona [Desidrofenila-histina] (1)*



Reagentes: a) LDA,  $\text{CH}_3\text{CHO}$ ; b) Tos-Cl, piridina; c) DBU; d) NaOH; e)  $\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$ ; KOOCC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>COOEt, BuLi; g)  $\text{SO}_2\text{Cl}$ ; h)  $\text{H}_2\text{NCHO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ; i)  $\text{LiAlH}_4$ ; j)  $\text{MnO}_2$ ; k) 1,4-diacetyl-piperazina-2,5-diona,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ; l) benzaldeído,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ;

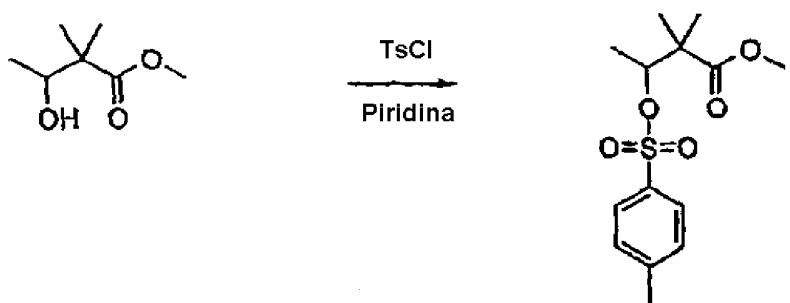
*Éster metílico do ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-butírico*



Uma solução de LDA em heptano/THF/etilbenzeno (2 M, 196 mL, 0,39 mol) foi adicionada sob árgon a uma solução de isobutirato de metilo (45 mL, 0,39 mol) em THF (270 mL) a -60° e a mistura resultante foi agitada durante 30 min. Uma solução de acetaldeído (27 mL, 0,48 mol) em THF (45 mL), pré-arrefecida a -60°, foi adicionada lentamente e a solução resultante agitada durante mais 30 min. Foi adicionado cloreto de amónio saturado (50 mL) e a solução foi deixada aquecer até à temperatura ambiente. A mistura de reacção foi extraída com acetato de etilo, e os extractos foram lavados com HCl (2 M), bicarbonato de sódio, depois solução salina. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, filtrada, depois evaporada para produzir um óleo límpido (52,6 g). Uma destilação a 76-82°/30 mmHg produziu um éster metílico do ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-butírico puro (42,3 g, 74%). (Burk *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 117:4423-4424 (1995)).

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,15 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H); 1,17 (s, 6H); 2,66 (d,  $J = 6,2$  Hz, 1H, -OH); 3,71 (s, 3H, -OMe); 3,87 (quinteto de aplicação,  $J = 6,4$  Hz, 1 H, H3).

Éster metílico do ácido 2,2-dimetil-3-(tolueno-4-sulfoniloxi)-butírico



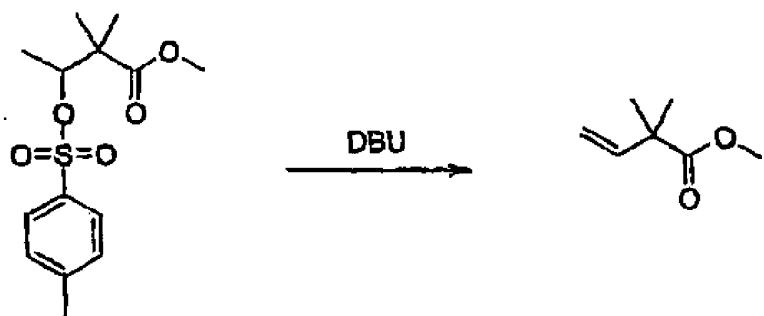
A uma solução arrefecida ( $0^{\circ}$ ) de éster metílico do ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-butírico (52,0 g, 0,36 mol) em piridina (100 mL) foi adicionado gradualmente cloreto de *p*-toluenossulfônico (69,0 g, 0,36 mol). A mistura foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e foi agitada durante 60 h. A reacção foi novamente arrefecida em gelo e foi acidificada pela adição de HCl (2 M). A solução resultante foi extraída com acetato de etilo, os extractos foram lavados com HCl, depois solução salina, secos e evaporados para produzir um óleo que formou um precipitado branco em repouso. Esta mistura foi dissolvida na quantidade mínima de acetato de etilo e depois foi adicionado petróleo leve para produzir um precipitado branco que foi recolhido e lavado com mais petróleo leve. O filtrado foi evaporado parcialmente e uma segunda colheita de cristais foi recolhida e adicionada à primeira para produzir éster metílico do ácido 2,2-dimetil-3-(tolueno-4-sulfoniloxi)-butírico (81,2 g, 76%).

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,12 (s, 3H); 1,13 (s, 3H); 1,24 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H); 2,45 (s, 3H,  $-PhMe$ ) 3,58 (s, 3H,

$-OMe$ ); 4,94 (quarteto,  $J = 6,4$  Hz, 1H, H3), 7,33 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H), 7,78 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H).

A evaporação do filtrado final produziu mais éster metílico do ácido 2,2-dimetil-3-(tolueno-4-sulfoniloxi)-butírico bruto (19,0 g, 18%).

*Éster metílico do ácido 2,2-dimetil-but-3-enóico*



Uma solução de éster metílico do ácido 2,2-dimetil-3-(tolueno-4-sulfoniloxi)-butírico (18,06 g, 0,06 mol) em DBU (15 mL) foi aquecida a 140-160° durante 3,5 h. A mistura foi deixada arrefecer até à temperatura ambiente e foi depois diluída com éter. A mistura foi lavada com HCl (1 M), bicarbonato de sódio, depois solução salina. A camada etérea foi seca e parcialmente evaporada para produzir uma solução concentrada de éster metílico do ácido 2,2-dimetil-but-3-enóico (10 g). (Savu & Katzenellenbogen, J. Org. Chem., 46:239-250 (1981)). Foi evitada mais evaporação devido à volatilidade do produto (p.e. 102°). (Tsaconas et al., Aust. J. Chem., 53:435-437 (2000)).

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,31 (s, 6H); 3,68 (s, 3H); 5,06 (d,  $J = 17,1$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,11 (d,  $J = 10,7$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6,03 (dd,  $J = 17,1, 10,7$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ).

Ácido 2,2-dimetil-but-3-enóico



A solução etérea acima de éster metílico do ácido 2,2-dimetil-but-3-enóico (10 g) foi diluída com etanol (25 mL), foi adicionado hidróxido de sódio (4 M, 22 mL) e a mistura foi agitada de um dia para o outro. A solução foi parcialmente evaporada para remover o etanol e a mistura resultante foi adicionada a HCl (1 M, 100 mL). O produto foi extraído com acetato de etilo e os extractos foram secos e evaporados para produzir ácido 2,2-dimetil-but-3-enóico (6,01 g, 88%, 2 passos). (Hayashi et al., J. Org. Chem., 65:8402-8405 (2000)).

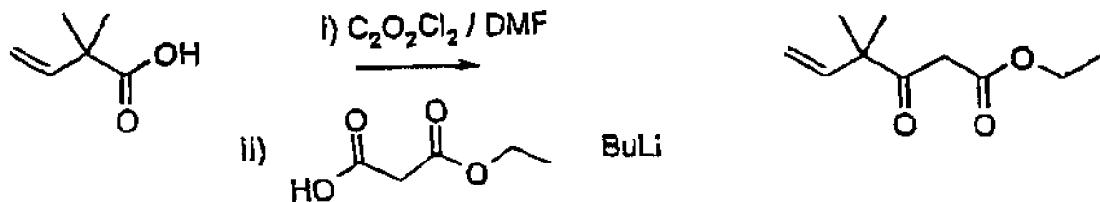
RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,33 (s, 6H); 5,11 (d,  $J = 10,8$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,15 (d,  $J = 17,2$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6,05 (dd,  $J = 17,2, 10,8$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ).

Monoetilmalonato de hidrogénio (Wierenga & Skulnick, "Aliphatic and Aromatic  $\beta$ -keto Esters from Monoethyl Malonate: Ethyl 2-Butyrylacetate", Organic Syntheses Collective Volume 7, 213).



Etilmalonato de potássio (25,0 g, 0,15 mol) foi suspenso em água (15,6 mL) e arrefecido num banho de gelo. Foi adicionado HCl concentrado (12,5 mL), gota a gota, durante 30 min, depois a mistura foi agitada durante mais 10 min. O precipitado foi removido por filtração, depois lavado duas vezes com éter. O filtrado foi separado e a fase aquosa foi extraída com éter. As soluções etéreas combinadas foram secas ( $\text{MgSO}_4$ ) e evaporadas para produzir, como um óleo, monoetilmalonato de hidrogénio (19,2 g, 99%) que foi seco sob vácuo de um dia para o outro (ou  $50^\circ/1\text{ mm}$  durante 1 h) antes da utilização.

*Éster etílico do ácido 4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enóico*



Foi adicionado cloreto de oxalilo (3,83 mL, 43,9 mmol), gota a gota, a uma solução arrefecida ( $0^\circ$ ) de ácido 2,2-dimetil-but-3-enóico (5,0 g, 43,9 mmol) e DMF (1 gota) em diclorometano anidro (25 mL). A mistura foi agitada durante 1 h a  $0^\circ$ , depois durante 16 h à temperatura ambiente. Uma destilação fraccionária ( $121^\circ/760\text{ mmHg}$ ) produziu cloreto de 2,2-dimetil-but-3-enoílo (4,1 g, 71%).

Monoetilmalonato de hidrogénio (7,2 g, 0,05 mol) e bipiridilo (alguns miligramas) foram dissolvidos em THF (90 mL) e o sistema foi borbulhado com azoto. A solução foi arrefecida a -70°, depois foi adicionado BuLi (2,5 M em hexanos, 37 mL, 0,09 mol). Depois da adição de somente ~10 mL de BuLi a solução tornou-se cor-de-rosa e foi requerido mais THF (15 mL) para permitir agitação magnética. O banho de arrefecimento foi removido e foi adicionado o BuLi restante, a temperatura foi deixada alcançar -10°, pelo que a solução se tornou incolor. A mistura foi novamente arrefecida a -60° e foi adicionada, gota a gota, uma solução de cloreto de 2,2-dimetil-but-3-enoílo (4,1 g, 0,03 mol) em THF (12 mL). Depois da adição estar completa, a mistura foi deixada a aquecer até 0° e agitada durante 3 h, depois foi adicionada a uma mistura 1:1 de éter/HCl a 1 M (260 mL) a 0° e agitada durante mais 1,5 h. A camada orgânica foi retirada, lavada com HCl (1 M), solução de bicarbonato de sódio, solução salina, depois seca e evaporada para produzir éster etílico do ácido 4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enóico (5,6 g, 98%). (Hayashi *et al.*, J. Org. Chem., 65:8402-8405 (2000)). Uma destilação com um forno Kugelrohr (160°/1 mm Hg) produziu material puro.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,26 (s, 6H); 1,27 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 3,51 (s, 2H); 4,18 (q,  $J = 6,9$  Hz, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 5,20 (d,  $J = 17,7$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,21 (d,  $J = 9,6$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,89 (dd,  $J = 17,7, 9,6$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ).

Éster etílico do ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enóico



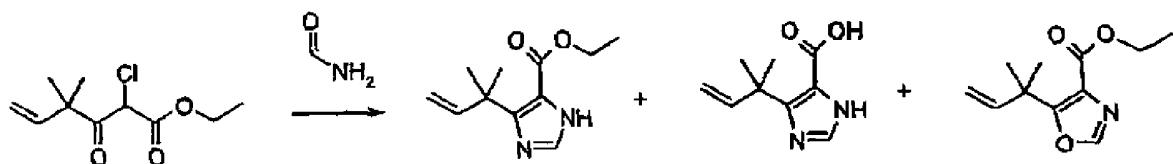
Foi adicionado cloreto de sulfurilo (0,84 mL, 10,4 mmol) a uma solução arrefecida (0°) de éster etílico do ácido 4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enóico (1,83 g, 9,93 mmol) em clorofórmio (7 mL). A mistura resultante foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e agitada durante 30 min, após o que foi aquecida sob refluxo durante 2 h. Depois de arrefecer até à temperatura ambiente, a mistura da reacção foi diluída com clorofórmio, depois foi lavada com bicarbonato de sódio, água e depois solução salina. A fase orgânica foi seca e evaporada para produzir, como um óleo castanho, éster etílico do ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enóico (2,01 g, 93%). (Hayashi et al., J. Org. Chem., 65:8402-8405 (2000)).

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,28 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) ; 1,33 (s, 3H) ; 1,34 (s, 3H) ; 4,24 (q,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) ; 5,19 (s, 1H) ; 5,28 (d,  $J = 16,9$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) ; 5,29 (d,  $J = 10,9$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) ; 5,96 (dd,  $J = 16,9, 10,9$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) .

LC/MS  $t_R = 8,45$  (219,3  $[\text{M}(\text{Cl}^{37})+\text{H}]^+$  min.

Este material foi feito reagir sem mais purificação.

Éster etílico do ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazole-4-carboxílico



Uma suspensão de éster etílico do ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enóico (19,4 g, 0,09 mol) e água (1,94 mL, 0,11 mol) em formamida (36,8 mL) foi brevemente agitada, depois dispensada em frasquinhos de 15 x 18 mL. Os frasquinhos foram selados e aquecidos a 150° durante 5 h. Depois de arrefecer até à temperatura ambiente, os conteúdos dos frasquinhos foram combinados e extraídos exaustivamente com clorofórmio. Os extractos foram secos e evaporados para produzir uma solução de formamida concentrada (14,7 g). Isto foi adicionado a uma coluna de sílica (7 cm de diâmetro, 11 cm de altura) empacotada em 1% de MeOH/1% de Et<sub>3</sub>N em clorofórmio. A eluição da coluna com 2 L desta mistura seguida por 2 L de 2% de MeOH/1% de Et<sub>3</sub>N em clorofórmio produziu, nas fracções iniciais, um composto suspeito de ser éster etílico do ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-oxazole-4-carboxílico (1,23 g, 7%).

HPLC (214 nm)  $t_R = 8,68$  (50,4%) min.

RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,40 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 1,54 (s, 6H) ; 4,38 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 5,03 (d,  $J = 17,4$  Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>) ; 5,02 (d,  $J = 10,4$  Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>) ; 6,26 (dd,  $J = 17,4, 10,4$  Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>) ; 7,83 (s, 1H) .

LCMS  $t_R = 8,00$  (210,1 [M+H]<sup>+</sup>, 361,1 [2M+H]<sup>+</sup>) min.

Recuperado das últimas fracções estava o desejado éster etílico do ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazole-4-carboxílico (3,13 g, 17%). (Hayashi *et al.*, J. Org. Chem., 65:8402-8405 (2000)).

HPLC (214 nm)  $t_R = 5,52$  (96,0%) min.

RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1,38 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H); 1,57 (s, 6H); 4,35 (q,  $J = 7,0$  Hz, 2H); 5,04-5,14 (m, 2H, -CH=CH<sub>2</sub>); 6,28 (dd,  $J = 18,0, 10,4$  Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 7,52 (s, 1H).

LC/MS  $t_R = 5,30$  (209,1 [M+H]<sup>+</sup>, 417,2 [2M+H]<sup>+</sup>) min

Foi também recuperado mais éster etílico do ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazole-4-carboxílico da coluna (3,59 g, 19%) que era de pureza mais baixa mas ainda suficiente para reacção posterior.

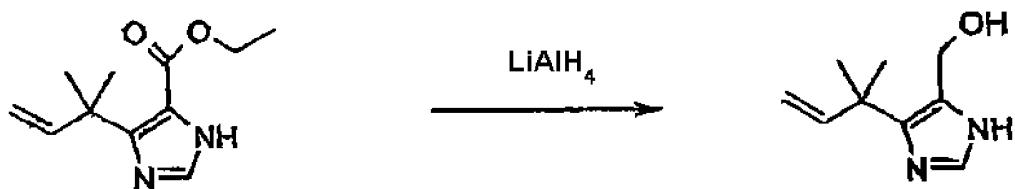
Outro subproduto isolado de uma reacção semelhante (em menor escala) por eluição adicional da coluna com 5% de MeOH/1% de Et<sub>3</sub>N em clorofórmio foi um composto suspeito de ser ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazole-4-carboxílico (0,27 g, 9%).

HPLC (245 nm)  $t_R = 5,14$  (68,9%) min.

RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  1,45 (s, 6H); 4,97 (d,  $J = 10,6$  Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5,01 (d,  $J = 17,7$  Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 6,28 (dd,  $J = 17,7, 10,6$  Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 7,68 (s, 1H).

LCMS  $t_R = 4,72$  (181,0 [M+H]<sup>+</sup>, 361,1 [2M+H]<sup>+</sup>) min

[5-(1,1-Dimetil-aliil)-3H-imidazol-4-il]-metanol



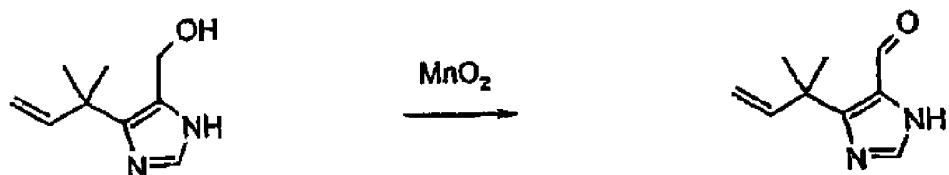
Uma solução de éster etílico do ácido 5-(1,1-dimetil-aliil)-3H-imidazole-4-carboxílico (3,13 g, 15,0 mmol) em THF (60 mL) foi adicionado, gota a gota, a uma suspensão de hidreto de alumínio e lítio (suspensão a 95%, 1,00 g, 25,0 mmol) em THF (40 mL) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 4 h. Foi adicionada água até a libertação de gás cessar, a mistura foi agitada durante 10 min, depois foi filtrada por um funil sinterizado. O precipitado foi lavado com THF, depois com metanol, e o filtrado e as lavagens foram combinados, evaporados, depois liofilizados para produzir [5-(1,1-dimetil-aliil)-3H-imidazol-4-il]-metanol (2,56 g, 102%). A água residual foi removida através de azeotropia com clorofórmio antes da reacção posterior. (Ver Hayashi et al., J. Org. Chem., 65:8402-8405 (2000)).

HPLC (240 nm)  $t_R$  = 3,94 (56,8%) min.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1,43 (s, 6H); 4,57 (s, 2H); 5,01 (d,  $J$  = 10,5 Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,03 (d,  $J$  = 17,7 Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6,10 (dd,  $J$  = 17,7, 10,5 Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 7,46 (s, 1H).

LC/MSTR  $t_R$  = 3,77 (167,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) min.

5-(1,1-Dimetil-alil)-3H-imidazole-4-carbaldeído



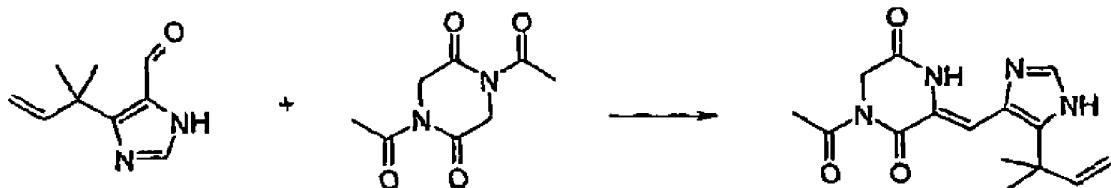
Foi adicionado dióxido de manganês (20 g, 0,23 mol) a uma solução de [5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-il]-metanol (2,56 g, 0,02 mol) em acetona (300 mL) e a mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 5 h. A mistura foi filtrada através de um filtro de papel e o resíduo foi lavado com acetona. O filtrado e as lavagens foram combinados e evaporados para produzir 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazole-4-carbaldeído (1,82 g, 51%). (Hayashi *et al.*, J. Org. Chem., 65:8402-8405 (2000)).

HPLC (240 nm)  $t = 4,08$  (91,5%) min.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,56 (s, 6H); 5,16 (d,  $J = 10,6$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,19 (d,  $J = 17,3$  Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6,22 (dd,  $J = 17,3$ , 10,6 Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 7,75 (s, 1H), 10,02 (s, 1H,  $\text{HCO}$ ).

LC/MS  $t_R = 3,75$  (165,2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) min.

1-Acetil-3-[5'-(1,1-dimetil-alil)-1H-imidazol-4'-Z-ilmetileno]-piperazina-2,5-diona



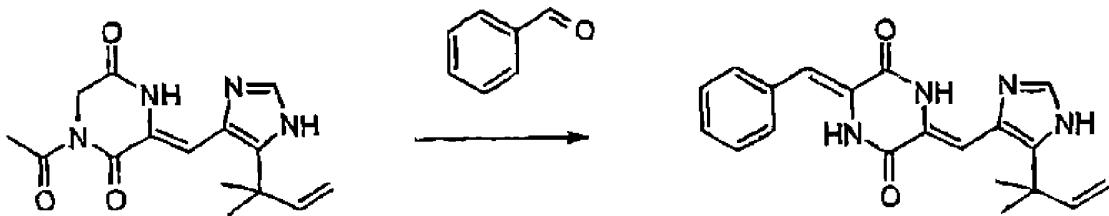
A uma solução de 5-(1,1-dimethyl-allyl)-3H-imidazole-4-carbaldeído (1,78 g, 0,01 mol) em DMF (35 mL) foi adicionada 1,4-diacetil-piperazina-2,5-diona (8,59 g, 0,04 mol) e a mistura foi submetida a vácuo, depois borbulhada com argônio. O processo de vácuo-borbulhação foi repetido mais duas vezes, depois foi adicionado carbonato de césio (3,53 g, 0,01 mol). O processo de vácuo-borbulhação foi repetido mais três vezes, depois a mistura resultante foi aquecida a 45° durante 5 h. A mistura de reacção foi evaporada parcialmente (aquecendo sob alto vácuo) até que um pequeno volume permaneceu e a solução resultante foi adicionada, gota a gota, a água gelada (50 mL). O precipitado amarelo foi recolhido, lavado com água, depois lyophilizado para produzir 1-acetil-3-[5'-(1,1-dimethyl-allyl)-1H-imidazol-4'-ilmetileno]-piperazina-2,5-diona (1,18 g, 36%). (Hayashi, Comunicação Pessoal (2001)).

HPLC (214 nm)  $t_R = 6,01$  (72,6%) min.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,53 (s, 6H); 2,64 (s, 3H); 4,47 (s, 2H); 5,19 (d,  $J = 17,3$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,23 (d,  $J = 10,7$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6,06 (dd,  $J = 17,3, 10,7$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 7,16 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 9,47 (bs, 1H); 12,11 (bs, 1H) [observada contaminação de ~2% de 1,4-diacetil-piperazina-2,5-diona  $\delta$  2,59 (s, 6H); 4,60 (s, 4H).]

LC/MS  $t_R$  = 6,65 (303,3  $[M+H]^+$ , 605,5  $[2M+H]^+$ ) min.  
(n. b. utilizado sistema diferente).

3-Z-Benzilideno-6-[5''-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4''-Z-ilmetileno]-piperazina-2,5-diona



A uma solução de 1-acetil-3-[5'-(1,1-dimetil-alil)-1H-imidazol-4'-ilmetileno]-piperazina-2,5-diona (2,91 g, 9,62 mmol) em DMF (70 mL) foi adicionado benzaldeído (4,89 mL, 48,1 mmol) e a solução foi submetida a vácuo, depois borbulhada com argon. O processo de vácuo-borbulhação foi repetido mais duas vezes, depois foi adicionado carbonato de césio (4,70 g, 14,4 mmol). O processo de vácuo-borbulhação foi repetido mais três vezes, depois a mistura resultante foi aquecida sob o gradiente térmico mostrado abaixo.

Depois de um tempo total de 5 h, a reacção foi deixada arrefecer até à temperatura ambiente e a mistura foi adicionada a água gelada (500 mL). O precipitado foi recolhido, lavado com água (300 mL), depois liofilizado para produzir um sólido amarelo (2,80 g). Este material foi dissolvido em clorofórmio (250 mL) filtrado através filtro de papel e evaporado para submeter a azeotropia a água restante. O precipitado amarelo residual (2,70 g, HPLC (214 nm)  $t_R$  = 7,26 (93,6%) min.) foi dissolvido parcialmente em clorofórmio (20 mL), a suspensão foi

sonicada durante 5 min, depois o sólido foi recolhido e seco ao ar para produzir 3-Z-benzilideno-6-[5"-(1,1-dimetilalil)-1*H*-imidazol-4"-Z-ilmetileno]-piperazina-2,5-diona (1,82 g, 54%) (Hayashi, Comunicação Pessoal (2001)), m. p. 239-240 (dec.).

HPLC (214 nm)  $t_R$  = 6,80 (1,92) min, 7,33 (95,01%).

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1, 53 (s, 6H); 5,18 (d,  $J$  = 17,6 Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,21 (d,  $J$  = 11,0 Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6,06 (dd,  $J$  = 17,6, 11,0 Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6,99 (s, 1H,  $-\text{C}-\text{C}=\text{CH}$ ); 7,00 (s, 1H,  $-\text{C}-\text{C}=\text{CH}$ ); 7,30-7,50 (m, 5 x ArH); 7,60 (s, H2"); 8,07 (bs, NH); 9,31 (bs, NH); 12,30 (bs, NH).

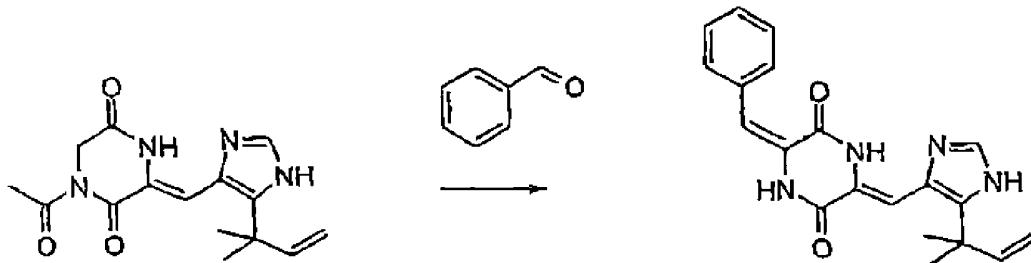
LC/MS  $t_R$  = 6,22 (349,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , isómero E), 6,73 (349,5  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 697,4  $[\text{2M}+\text{H}]^+$ , isómero Z) min.

ESMS m/z 349,5  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 390,3  $[\text{M}+\text{CH}_4\text{CN}]^+$ .

A evaporação da solução de clorofórmio produziu mais 3-Z-benzilideno-6-[5"-(1,1-dimetilalil)-1*H*-imidazol-4"-Z-ilmetileno]-piperazina-2,5-diona (0,76 g, 29%).

HPLC (214 nm)  $t_R$  = 7,29 (84,5%) min.

3-E-Benzilideno-6-[5''-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4''-Z-ilmetileno]-piperazina-2,5-diona



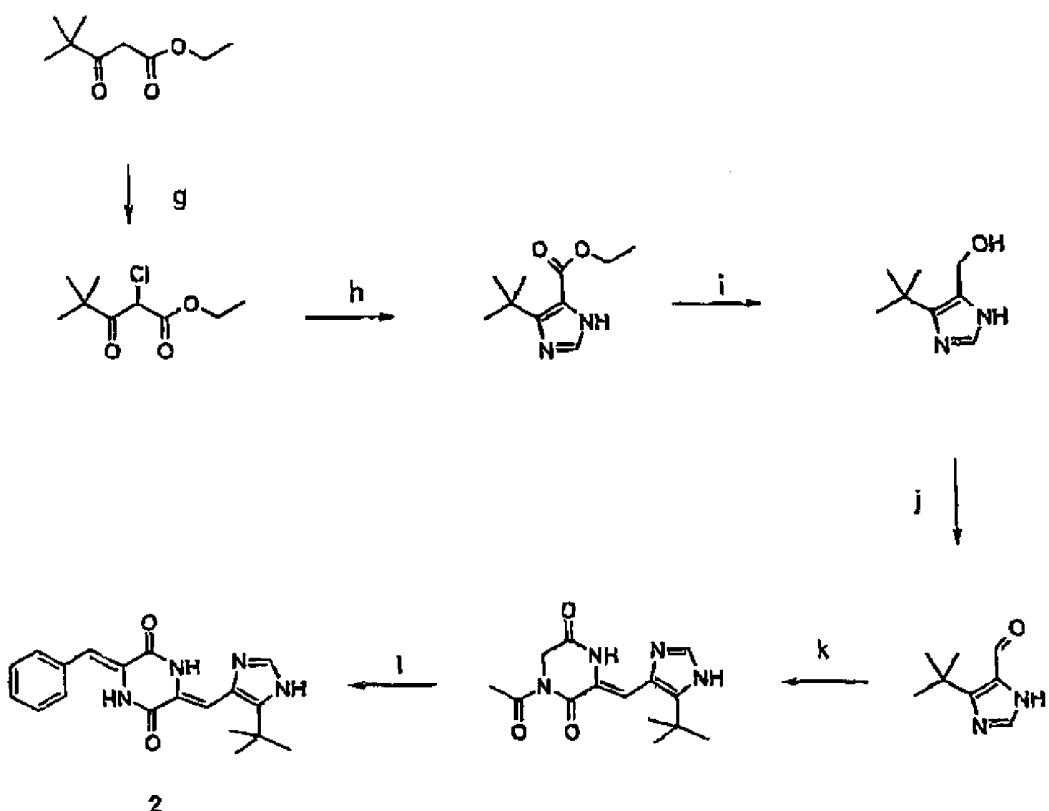
A purificação de HPLC preparativa de uma amostra bruta de material sintetizado como acima, produziu o isómero geométrico 3-E-Benzilideno-6-[5''-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4''-Z-ilmetileno]-piperazina-2,5-diona (1,7 mg).

HPLC (214 nm)  $t_R = 6,75$  (87, 79) min.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,52 (s, 6H); 5,19 (d,  $J = 20,8$  Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,22 (d,  $J = 14,0$  Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6,05 (dd,  $J = 18,0, 10,4$  Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6,33 (s, 1H, C-C=CH); 6,90-7,65 (m, 7H).

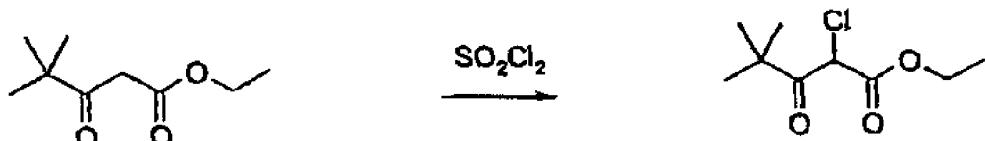
ESMS m/z 349,5  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 390,4  $[\text{M}+\text{CH}_4\text{CN}]^+$ .

Síntese de 3-*Z*-Benzilideno-6-(5"-terc-butil-1*H*-imidazol-4"-*Z*-ilmetileno)-piperazina-2,5-diona (2)



Reagentes: g)  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ ; h)  $\text{H}_2\text{NCHO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ; i)  $\text{LiAlH}_4$ ; j)  $\text{MnO}_2$ ; k) 1,4-diacetyl-piperazina-2,5-diona,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ; l) benzaldeído,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$

Éster etílico do ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxo-pantanóico



Foi adicionado cloreto de sulfuro (14,0 mL, 0,17 mol) a uma solução arrefecida ( $0^\circ$ ) de pivaloilacetato de etilo (27,17 g, 0,16 mol) em clorofórmio (100 mL). A mistura

resultante foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e foi agitada durante 30 min, após o que foi aquecida sob refluxo durante 2,5 h. Depois de arrefecer até à temperatura ambiente, a mistura da reacção foi diluída com clorofórmio, depois lavada com bicarbonato de sódio, água e depois solução salina.

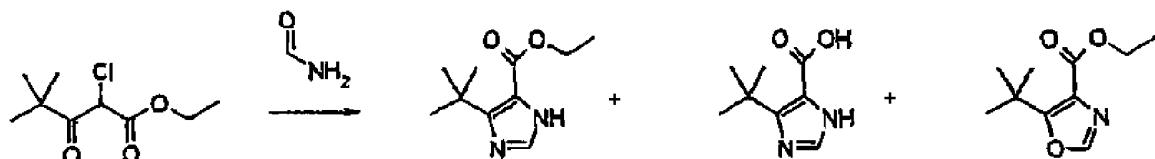
A fase orgânica foi seca e evaporada para produzir, como um óleo límpido, éster etílico do ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxopentanóico (33,1 g, 102%). (Durant *et al.*, "Aminoalkylimidazoles and Process for their Production", Patente GB N° 1341375 (Grã Bretanha, 1973)).

HPLC (214 nm)  $t_R = 8,80$  (92,9%) min.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,27 (s, 9H); 1,29 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H); 4,27 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2H); 5,22 (s, 1H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13,8, 26,3, 45,1, 54,5, 62,9, 165,1, 203,6.

*Éster etílico do ácido 5-terc-butil-3H-imidazol-4-carboxílico*



Uma solução de éster etílico do ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxo-pentanóico (25,0 g, 0,12 mol) em formamida (47,5 mL) e água (2,5 mL) foi agitada, depois dispensada em frasquinhos de

15 x 8 mL. Todos os frasquinhos foram selados e depois aquecidos a 150° durante 3,5 h. Os frasquinhos foram deixados arrefecer até à temperatura ambiente, depois foi adicionada água (20 mL) e a mistura foi exaustivamente extraída com clorofórmio. O clorofórmio foi removido para produzir uma solução de formamida concentrada (22,2 g) que foi adicionada a uma coluna de sílica (6 cm de diâmetro, 12 cm de altura) colocada em 1% de MeOH/1% de Et<sub>3</sub>N em clorofórmio. A eluição da coluna com 2,5 L desta mistura seguida por 1 L de 2% de MeOH/1% de Et<sub>3</sub>N em clorofórmio produziu, nas fracções iniciais, um produto suspeito de ser o éster etílico do ácido 5-terc-butil-oxazole-4-carboxílico (6,3 g, 26%).

HPLC (214 nm)  $t_R$  = 8,77 min.

RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,41 (t,  $J$  = 7,2 Hz, 3H); 1,43 (s, 9H); 4,40 (q,  $J$  = 7,2 Hz, 2H); 7,81 (s, 1H).

RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 14,1, 28,8, 32,5, 61,3, 136,9, 149,9, 156,4, 158,3.

ESMS m/z 198,3 [M+H]<sup>+</sup>, 239,3 [M+CH<sub>4</sub>CN]<sup>+</sup>.

LC/MS  $t_R$  = 7,97 (198,1 [M+H]<sup>+</sup>) min.

Foi recuperado de fracções posteriores o éster etílico do ácido 5-terc-butil-3H-imidazole-4-carboxílico (6,20 g, 26%). (Durant *et al.*, "Aminoalkylimidazoles and Process for their Production", Patente GB N° 1341375 (Grã Bretanha, 1973)).

HPLC (214 nm)  $t_R$  = 5,41 (93,7%) min.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,38 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H); 1,47 (s, 9H); 4,36 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2H); 7,54 (s, 1H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13,7, 28,8, 32,0, 59,8, 124,2, 133,3, 149,2, 162,6.

ESMS m/z 197,3 [M+H] $^+$ , 238,3 [M+CH<sub>4</sub>CN] $^+$ .

Eluição adicional da coluna com 1 L de 5% de MeOH/1% de Et<sub>3</sub>N produziu um composto suspeito de ser o ácido 5-terc-butil-3H-imidazole-4-carboxílico (0,50 g, 2%).

HPLC (245 nm)  $t_R = 4,68$  (83,1%) min.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  1,36 (s, 9H); 7,69 (s, 1H).

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,37 (s, 9H); 7,74 (s, 1H).

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, CD<sub>3</sub>SO)  $\delta$  1,28 (s, 9H); 7,68 (s, 1 H).

ESMS m/z 169,2 [M+H] $^+$ , 210,4 [M+CH<sub>4</sub>CN] $^+$ .

(5-terc-Butil-3H-imidazol-4-il)-metanol



Uma solução de éster etílico do ácido 5-terc-butil-3H-imidazole-4-carboxílico (3,30 g, 16,8 mmol) em THF (60 mL) foi

adicionada, gota a gota, a uma suspensão de hidreto de alumínio e lítio (suspensão a 95%, 0,89 g, 22,2 mmol) em THF (40 mL) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 3 h. Foi adicionada água até que libertação de gás cessar e a mistura foi agitada durante 10 min, depois foi filtrada por um funil sinterizado. O precipitado foi lavado com THF, depois com metanol, o filtrado e as lavagens foram combinados e evaporados. O resíduo foi liofilizado de um dia para o outro para produzir (5-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-metanol como um sólido branco (2,71 g, 105%). (Durant *et al.*, "Aminoalkylimidazoles and Process for their Production", Patente GB N° 1341375 (Grã Bretanha, 1973)).

HPLC (240 nm)  $t_R$  = 3,70 (67,4%) min.

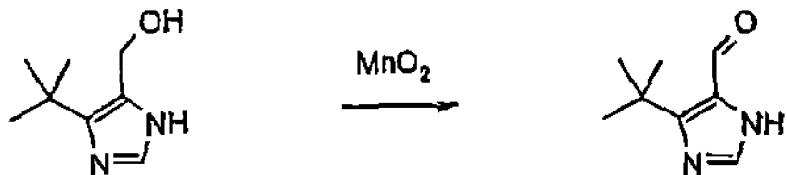
RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1,36 (s, 9H); 4,62 (s, 2H); 7,43 (s, 1H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  31,1, 33,0, 57,9, 131,4, 133,9, 140,8.

LC/MS  $t_R$  = 3,41 (155,2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) min.

Este material foi utilizado sem mais purificação.

5-*terc*-Butil-3*H*-imidazole-4-carbaldeído



Foi adicionado dióxido de manganês (30 g, 0,35 mol) a uma solução heterogénea de (5-*terc*-butil-3*H*-imidazol-4-il)-metanol (4,97 g, 0,03 mol) em acetona (700 mL) e a mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 4 h. A mistura foi filtrada através de uma almofada de Celite e a almofada foi lavada com acetona. O filtrado e as lavagens foram combinados e evaporados. O resíduo foi triturado com éter para produzir, como um sólido incolor, 5-*terc*-butil-3*H*-imidazole-4-carbaldeído (2,50 g, 51%). (Hayashi, Comunicação Pessoal (2000)).

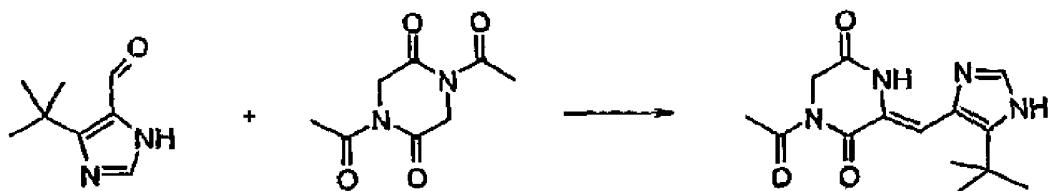
HPLC (240 nm)  $t_R$  = 3,71 (89,3%) min.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1, 48 (s, 9H); 7,67 (s, 1H); 10,06 (s, 1H).

LC/MS  $t_R$  = 3,38 (153,2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) min.

A evaporação do filtrado da trituração produziu mais 5-*terc*-butil-3*H*-imidazole-4-carbaldeído (1,88 g, 38%).

*1-Acetyl-3-(5'-tert-butyl-1H-imidazol-4'-Z-ilmetileno)-piperazina-2,5-diona*



A uma solução de 5-terc-butil-3*H*-imidazole-4-carbaldeído (2,50 g, 164,4 mmol) em DMF (50 mL) foi adicionada 1,4-diacetil-piperazina-2,5-diona (6,50 g, 32,8 mmol) e a solução foi submetida a vácuo, depois borbulhada com árgon. O processo de vácuo-borbulhação foi repetido mais duas vezes, depois foi adicionado carbonato de césio (5,35 g, 16,4 mmol). O processo de vácuo-borbulhação foi repetido mais três vezes, depois a mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 5 h. A mistura da reacção foi evaporada parcialmente (calor e alto vácuo) até que um pequeno volume permaneceu e a solução resultante foi adicionada, gota a gota, a água (100 mL). O precipitado amarelo foi recolhido, depois liofilizado para produzir 1-acetyl-3-(5'-terc-butil-1*H*-imidazol-4'-Z-ilmetileno)-piperazina-2,5-diona (2,24 g, 47%). (Hayashi, Comunicação Pessoal (2000)).

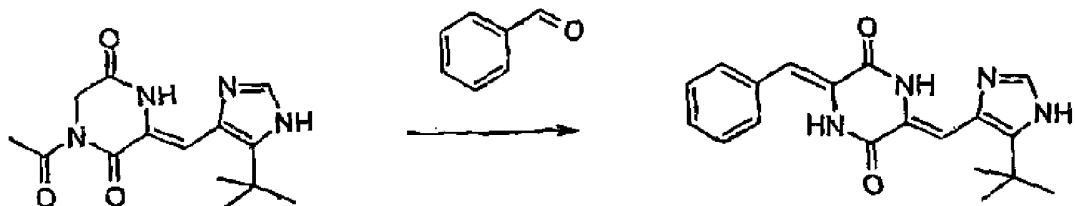
HPLC (214 nm) TR = 5,54 (94,4%) min.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,47 (s, 9H); 2,65 (s, 3H), 4,47 (s, 2H); 7,19 (s, 1H); 7,57 (s, 1H), 9,26 (s, 1H), 12,14 (s, 1H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  27,3, 30,8, 32,1, 46,5, 110,0, 123,2, 131,4, 133,2, 141,7, 160,7, 162,8, 173,0

LC/MS  $t_R = 5,16$  (291,2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 581,6  $[\text{2M}+\text{H}]^+$ ) min

*3-Z-Benzilideno-6-(5"-terc-butil-1H-imidazol-4"-Z-ilmetileno)-piperazina-2,5-diona*



A uma solução de 1-acetil-3-(5'-terc-butil-1H-imidazol-4'-Z-ilmetileno)-piperazina-2,5-diona (2,43 g, 8,37 mmol) em DMF (55 mL) foi adicionado benzaldeído (4,26 mL, 41,9 mmol) e a solução foi submetida a vácuo, depois borbulhada com azoto. O processo de vácuo-borbulhação foi repetido mais duas vezes, depois foi adicionado carbonato de césio (4,09 g, 12,6 mmol). O processo de vácuo-borbulhação foi repetido mais três vezes, depois a mistura resultante foi aquecida sob o gradiente térmico como mostrado abaixo. Depois de um tempo total de 5 h, a reacção foi deixada arrefecer até à temperatura ambiente e a mistura foi adicionado a água gelada (400 mL). O precipitado foi recolhido, lavado com água, depois liofilizado para produzir um sólido amarelo (2,57 g, HPLC (214 nm)  $t_R = 6,83$  (83,1%) min.). Este material foi dissolvido em clorofórmio (100 mL) e evaporado para submeter a azeotropia a água restante, resultando num óleo castanho. Isto foi dissolvido em clorofórmio (20 mL) e arrefecido em gelo. Depois de 90 min, o precipitado amarelo foi

recolhido e seco ao ar para produzir 3-Z-benzilideno-6-(5"-terc-butil-1H-imidazol-4"-Z-ilmetileno)-piperazina-2,5-diona (1,59 g, 56%). (Hayashi, Comunicação Pessoal (2000)).

HPLC (214 nm)  $t_R$  = 6,38 (2,1%), 6,80 (95,2) min

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,46 (s, 9H); 7,01 (s, 1H,  $-C-C=CH$ ); 7,03 (s, 1H,  $-C-C=CH$ ); 7,30-7,50 (m, 5H, AR); 7,60 (s, 1H); 8,09 (bs, NH); 9,51 (bs, NH); 12,40 (bs, NH).

LC/MS  $t_R$  = 5,84 (337,4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , isómero E), 6,25 (337,4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 673,4  $[\text{2M}+\text{H}]^+$ , isómero Z) min.

ESMS m/z 337,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 378,1  $[\text{M}+\text{CH}_4\text{CN}]^+$

A evaporação da solução de clorofórmio produziu 3-Z-benzilideno-6-(5"-terc-butil-1H-imidazol-4"-Z-ilmetileno)-piperazina-2,5-diona (0,82 g, 29%). HPLC (214 nm)  $t_R$  = 6,82 (70,6%) min.

### *Experiências Gerais*

O bicarbonato de sódio refere-se a uma solução a 5%.

Os solventes orgânicos foram secos sobre sulfato de sódio, salvo referência em contrário.

## *Condições Analíticas*

### **Condições de RMN**

A análise de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) foi realizada num instrumento de RMN Varian Inova Unity 400 MHz. As amostras foram processadas em clorofórmio deuterado contendo 0,1% de TMS (salvo especificação em contrário). Os desvios químicos (ppm) são referenciadas com relação a TMS (0,00 ppm) ou  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 3,30 ppm para amostras processadas em  $\text{CD}_3\text{OD}$ . As constantes de acoplamento são expressas em hertz (Hz).

### **Condições de HPLC Analítica**

Condições do sistema 6:

A RP-HPLC foi realizada numa coluna Rainin Microsorb-MV C18 (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ) de 50 x 4,6 mm.

Tampão A: 0,1% de TFA aquoso

Tampão B: 0,1% de TFA em 90% de MeCN aquoso

Gradiente: 0-100% de Tampão B durante 11 min

Caudal: 1,5 mL/min

### **Condições de LCMS**

As LCMS foram processadas num instrumento Perkin-Elmer Sciex API-100

Condições de LC:

Análise HPLC de fase reversa

Coluna: Monitor 5 µm C18 50 x 4,6 mm  
Solvante A: 0,1% de TFA em água  
Solvante B: 085% de TFA em 90% de MeCN aquoso  
Gradiente: 0-100% de B durante 11,0 min  
Caudal: 1,5 mL/min  
Comprimento de onda: 214 nm

Condições de MS:

Fonte de iões: spray de iões  
Detecção: contagem de iões  
Caudal para o espectrómetro de massa: 300 µL/min após divisão da coluna (1,5 mL/min).

### **Condições de ESMS**

A ESMS foi realizada num Perkin Elmer/Sciex-API III LC/MS/MS utilizando uma entrada de electrospray.

Solvante: 0,1% de AcOH em 60% de MeCN aquoso  
Caudal: 25 µL/min  
Spray de iões: 5000 V  
Placa de orifício: 55 V  
Tempo de aquisição: 2.30 min  
Gama de varrimento: 100-1000 amu/z  
Tamanho do passo de varrimento: 0,2 amu/z

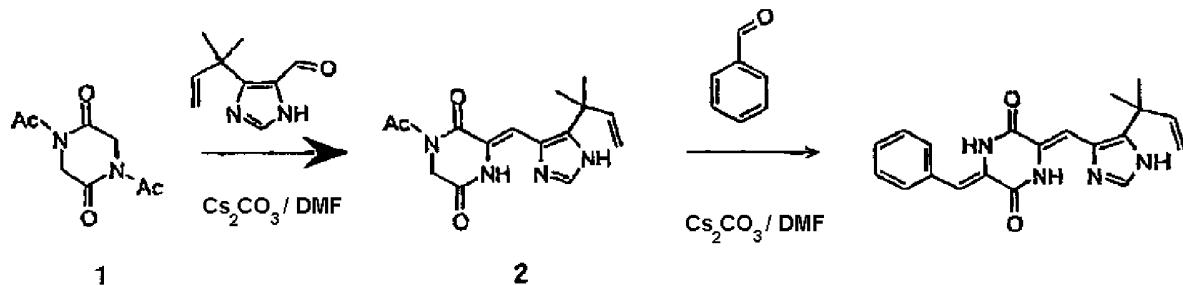
### **Condições de Purificação de RP-HPLC Preparativa**

A purificação DE HPLC de fase reversa foi realizada utilizando Nebula com a coluna Waters XterraMS (19 x 50 mm, 5  $\mu$ m, C18) utilizando as seguintes condições:

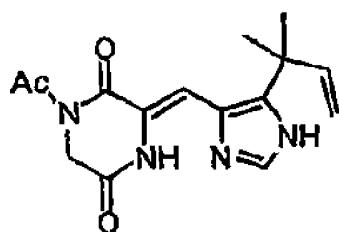
Solvante A: 0,1% de TFA aquoso  
Solvante B: 0,1% de TFA em 90% de MeCN aquoso  
Gradiente: 5-95% de B durante 4 min  
Caudal: 20 mL/min  
Comprimento de onda: 214 nm

As abreviações são como se seguem: br s: singuleto largo; BuLi: n-butil-lítio; d: duplo; DBU: 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno; ESMS: espectrometria de massa de electrospray; HCl: ácido clorídrico; HPLC: cromatografia líquida de elevado desempenho; LCMS: espectrometria de massa por cromatografia líquida; LD: diisopropilamida de lítio; M+: ião molecular; m: multiplet; MeCN: acetonitrilo; M: espectrometria de massa; MW: peso molecular; RMN: ressonância magnética nuclear; q: quarteto; s: singuleto; : triplete;  $t_R$ : tempo de retenção; TFA: ácido trifluoroacético; THF: tetra-hidrofuran.

Processo Detalhado para a Síntese de Desidrofenila-histina



**1-Acetil-3-{(Z)-1-[5-(1,1-dimetil-2-propenil)-1H-4-imidazolil]metilideno]-2,5-piperazinodiona (2)}**



A uma solução de 5-(1,1-dimetil-2-propenil)imidazole-4-carboxaldeído (100 mg, 0,609 mmol) em DMF (2 mL) foi adicionado o composto 1 (241 mg, 1,22 mmol) e a solução foi submetida a vácuo, repetidamente, num curto período de tempo para remover oxigénio e borbulhada com árgon, seguida pela adição de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (198 mg, 0,609 mmol) e o processo de vácuo-borbulhação foi novamente repetido. A remoção de oxigénio é preferida porque se acredita que tal remoção diminui a oxidação do carbono alfa na posição 6 do anel de dicetopiperazina. A mistura resultante foi agitada durante 5 h à temperatura ambiente. Depois do solvente ser removido por evaporação, o resíduo foi dissolvido na mistura de EtOAc e 10% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e a fase orgânica foi lavada novamente com 10% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{NaCl}$  saturado por três vezes, seca sobre

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  e concentrada *in vacuo*. O óleo residual foi purificado através de cromatografia de coluna em sílica utilizando  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  de (100:0 a 50:1) como um eluente para produzir 60 mg (33%) de um sólido 2 amarelo pálido.

#### Desidrofenila-histina

A uma solução de 2 (30 mg, 0,099 mmol) em DMF (0,8 mL) foi adicionado benzaldeído (51  $\mu\text{L}$ , 0,496 mmol, 5 eq) e a solução foi submetida a vácuo, repetidamente, num curto período de tempo para remover oxigénio e borbulhada com árgon, seguido pela adição de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (53 mg, 0,149 mmol, 1,5 eq) e o processo de vácuo-borbulhação foi novamente repetido. A mistura resultante foi aquecida durante 2,5 h a 80 °C. (A temperatura deve ser aumentada lentamente. Aquecimento rápido aumenta a produção de isómero-E na unidade de benzilideno.) Depois do solvente ser removido por evaporação, o resíduo foi dissolvido em EtOAc, lavado com água por duas vezes e NaCl saturado por três vezes, seco sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrado *in vacuo*. Com TLC utilizando  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (10:1), pode-se observar uma mancha com luminescência verde-amarela brilhante a UV de 365 nm. A pureza deste produto bruto foi de mais de 75% na análise de HPLC. O resíduo resultante foi dissolvido em 90% de MeOH aquoso e aplicado à coluna HPLC de fase reversa (YMC-Pack, ODS-AM, 20 x 250 mm) e eluído utilizando um gradiente linear de 70 a 74% de MeOH em água durante 16 min a um caudal de 12 mL/min e a fração desejada foi recolhida e concentrada por evaporação para produzir 19,7 mg (60%) de desidrofenila-histina de cor amarela, embora os rendimentos não estejam optimizados para cada passo.

## EXEMPLO 4

### Características biológicas da Desidrofenila-histina e Análogos da Desidrofenila-histina

#### A. Avaliação biológica

As características biológicas de tBu-desidrofenila-histina e desidrofenila-histina sintetizadas foram avaliadas tanto em células de cólon humano HT-29 como em células de adenocarcinoma prostático PC-3.

HT-29 (ATCC HTB-38), um adenocarcinoma colorretal humano, foi mantido em meio de McCoy completo (meio de McCoy 5A com L-glutamina e 25 mM de HEPES suplementado com 10% de FBS, 1 mM de piruvato de Na, 1X NEAA, 2 mM de L-glutamina e Pen/Strep a 100 IU/mL e 1000 g/mL, respectivamente). PC-3 (ATCC CRL-1435), um adenocarcinoma de próstata humana, foi mantido em meio F12K completo (meio F12K suplementado com 10% de FBS; 2 mM de glutamina; 1% de HEPES; e Pen/Strep a 100 IU/mL e 1000 g/mL, respectivamente). As linhas celulares foram cultivadas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> numa incubadora com 95% de humidade.

Para ensaios de citotoxicidade de tumores, as células HT-29 ou PC-3 foram inoculadas a 5000 células/poço em 90 mL de meio completo numa placa de cultura de tecidos Corning 3904 de fundo claro e paredes pretas, e a placa foi incubada de um dia para o outro para permitir que as células estabelecessem e entrassem em fase de crescimento logarítmico. Foram preparadas soluções stock a 20 mM de tBu-desidrofenila-histina e desidrofenila-histina em 100% de DMSO e armazenadas a -20 °C. Foram preparadas diluições em série 10X concentradas dos dois compostos num meio de cultura

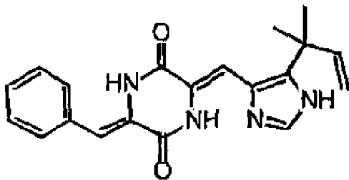
apropriado para concentrações finais numa gama de  $20 \times 10^{-5}$  M até  $20 \times 10^{-10}$  M. Foram adicionadas volumes de dez  $\mu\text{L}$  das diluições em série 10X aos poços de teste em triplicado e as placas voltaram à incubadora durante 48 horas. A concentração final de DMSO foi de 0,25% em todas as amostras.

Após 48 horas de exposição ao fármaco, foi adicionado a cada poço 10 de 0,2 mg/mL de resazurina (obtida da Sigma-Aldrich Chemical Co.) em PBS livre de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e as placas foram retornadas à incubadora durante 3-4 horas. As placas foram removidas e a fluorescência da resazurina foi medida utilizando filtros de 530 nm de excitação e 590 nm de emissão num fluorímetro Fusion (Packard Instruments). O corante resazurina sem células foi utilizado para determinar o ruído de fundo que foi subtraído dos dados para todos os poços da experiência. Os dados foram analisados utilizando software Prism (GraphPad Software). Os dados foram normalizados para a média das células tratadas somente com meio (100% de crescimento celular) e foram determinados os valores de  $\text{EC}_{50}$  utilizando um algoritmo de ajuste à curva de resposta à dose sigmoidal padrão.

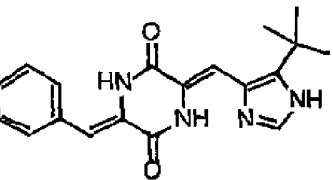
Como indicado na Tabela 1 abaixo, a tBu-desidrofenila-histina demonstra 4 vezes maior actividade citotóxica em comparação com a desidrofenila-histina.

**Tabela 1.** Efeito Citotóxico da desidrofenila-histina e derivado.

---



Desidrofenila-histina



tBu-desidrofenila-histina

---

célula	EC <sub>50</sub> (nM)	
	ΔPLH	tBu-ΔPLH
HT-29	48	13
PC-3	5,4	1,0

---

B. Estudo da Estrutura e Actividade dos Derivados da Desidrofenila-histina

Os efeitos citotóxicos da fenila-histina, desidrofenila-histina e diversos derivados da desidrofenila-histina foram examinados em células P388 de leucemia de murino, células HT-29 de cólon humano e células PC-3 de adenocarcinoma prostático.

Como explicado acima, HT-29 um adenocarcinoma colorretal humano foi mantido em meio de McCoy completo (meio de McCoy 5A com L-glutamina e 25 mM de HEPES suplementado com 10% de FBS, 1 mM de piruvato Na, 1X NEAA, 2 mM de L-glutamina, e Pen/Strep a 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente). PC-3, um adenocarcinoma de próstata humana foi mantido em meio F12K completo (meio F12K suplementado com 10% de FBS; 2 mM de glutamina; 1% de HEPES; e Pen/Strep a 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente). As linhas

celulares foram cultivadas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> numa incubadora com 95% de humidade.

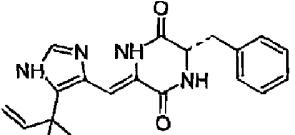
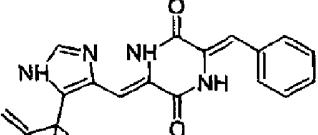
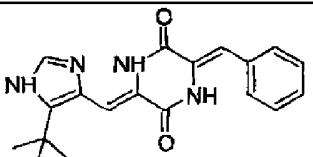
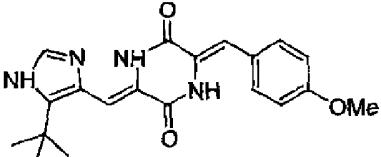
Para os ensaios de citotoxicidade de tumores, foram inoculadas células HT-29 ou PC-3 a 5000 células/poço em 90 µL de meio completo numa placa de cultura de tecidos Corning 3904 de fundo claro e paredes pretas, e a placa foi incubada de um dia para o outro para permitir que as células estabelecessem e entrassem em fase de crescimento logarítmico. Foram preparadas soluções stock a 20 mM de tBu-desidrofenila-histina e desidrofenila-histina em 100% de DMSO e armazenadas a -20 °C. Foram preparadas diluições em série 10X concentradas dos dois compostos num meio de cultura apropriado para concentrações finais numa gama de  $20 \times 10^{-5}$  M até  $20 \times 10^{-10}$  M. Foram adicionadas volumes de dez µL das diluições em série 10X aos poços de teste em triplicado e as placas voltaram à incubadora durante 48 horas. A concentração final de DMSO foi de 0,25% em todas as amostras.

Após 48 horas de exposição ao fármaco, foi adicionado a cada poço 10 µL de 0,2 mg/mL de resazurina (obtida da Sigma-Aldrich Chemical Co.) em PBS livre de Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e as placas foram retornadas à incubadora durante 3-4 horas. As placas foram removidas e a fluorescência da resazurina foi medida utilizando filtros de 530 nm de excitação e 590 nm de emissão num fluorímetro Fusion (Packard Instruments). O corante resazurina sem células foi utilizado para determinar o ruído de fundo que foi subtraído dos dados para todos os poços da experiência. Os dados foram analisados utilizando software Prism (GraphPad Software). Os dados foram normalizados para a média das células tratadas somente com meio (100% de crescimento celular) e foram

determinados os valores de EC<sub>50</sub> utilizando um algoritmo de ajuste à curva de resposta à dose sigmoidal padrão.

Os valores EC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> de fenila-histina, desidrofenila-histina e derivados de desidrofenila-histina estão resumidos na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2 - Estudo SAR da fenila-histina ou desidrofenila-histina e de derivados de desidrofenila-histina

COMPOSTOS	ESTRUTURA	EC <sub>50</sub> (nM)		IC <sub>50</sub> (nM)
		HT-29	PC-3	P-388
(-)-fenila-histina		1600	n.t.	833 ± 153 (n=5)
KPU-1 □PLH		48	4,7	36 ± 12,8 (n=5)
KPU-2 tBu-□PLH		13		31,8 ± 5,0 (n=5)
KPU-6 tBu-□PLH-p-OMe		> 2000	n.t.	9333 ± 5457 (n=3)

(continuação)

COMPOSTOS	ESTRUTURA	EC <sub>50</sub> (nM)		IC <sub>50</sub> (nM)
		HT-29	PC-3	P-388
KPU-8 tBu-□PLH-o-OMe		89		315 ± 137 (n=4)
KPU-9 tBu-□PLH-M-OMe		31		20,8 ± 68 (n=4)
Colchicina	-			208 ± 68 (n=4)

Modificações do anel de fenilo têm um efeito significativo nas actividades citotóxicas. Em comparação com a actividade da tBu-desidrofenila-histina (Nº6), a actividade do grupo metoxilo na meta-posição (KPU-9) apresentou actividade mais alta que os outros derivados, com um IC<sub>50</sub> de 20,8 ± 3,3 nM em células P388. O derivado de KPU-9 também apresentou citotoxicidade em células HT-29 (EC<sub>50</sub> 31 nm). Desidrofenila-histina, tBu-desidrofenila-histina (KPU-2) e o derivado KPU-9 apresentaram, todos, citotoxicidade em células P388.

#### C. Estudo da Estrutura e Actividade de Derivados da Desidrofenila-histina Adicionais

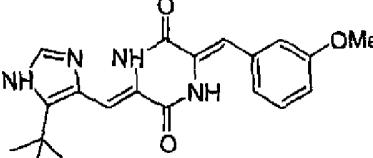
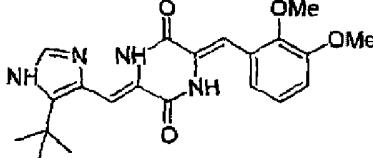
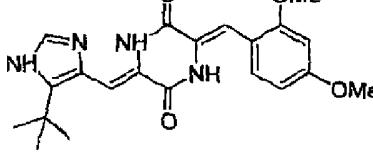
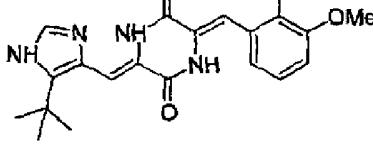
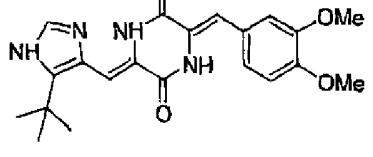
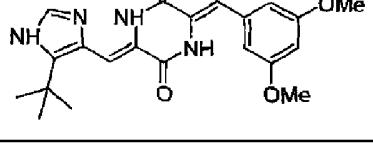
Os efeitos citotóxicos da fenila-histina, desidrofenila-histina e diversos derivados da desidrofenila-histina adicionais foram examinados em células de cólon humano HT-29 e células de

adenocarcinoma prostático PC-3 utilizando a metodologia acima descrita.

**Tabela 3.** Estudo SAR da fenila-histina, desidrofenila-histina e de derivados de desidrofenila-histina adicionais

COMPOSTOS	ESTRUTURA	FORMA SALINA	P. M.	EC <sub>50</sub> (nM)	
				HT-	PC-3
(-)-fenila-histina		-	350, 41	1600	n.t.
KPU-1 □PLH		-	348, 40	48	4, 7
KPU-2 tBu-□PLH		-	336, 39	13	1
KPU-6 tBu-□PLH-p-OMe		-	366, 41	> 2000	n.t.
KPU-8 tBu-□PLH-o-OMe		-	366, 41	89	

(continuação)

COMPOSTOS	ESTRUTURA	FORMA SALINA	P. M.	EC <sub>50</sub> (nM)	
				HT- <b>29</b>	PC-3
KPU-9 tBu-□PLH-M-OMe		-	366, 41	31	
KPU-14 tBu-□PLH-m-OMe		TFA	396, 44 510, 46 (+TFA)	610	96%
KPU-12 tBu-□PLH-2, 4- diOMe		-	396, 44	4980	
KPU-10 tBu-□PLH-2, 5- diOMe		-	396, 44	1350	
KPU-15 tBu-□PLH-2, 6- diOMe		TFA	396, 44 510, 46 (+TFA)	4430	96%
KPU-13 tBu-□PLH-3, 4- diOMe		-	396, 44	2130	
KPU-16 tBu-□PLH-3, 5- diOMe		-	396, 44	42	82%

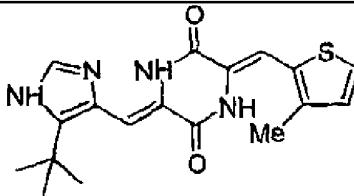
(continuação)

COMPOSTOS	ESTRUTURA	FORMA SALINA	P. M.	EC <sub>50</sub> (nM)	
				HT-	PC-3
KPU-11 tBu-□PLH- 3, 4, 5-triOMe		-	426, 47	> 20 μM	
KPU-17 tBu-□PLH- 2, 3, 4-triOMe		TFA	426, 47 540, 49 (+TFA)	4060	94%
KPU-18 tBu-□PLH-o-Cl		TFA	370, 83 484, 86 (+TFA)	42	100%
KPU-19 tBu-□PLH-m-Cl		TFA	370, 83 484, 86 (+TFA)	20	98%
KPU-20 tBu-□PLH-p-Cl		TFA	370, 83 484, 86 (+TFA)	545	
KPU-21 tBu-□PLH-2Cl- 5-NO <sub>2</sub>		TFA	416, 83 529, 85 (+TFA)	51	100%
KPU-22 tBu-□PLH-3, 4- metileno- dioxilo		TFA	380, 40 494, 42 (+TFA)	62	95%

(continuação)

COMPOSTOS	ESTRUTURA	FORMA SALINA	P. M.	EC <sub>50</sub> (nM)	
				HT-	PC-3
KPU-23 tBu-□PLH-2-OH- 3-Ome (o- vanilina)		TFA	382, 41 496, 44 (+TFA)	5870	86%
KPU-24 tBu-□PLH- ciclizado-3- MeO		TFA	364, 40 487, 42 (+TFA)	7040	100%
KPU-25 tBu-□PLH-4- piridilo		TFA	337, 38 565, 42 (+2TFA)	544	96%
KPU-28 tBu-□PLH-2- piridilo		TFA	337, 38 565, 42 (+2TFA)	> 20 μM	99%
KPU-26 tBu-□PLH-2- furilo		TFA	326, 35 440, 37 (+TFA)	600	88%
KPU-27 tBu-□PLH-5-Me- 2-tienilo		TFA	356, 44 470, 47 (+TFA)	80	97%

(continuação)

COMPOSTOS	ESTRUTURA	FORMA SALINA	P. M.	EC <sub>50</sub> (nM)	
				HT-	PC-3
KPU-29 tBu-□PLH-3-Me- 2-tienilo		TFA	356, 44 470, 47 (+TFA)	44	81%

#### EXEMPLO 5

##### Outros Análogos da Desidrofenila-histina

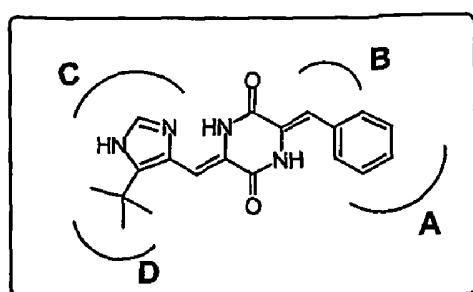
##### A. Modificações para a síntese de derivados de desidrofenila-histina

Outros derivados da desidrofenila-histina são sintetizados utilizando as técnicas anteriores, isoladas ou em conjunto com outras técnicas de síntese orgânica bem conhecidas.

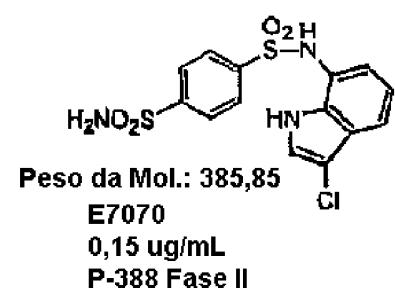
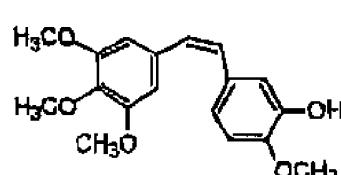
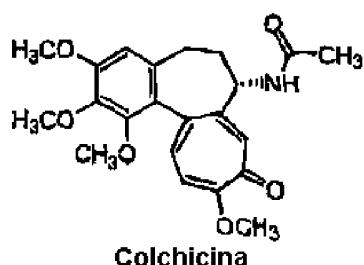
As modificações na diacildicetopiperazina e no primeiro e segundo aldeídos envolvidos no método de síntese variam de acordo com o derivado desejado a produzir. São sintetizados derivados que:

- A) modifiquem o anel de fenilo e/ou introduzam outros sistemas de anel aromático;
- B) alterem a posição do anel aromático;
- C) alterem o sistema de anel aromático de imidazole, e/ou
- D) modifiquem a posição 5 no anel de imidazole.

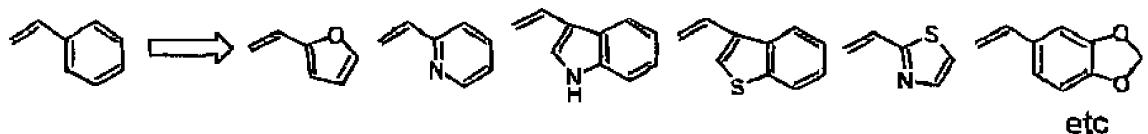
A figura abaixo mostra regiões do composto de desidrofenila-histina modificado para produzir derivados de desidrofenila-histina. São divulgados exemplos não-limitativos das modificações e, baseado nesta divulgação, devem ser entendidos pelos especialistas na técnica.



**A** 1) Modificação do anel de fenilo baseado na estrutura de compostos antitubulina conhecidos Alquilo, Halogéneo, Alcoxilo, Acetilo, Sulfonamida, Amina, Hidroxilo, Nitro, etc.



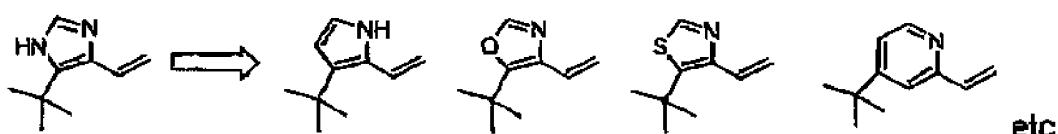
2) Introdução de outros sistemas de anel aromático



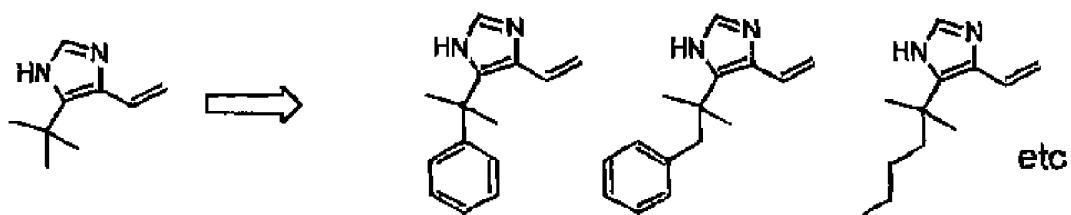
**B** Posição do anel aromático



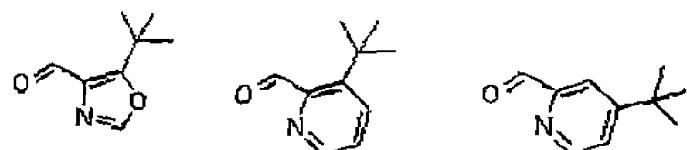
**C** Mudança para os outros sistemas de anel



**D** Modificação adicional da posição 5 no anel de imidazolo



Expandindo nas modificações anteriores para o composto de desidrofenila-histina, os derivados do composto podem incluir as seguintes substituições no anel de fenilo (**A**) :  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$  ( $-\text{SO}_2\text{NR}_1\text{R}_2$ ),  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{CONH}_2$  ( $-\text{CONR}_1\text{R}_2$ ),  $-\text{COOH}$ , etc. Outros sistemas de anel (**C**) também pode incluir o seguinte:



B. Exemplos de derivados de desidrofenila-histina sintetizados

Exemplos adicionais de derivados sintetizados da desidrofenila-histina são divulgados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Derivados adicionais de desidrofenila-histina sintetizados

COMPOSTOS	ESTRUTURA	FORMA SALINA	P. M.
KPU-20 tBu- $\square$ PLH-p-Cl		TFA	370,83 484,86 (+TFA)
KPU-30 tBu- $\square$ PLH-2,3-metilenodioxilo		TFA	380,40 494,42 (+TFA)
KPU-31 tBu- $\square$ PLH-3-piridilo		2TFA	337,38 565,42 (+2TFA)
KPU-32 tBu- $\square$ PLH-o-Me		TFA	350,41 464,44 (+TFA)

(continuação)

COMPOSTOS	ESTRUTURA	FORMA SALINA	P. M.
KPU-33 tBu- $\square$ PLH-Me- 2-piridilo		2TFA	351, 40 579, 45 (+2TFA)
KPU-34 tBu- $\square$ PLH-4-F		TFA	354, 38 468, 40 (+TFA)
KPU-35 tBu- $\square$ PLH-m-F		TFA	354, 38 468, 40 (+TFA)
KPU-36 tBu- $\square$ PLH-5- Me-4-im		2TFA	356, 42 584, 47 (+2TFA)
KPU-37 tBu- $\square$ PLH-o-F		TFA	354, 38 468, 40 (+TFA)
KPU-38 tBu- $\square$ PLH-m- Me		TFA	350, 41 464, 44 (+TFA)
KPU-39 tBu- $\square$ PLH-p- Me		TFA	350, 41 464, 44 (+TFA)

(continuação)

COMPOSTOS	ESTRUTURA	FORMA SALINA	P. M.
KPU-40 tBu-□PLH-p- Br		TFA	415, 28 529, 31 (+TFA)
KPU-41 tBu-□PLH-m- Br		TFA	415, 28 529, 31 (+TFA)
KPU-42 tBu-□PLH-3- tienilo		TFA	342, 42 456, 44 (+TFA)
KPU-43 tBu-□PLH-p- CN		TFA	361, 40 475, 42 (+TFA)
KPU-44 tBu-□PLH-m- EtO		TFA	380, 44 494, 46 (+TFA)
KPU-45 tBu-□PLH- 2,4,5-TriOMe		TFA	426, 47 540, 49 (+TFA)
KPU-46 tBu-□PLH-o- NO2		TFA	381, 39 495, 41 (+TFA)

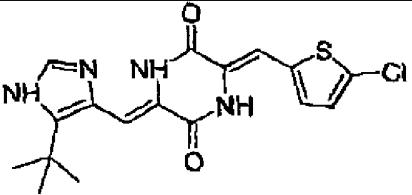
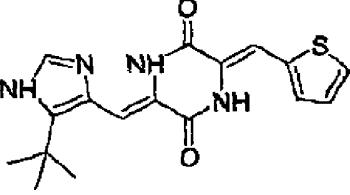
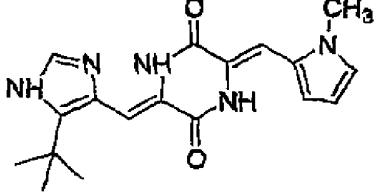
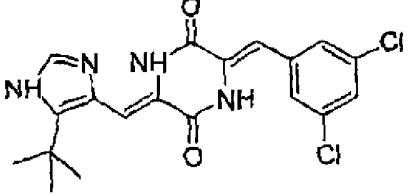
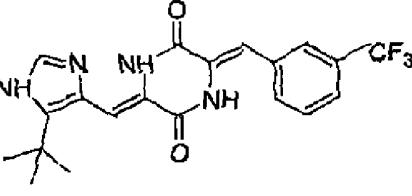
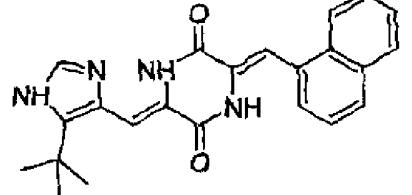
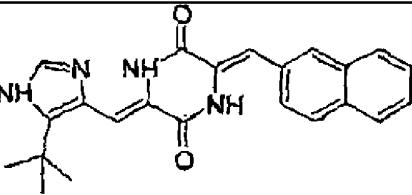
(continuação)

COMPOSTOS	ESTRUTURA	FORMA SALINA	P. M.
KPU-47 tBu-□PLH-m- NO <sub>2</sub>		TFA	381, 39 495, 41 (+TFA)
KPU-48 tBu-□PLH-p- NO <sub>2</sub>		TFA	381, 39 495, 41 (+TFA)
KPU-49 tBu-□PLH-m- CN		TFA	361, 40 475, 42 (+TFA)
KPU-50 tBu-□PLH-o- Br		TFA	415, 28 529, 31 (+TFA)
KPU-51 tBu-□PLH-m- OH		TFA	352, 39 466, 41 (+TFA)
KPU-52 tBu-□PLH-2- NO <sub>2</sub> -5-Cl		TFA	415, 83 529, 85 (+TFA)
KPU-53 tBu-□PLH-o- OH		TFA	352, 39 466, 41 (+TFA)

(continuação)

COMPOSTOS	ESTRUTURA	FORMA SALINA	P. M.
KPU-54 tBu- $\square$ PLH-2- OH-5-OMe		TFA	382, 41 496, 44 (+TFA)
KPU-55 tBu- $\square$ PLH-3- furanilo		TFA	326, 35 440, 37 (+TFA)
KPU-56 tBu- $\square$ PLH-2- OH-5-Br		TFA	431, 28 545, 31 (+TFA)
KPU-57 tBu- $\square$ PLH-2- OH-4-OMe		TFA	382, 41 496, 44 (+TFA)
KPU-58 tBu- $\square$ PLH-2- OH-4-OMe		TFA	382, 41 496, 44 (+TFA)
KPU-59 tBu- $\square$ PLH-2- OH-5-Cl		TFA	386, 83 500, 86 (+TFA)
KPU-60 tBu- $\square$ PLH-5- Me-2- furanilo		TFA	340, 38 454, 40 (+TFA)

(continuação)

COMPOSTOS	ESTRUTURA	FORMA SALINA	P. M.
KPU-61 tBu-□PLH-5- Cl-2-tionilo		TFA	376, 86 490, 88 (+TFA)
KPU-62 tBu-□PLH-2- tionilo		TFA	342, 42 456, 44 (+TFA)
KPU-63 tBu-□PLH-N- Me-2-pirrole		TFA	339, 39 463, 42 (+TFA)
KPU-64 tBu-□PLH- 3,5-diCl		TFA	405, 27
KPU-65 tBu-□PLH-m- CF <sub>3</sub>		TFA	404, 39
KPU-66 tBu-□PLH-1- Naftaleno		TFA	386, 44
KPU-67 tBu-□PLH-2- Naftaleno		TFA	386, 44

(continuação)

COMPOSTOS	ESTRUTURA	FORMA SALINA	P. M.
KPU-68 tBu-□PLH- 2,3-diCl		TFA	405,27
KPU-69 tBu-□PLH-m- Vinilo		TFA	362,42
KPU-77 tBu-□PLH-2- F-5-1		TFA	480,28
KPU-79 tBu-□PLH-2- (Metiltio)		TFA	368,45
KPU-80 tBu-□PLH-m- OCF <sub>3</sub>		TFA	420,38
KPU-81 tBu-□PLH-2- F-5-OMe		TFA	384,38
KPU-82 tBu-□PLH-4- F-3-OMe		TFA	384,38

(continuação)

COMPOSTOS	ESTRUTURA	FORMA SALINA	P. M.
KPU-83 tBu-□PLH-2- OH-5-tBu		TFA	408,39
KPU-84 tBu-□PLH- ciclo-hexano		TFA	341,39
KPU-86 tBu-□PLH-2- Me-3-F		TFA	368,39
KPU-87 tBu-□PLH-2- F-5-Me		TFA	368,39
KPU-88 tBu-□PLH-2- Cl-6-F		TFA	388,83
KPU-89 tBu-□PLH- 2,5-di-F		TFA	372,38
KPU-90 tBu-□PLH- 2,3-di-Me		TFA	364,38

(continuação)

COMPOSTOS	ESTRUTURA	FORMA SALINA	P. M.
KPU-91 tBu-□PLH- 2,6-di-Me		TFA	364,38
KPU-92 tBu-□PLH-2- NO <sub>2</sub> -3-OMe		TFA	411,39
KPU-93 tBu-□PLH- 2,5-diMe		TFA	364,38
KPU-94 tBu-□PLH-2- NH <sub>2</sub> -3-OMe		TFA	381,399
KPU-96 tBu-□PLH-2- NH <sub>2</sub>		TFA	351,41
KPU-97 tBu-□PLH-m- NH <sub>2</sub>		TFA	351,41

### C. Avaliação dos derivados de desidrofenila-histina

A avaliação dos derivados divulgados acima é feita de acordo com os métodos divulgados no Exemplo 3. Avaliações adicionais dos derivados são estendidas a actividades específicas, tais como determinação do efeito inibidor na proliferação celular, os efeitos num mecanismo celular específico (*i. e.*, função microtubular), efeitos na progressão do ciclo celular, avaliação *in vitro* da actividade antitumoral contra linhas celulares de cancro, etc. Alguns protocolos de métodos de avaliação são apresentados abaixo.

#### 1) Efeito Inibidor da Proliferação Celular de Desidrofenila-histina e dos seus Análogos

Em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços, são colocados 100  $\mu$ L de células A-549 derivadas do cancro de pulmão humano preparadas a  $10^5$  células/mL num meio de cultura obtido pela adição de 10% de soro de feto bovino a um meio de cultura EMEM (Nissui Seiyaku Co., Ltd.) tendo efeito antitumoral contra células A-549 derivadas do cancro do pulmão humano. Uma solução de metanol do derivado obtido pelos exemplos acima listados é adicionada aos poços da fila superior, os espécimes são diluídos pelo método de diluição semi-logarítmica, e adicionados, e a placa é incubada numa incubadora de dióxido de carbono gasoso a 37 °C durante 48 horas. O resultado é adicionado em lotes de 10  $\mu$ L com um reagente MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolo)-2,5-difenil-2H-tetra)(1 mg/mL • PBS), seguido pela incubação numa incubadora de dióxido de carbono gasoso a 37 °C durante 6 horas. O meio de cultura é rejeitado e o cristal produzido nas células é dissolvido em 100  $\mu$ L/poço de dimetilsulfóxido. A

absorção de luz a 595 nm é então medida com um leitor de microplacas. Por comparação das absorções de luz das células não tratadas com aquelas das células tratadas com um espécime de concentração conhecida, é calculada a concentração do espécime que inibiu 50% ( $IC_{50}$ ) da proliferação celular.

## 2) Actividade Inibidora do Ciclo Celular da Desidrofenila-histina e dos seus Análogos

A linha celular A431 é derivada do cancro de pulmão humano. O meio de cultura EMEM que contém 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de aminoácidos não essenciais MEM (SIGMA M2025) é utilizado para incubar células A431 a 37 °C numa incubadora saturada com 5% de dióxido de carbono gasoso e vapor de água. O espécime refinado de desidrofenila-histina obtido pelos métodos acima é adicionado às células na fase de crescimento logarítmico e a progressão do ciclo celular é analisada por citometria de fluxo e observação microscópica.

### EXEMPLO 6

## Relações de Estrutura-Actividade de Derivados da Desidrofenila-histina Sintetizada (DesidroPLH)

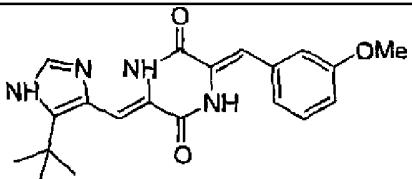
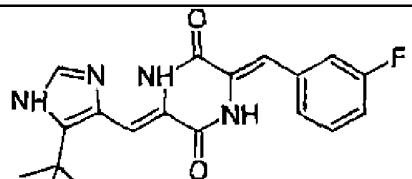
### 1) Visão Geral em Sínteses de Derivados

Muitos, mas não todos, os derivados de desidroPLH aqui divulgados incluem uma, duas ou três modificações no anel de fenilo (Figura 5, abaixo). Os derivados foram sintetizados pelos métodos divulgados acima. Como mostrado na Tabela 5,

determinados compostos mostraram actividade citotóxica mais potente que desidroPLH e tBu-desidroPLH. O composto mais potente que apresenta um valor de EC<sub>50</sub> de 3 nM foi o **KPU-90**. Este valor foi 16 vezes e 4 vezes mais alto que aqueles da desidroPLH e tBu-desidroPLH, respectivamente. Esses derivados têm mono-substituição na posição *o*- ou *m*- do anel de fenilo com os átomos de halogéneo, tais como átomos de flúor e cloro, ou o grupo metilo, vinilo ou metoxilo. Derivados com substituições para estruturas de heteroarilo, tais como naftaleno, tiofeno e anéis de furano também provocaram uma actividade potente. Os **KPU-35, 42, 69, 80 e 81** também apresentaram actividade mais alta do que a tBu-desidroPLH.

**Tabela 5.** Derivados da Desidrofenila-histina Sintéticos

Potentes

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-9		31
KPU-35		10

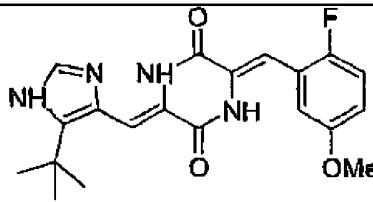
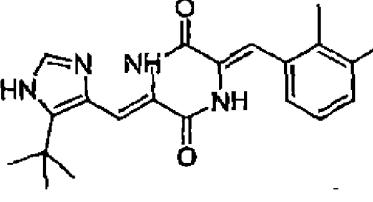
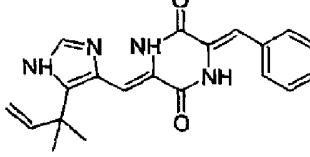
(continuação)

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-18		42
KPU-19		20
KPU-38		45
KPU-37		21
KPU-41		31
KPU-29		44
KPU-16		42

(continuação)

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-32		42
KPU-42		54
KPU-46		44
KPU-44		43
tBu-□PLH (KPU-2)		13
KPU-69		16
KPU-80		13

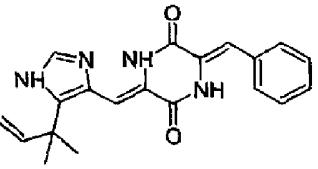
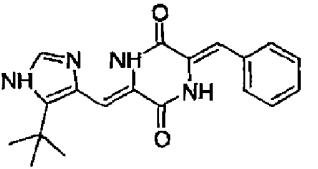
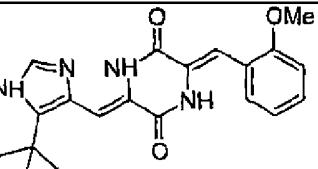
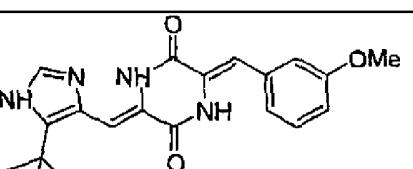
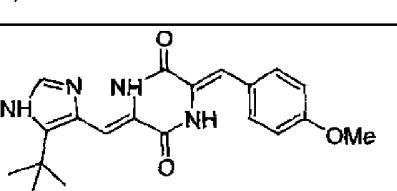
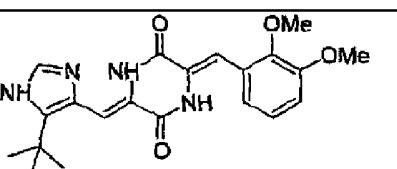
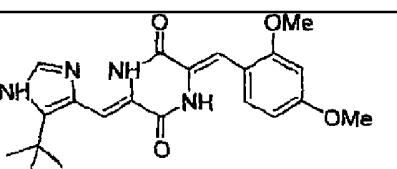
(continuação)

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-81		19
KPU-90		3
DesidroPLH (KPU-1)		48

2) Introdução dos grupos metoxilo no anel de fenilo

A colchicina reconhece o mesmo sítio de ligação na  $\beta$ -tubulina que a PLH. A colchicina tem quatro grupos metoxilo característicos nos seus anéis A e B. Uma série de substituições com um único ou múltiplos grupos metoxilo foi realizada e os resultados de actividade citotóxica são mostrados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Efeito da substituição do grupo metoxilo na proliferação de células HT-29

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
DesidroPLH (KPU-1)		48
tBu $\square$ PLH (KPU-2)		13
KPU-8		89
KPU-9		31
KPU-6		6730
KPU-10		1350
KPU-12		4980

(continuação)

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-13		2130
KPU-14		610
KPU-15		4430
KPU-16		42
KPU-24		7040

O resultado demonstrou que substituições nas posições *m*- ou *o*- aumentaram a actividade citotóxica contra células de HT-29. **KPU-9** e **16** mostraram alta actividade. Os derivados de metoxilo com substituição tripla (**KPU-11**, **17** e **45**) também mostraram actividade. A estrutura de **KPU-24** foi determinada por análise de MASSA.

### 3) Modificações com grupos removedores de electrões

Para estudar a relação estrutura-Actividade mais expandida no anel de fenilo, foi introduzida uma série de grupos funcionais diferentes que incluem tanto grupos removedores como doadores de electrões. O resultado da citotoxicidade contra células de HT-29 é mostrado nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

A substituição na posição *o*- ou *m*- aumentou eficazmente a actividade. Estes resultados estiveram bem de acordo com o caso do grupo metoxilo.

**Tabela 7.** Efeito do grupo removedor de electrões na proliferação de células de HT-29

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-18		42
KPU-19		20
KPU-20		545

(continuação)

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-21		51
KPU-52		51
KPU-37		21
KPU-35		10
KPU-34		466
KPU-50		38
KPU-41		31

(continuação)

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-40		623
KPU-47		40
KPU-48		> 20 $\mu$ M
KPU-49		28
KPU-43		> 20 $\mu$ M

Tabela 8. Efeito do grupo doador de electrões na proliferação de células de HT-29

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-8		89
KPU-9		31
KPU-6		6730
KPU-44		43
KPU-30		477
KPU-22		82

(continuação)

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-32		42
KPU-38		45
KPU-39		460
KPU-53		> 20 $\mu$ M
KPU-51		617
KPU-23		5870
KPU-58		> 20 $\mu$ M

(continuação)

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-54		> 20 μM
KPU-57		> 20 μM

A presente divulgação não está associada ou limitada a qualquer teoria científica em particular. Apesar disso, é entendido que especialistas na técnica possam interpretar os resultados aqui apresentados para sugerir que um grupo funcional relativamente menor, afectando menos o impedimento estérico, possa ser preferido para provocar actividade mais potente, e grupos ligeiramente maiores como o grupo etoxilo (quando comparado ao grupo metoxilo) ou o átomo de Br (quando comparado ao átomo de Cl) podem afectar desfavoravelmente o impedimento estérico à interacção com, por exemplo, o sítio de ligação da tubulina. Além disso, porque as propriedades eléctricas desses substituintes não afectaram a actividade, é sugerido que esses substituintes relativamente pequenos não interagem directamente com o sítio de ligação da  $\beta$ -tubulina, mas restringem a conformação de desidroPLH adequada para a ligação. Ou, como outra hipótese possível, as propriedades hidrofóbicas podem ser um factor mais importante no sítio de ligação para a posição o- ou m- da  $\beta$ -tubulina, uma vez que a introdução do grupo hidroxilo hidrofílico que pode formar a ligação de hidrogénio

como um doador de hidrogénio, diminuiu drasticamente a actividade.

Como mostrado na Tabela 9, o efeito dos substituintes na actividade citotóxica na posição *o*- pode ser ordenado, como no caso da posição *m*-, como mostrado na Tabela 10. Os compostos que têm grupos funcionais eficazes que mostraram actividade mais alta que a tBu-desidroPLH, também podem ser posteriormente modificados. E como foi observada a migração da estereoquímica de *Z* para *E* sob a irradiação de luz visível, os substituintes que diminuem a densidade de electrões nas ligações duplas conjugadas podem contribuir para a redução de migração de *Z* para *E* pela luz, resultando em estruturas mais estáveis do ponto de vista físico-químico. A temperatura também pode influenciar esta migração.

A modificação nas duas partes do anel pode ser preferida para o desenvolvimento de compostos potentes mas também biologicamente estáveis. O anel de fenilo da fenila-histina é oxidado por citocromo P-450. A modificação dupla que reduz a densidade de electrões do anel de fenilo pode ser então eficaz para evitar a oxidação por P-450. Assim, a combinação do pequeno grupo que retira electrões, tal como o átomo de flúor, para o elemento que pode aumentar a actividade, como -OMe, -Me, -Cl, -F e Br, pode resultar em compostos farmacológicos mais potentes e biologicamente estáveis.

**Tabela 9.** Sumário das modificações na posição o-

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-2		48
KPU-8		89
KPU-37		21
KPU-18		42
KPU-50		38
KPU-46		44

(continuação)

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-32		42
KPU-53		> 20 $\mu$ M

**Tabela 10.** Resumo das modificações na posição *m*-

composto	estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-2		48
KPU-9		31
KPU-35		10

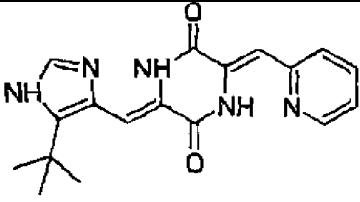
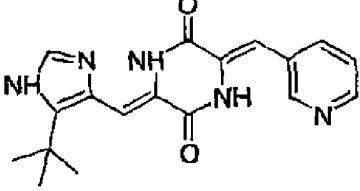
(continuação)

composto	estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-19		20
KPU-41		31
KPU-47		40
KPU-38		45
KPU-51		617
KPU-49		28
KPU-44		43

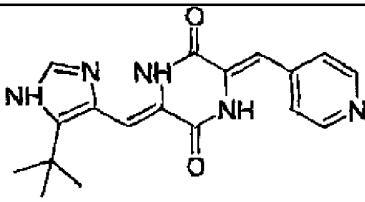
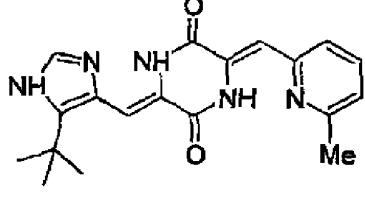
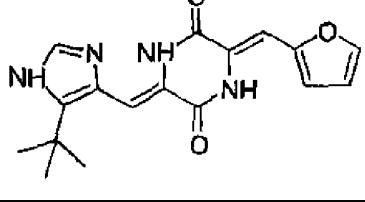
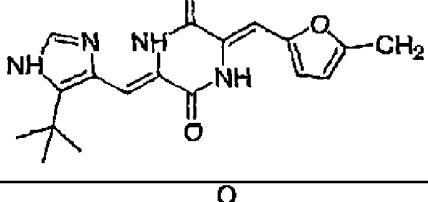
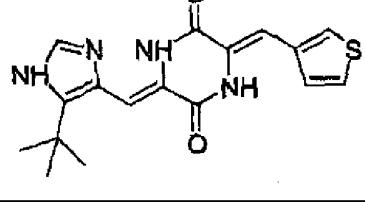
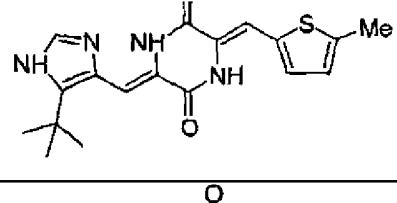
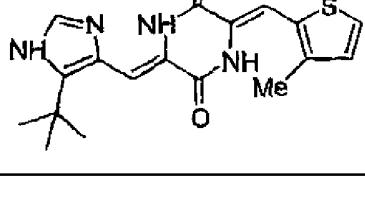
#### 4) Substituição do anel de fenilo por arilo-heterociclos

O anel de fenilo também pode ser substituído por grupos de heteroarilo. O resultado de tais substituições em termos de actividade citotóxica é mostrado na Tabela 11. Uma vez que os átomos de azoto arílicos podem formar uma ligação de hidrogénio com um grupo NH do anel de dicetopiperazina e restringir a conformação da molécula entre os anéis de piridina e dicetopiperazina para estrutura uniplanar, a conformação activa de desidroPLH requereria um certo nível de ângulo diedro formado pela repulsão estérica entre um átomo de hidrogénio amida do anel de dicetopiperazina e um átomo de hidrogénio o- do anel de fenilo (Figura 6).

**Tabela 11.** Efeito da substituição com o anel de heteroarilo na proliferação de células de HT-29

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-28		> 20 nM
KPU-31		96

(continuação)

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-25		544
KPU-33		> 20 nM
KPU-26		600
KPU-60		71
KPU-42		54
KPU-27		80
KPU-29		44

(continuação)

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-61		184
KPU-36		2790
KPU-63		105

Ao substituir o anel de fenilo com um anel de furano ou tiofeno menor, por exemplo, os **KPU-29** ou **-42**, apresentaram actividade. O anel de fenilo pode ser modificado para outra estrutura aromática enquanto mantém a actividade potente.

##### 5) Metabolismo e fenila-histina

Num estudo recente, a  $(\pm)$ -fenila-histina foi tratada com microssomas hepáticos de rato ou P450s hepático humano. No caso humano foram detectados, pelo menos, sete metabolitos e dois deles, *i. e.*, P1 e P3, eram metabolitos principais, representando mais de 60% dos metabolitos recuperados.

Uma vez que não há nenhuma estrutura exo-olefina na tBu-desidroPLH, os derivados presentemente sintetizados não têm oxidação, como P1 e P4. Porém, oxidações, tais como P3 e P5 são formadas durante o metabolismo hepático. Vários derivados que previnem tal metabolismo são eficazes para evitar oxidação de P450 no anel de fenilo. O anel de imidazole também pode ser modificado para evitar a oxidação desfavorável.

#### 6) Estabilidade Físico-Química da DesidroPLH

A estabilidade físico-química é um dos problemas desfavoráveis da desidroPLH. Na fenila-histina, uma vez que não há nenhuma estrutura adicional de olefina na parte de benzilo, não há esse problema. Porém, na desidroPLH, a unidade de benzildeno pode ser facilmente activada, provavelmente com a luz visível, e a migração de *Z* para *E* frequentemente acontece devido à existência de uma conjugação mais longa da ligação dupla. Esta migração aconteceu até mesmo sob luz ambiente normal. No ensaio citotóxico, alguns dos compostos migram para a forma-*E* durante a incubação, apesar desta migração provavelmente equilibrar-se numa proporção de 1:1 no caso da desidroPLH. Esta migração pode ser controlada. A migração de *Z* para *E* também é conhecida na combretastatina A4, um mesmo tipo de inibidor de tubulina, e foram descritos alguns estudos para melhorar este problema.

#### 7) Síntese de Pró-fármaco

A forma *E* também pode ser utilizada como um pró-fármaco da desidroPLH ou de um ou mais dos seus análogos, incluindo aqueles

análogos aqui descritos. Uma das propriedades indesejadas dos fármacos antitubulina envolve a sua baixa selectividade entre o tumor e os tecidos intactos, apesar destas fármacos pertencerem a uma das terapias moleculares alvo. Isto causa efeitos colaterais indesejados. Porém, se os compostos funcionam selectivamente somente nos tecidos do tumor, podem ser reduzidos os efeitos colaterais negativos dos fármacos antimicrotúbulos. Uma vez que a desidroPLH (forma-Z) pode ser produzida a partir de seu isómero *E* através de irradiação de luz visível, a forma *E* é administrada e a foto-irradiação é realizada somente no local do tumor, depois apenas o tumor é danificado pela forma *Z* foto-produzida e é reduzido o efeito adverso aos tecidos intactos.

A forma *E* pode ser protegida quimicamente pela adição de um grupo acilo volumoso mas biodegradável que é introduzido no anel de dicetopiperazina como um pró-fármaco. Este grupo acilo pode ser clivado pela protease no corpo. Então, o composto *E*-acilado é mantido antes da administração, então depois da administração é modificado para a forma *E* real que pode migrar para a forma *Z* bioactiva pela foto-irradiação local.

O esquema sintético desta forma-*E*-acilo da tBu-desidroPLH é apresentado na Figura 9.

## EXEMPLO 7

### Formulações Farmacêuticas das Desidrofenila-histinas Sintetizadas

#### 1) Formulações Administradas Intravenosamente, por Gota a Gota, Injecção, Infusão ou Semelhantes

A frasquinhos contendo 5 g de glucose em pó são adicionados, a cada um assepticamente, 10 mg de um composto sintetizado pelo método e selados. Depois de serem carregados com azoto, hélio ou outro gás inerte, os frasquinhos são armazenados num lugar fresco e escuro. Antes da utilização, os conteúdos são dissolvidos em etanol e adicionados a 100 mL de uma solução de soro fisiológico a 0,85%. A solução resultante é administrada como um método inibidor de crescimento de um tumor canceroso num humano, diagnosticado como tendo esse tumor entre 10 mL/dia a cerca de 1000 mL/dia, intravenosamente, por gota a gota, ou via injecção subcutânea ou intraperitoneal, como considerado apropriado pelos especialistas na técnica.

#### 2) Formulação para ser Administrada Oralmente ou de Forma Semelhante

Uma mistura obtida misturando-se exaustivamente 1 g de um composto sintetizado pelo método, 98 g de lactose e 1 g de hidroxipropilcelulose é formada em granulados por qualquer método convencional. Os granulados são exaustivamente secos e peneirados para obter uma preparação granulada adequada para ser acondicionada em frasquinhos ou selada por calor. As preparações granuladas resultantes são administradas oralmente entre cerca

de 100 mL/dia a cerca de 1000 mL/dia, dependendo dos sintomas, como considerado apropriado pelos especialistas na técnica de tratar tumores cancerosos em humanos.

### 3) Formulação para ser Administrada Topicamente

A administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz do composto também pode ser realizada topicamente por administração do(s) composto(s) directamente na área afectada da pele do indivíduo. Para este objectivo, o composto administrado ou aplicado está na forma de uma composição incluindo um veículo tópico farmacologicamente aceitável, tais como um gel, um unguento, uma loção ou um creme que inclui, sem limitação, tais veículos como água, glicerol, álcool, propilenoglicol, álcoois gordos, triglicéridos, ésteres de ácidos gordos ou óleos minerais. Outros veículos tópicos incluem petróleo líquido, palmitato de isopropilo, polietilenoglicol, etanol (95%), monolaurato de polioxietileno (5%) em água ou laurilsulfato de sódio (5%) em água. Podem ser adicionados conforme necessário outros materiais como antioxidantes, agentes de humidificação, estabilizadores de viscosidade e agentes semelhantes. Também podem ser incluídos aumentadores de penetração percutânea como Azona. Além disso, em certos casos, é esperado que o composto possa ser colocado dentro de dispositivos colocados sobre, dentro, ou debaixo da pele. Esses dispositivos incluem pensos, implantes e injecções que libertam o composto na pele, através de mecanismos de distribuição passivos ou activos.

## EXEMPLO 8

### Farmacologia in vitro de KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina

Os estudos de eficácia *in vitro* realizados com KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina incluíram: A) um painel de seis linhas celulares de tumor; B) estudos em células de tumor resistentes a multi-fármacos, e C) estudos para determinar o mecanismo de ação.

#### A). Estudo de KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina num painel de seis linhas celulares de tumor

Foram utilizadas as seguintes linhas celulares (fonte entre parênteses): HT-29 (tumor de cólon humano; ATCC; HTB-38), PC-3 (tumor de próstata humana; ATCC; CRL-1435), MDA-MB-231 (tumor de mama humana; ATCC; HTB-26), NCI-H292 (células não-pequenas de tumor pulmonar humano; ATCC; CRL-1848), OVCAR-3 (tumor de ovário humano; ATCC; HTB-161), B16-F10 (melanoma de murino; ATCC; CRL-6475) e CCD-27sk (fibroblasto humano normal; ATCC; CRL-1475). As células foram mantidas com densidades subconfluentes nos seus respectivos meios de cultura.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados como descrito acima no Exemplo 4, utilizando fluorescência de Resazurina como um indicador de viabilidade celular.

Os compostos divulgados são agentes eficientes contra uma variedade de diferentes e distintas linhas celulares de tumor. Especificamente, por exemplo, KPU-2 e KPU-35 foram mais eficazes na linha celular de tumor HT-29, tanto em termos de potência

(activos na gama nanomolar baixa) como eficácia (mais responsivos em termos do máximo efeito citotóxico); a t-butil-fenila-histina apresentou a sua maior potência contra a linha celular de tumor PC-3, embora a maior eficácia tenha sido apresentada contra a linha celular HT-29; KPU-2 e KPU-35 foram geralmente 10-40 vezes mais potentes que a t-butil-fenila-histina considerando que a eficácia foi semelhante para todos os três compostos nas diferentes linhas celulares de tumor; as linhas celulares de tumor HT-29, PC-3, MDA-MB-231 e NCI-H292 responderam todas semelhantemente aos compostos de NPI, considerando que o B16-F10 parecia ser um pouco menos sensível. A t-butil-fenila-histina apresentou um diferencial acentuado entre fibroblastos normais e as linhas celulares de tumor, com uma proporção na gama de >20 - >100, com excepção da linha celular OVCAR-3.

**Tabela 12** Actividade de KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina no Rastreio do Painel de Tumores

Linha celular	KPU-2			KPU-35			t-butil-fenila-histina		
	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	n
HT-29 Cólón									
	IC <sub>50</sub> nM	9,8	2,4	4	8,2	2,0	4	410	473
	citotoxicidade %	82,5	5,3	4	81,3	4,0	4	88	0,2
PC-3 Próstata									
	IC <sub>50</sub> nM	13,4	0,7	4	13,2	2,5	4	174	-
	citotoxicidade %	60,3	2,1	4	56,8	1,0	4	59,6	-
MDA-MB-231 Mama									
	IC <sub>50</sub> nM	13,8	1,9	3	9,7	4,2	4	387	-
	citotoxicidade %	56,7	7,2	3	59,3	5,6	4	85,5	-

(continuação)

Linha celular	KPU-2			KPU-35			t-butil-fenila-histina		
	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	n
NCI-H292 Pulmão IC <sub>50</sub> nM citotoxicidade %	17,5	1,1	4	15,9	1,1	4	384	194	3
	70,5	2,9	4	68,5	2,9	4	65	5	3
OVCAR-3 Ovário IC <sub>50</sub> nM citotoxicidade %	>20000	-	4	>20000	-	4	>20000	-	2
	45,8	3,0	4	39	2,2	4	37	-	2
B16-F10 Melanoma IC <sub>50</sub> nM citotoxicidade %	37,1	26,3	4	32,3	19,9	4	736	650	3
	71,8	2,5	4	72,0	2,2	4	74	2	3
CCD-27sk Fibroblasto IC <sub>50</sub> nM citotoxicidade %									
	9,2	2,9	4	7,4	2,6	4	>20000	-	2
	64,3	2,4	4	60,8	1,9	4	45	-	2

#### B). Estudos em Linhas Celulares Resistentes a Fármacos

Um dos maiores desafios na utilização de agentes quimioterapêuticos em oncologia clínica é o desenvolvimento de resistência ao efeito do fármaco pelas células tumorais. Há vários mecanismos para o desenvolvimento da resistência, cada um dos quais terá efeitos diferentes nos fármacos quimioterapêuticos. Estes mecanismos incluem uma expressão aumentada em bombas de efluxo dependentes de ATP, tais como a glicoproteína-P codificada por *MDR1* ou a proteína 1 associada à resistência a multi-fármacos codificada por *MRP1*. Reduzida incorporação do fármaco, alteração do alvo do fármaco, reparação aumentada das lesões ao ADN induzidas por fármaco, alteração da via apoptótica e a activação de enzimas do citocromo P450 são

outros exemplos de mecanismos pelos quais as células cancerígenas ficam resistentes a fármacos anticanerígenos. Os compostos seleccionados foram estudadas em três linhas celulares diferentes que apresentam dois mecanismos diferentes de resistência; a sobre-expressão da glicoproteína-P e actividade de topo-isomerase II alterada.

1) Par de Linhas Celulares de Tumor de Sarcoma Uterino Humano: MES-SA (Sensível ao Taxol) e MES-SA DX (Resistente ao Taxol)

Esta linha celular expressa de forma elevada ARNm de mdr-1 e glicoproteína-P (um mecanismo de bomba de extrusão). O pré-tratamento com ciclosporina-A (CsA) bloqueia a glicoproteína-P e restabelece a actividade na linha celular resistente para aqueles compostos para os quais a resistência é devido à elevada glicoproteína-P.

Como pode ser observado na Tabela 13, KPU-2 e KPU-35, têm a mesma potência na linha celular resistente como na linha sensível e a potência de t-butil-fenila-histina foi apenas ligeiramente reduzida. O pré-tratamento com ciclosporina A (CsA) não alterou a potência dos compostos seleccionados. Em contraste, o taxol foi virtualmente inactivo na linha celular resistente MES-SA DX, enquanto que este composto foi muito potente na linha celular sensível. O tratamento com CsA restabeleceu a sensibilidade ao taxol da linha celular MES-SA DX. A linha celular MES-SA DX também mostrou susceptibilidade reduzida a etoposida (60 vezes), doxorrubicina (34 vezes) e mitoxantrona (20 vezes).

Estes dados indicam que os efeitos de KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina não são susceptíveis ao mecanismo de resistência relacionado com o taxol (glicoproteína-p) nesta linha celular, e aquela resistência cruzada do taxol não ocorre para esses compostos seleccionados neste modelo.

**Tabela 13** Actividade de KPU-2, KPU-35, t-butil-fenila-histina e Taxol em Linhas Celulares de Tumor de Sarcoma Uterino Humano Resistentes a Taxol DX e Sensíveis a Taxol MES-SA

Estudo do Composto	Sensível a MES-SA			Resistente a MES-SA			
	Sem CsA	Pré-Tratada com CsA		Sem CsA		Pré-Tratada com CsA	
	IC50 nM	IC50 nM	Proporção Sem CsA	IC50 nM	Proporção MES-SA	IC50 nM	Proporção Sem CsA
<u>KPU-2</u>							
Estudo I	8,5	-	-	10,6	1,2	-	-
Estudo II	19,4	27,4	1,4	21,7	1,1	37,8	1,74
<u>KPU-35</u>							
Estudo I	6,6	-	-	5,2	0,6	-	-
Estudo III	3,9	2,0	0,5	2,5	0,6	6,7	2,7
<u>t-butil-fenila-histina</u>							
Estudo I	144	-	-	825	5,7	-	-
Estudo III	122	162	1,3	694	4,3	622	0,9
<u>Taxol</u>							
Estudo I	4,4	-	-	>20000	>455	-	-
Estudo II	13,3	7,8	0,6	>>100	>>8	40	<<0,25
Estudo III	7,3	2,8	0,4	>24000	>3000	2,0	<<0,001

2) Par de Linhas Celulares de Leucemia Promielocítica Aguda Humana: HL-60 (Sensível a Mitoxantrona) e HL-60/MX-2 (Resistente a Mitoxantrona)

Considera-se que esta linha celular tem propriedades de resistência a fármaco atípicas com actividade catalítica de topo-isomerase II alterada sem sobre-expressão de glicoproteína-P.

Como pode ser observado na Tabela 14, estes resultados indicam que as potências dos novos compostos seleccionados são muito semelhantes nas linhas celulares HL-60 sensíveis e resistentes. Em contraste, a mitoxantrona perde eficácia por um factor de 24 vezes na linha celular resistente HL-60/MX-2.

Assim, KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina não são susceptíveis aos mesmos mecanismos de resistência como a mitoxantrona nesta linha celular e não há nenhuma resistência cruzada da mitoxantrona para estes novos compostos seleccionados neste modelo.

**Tabela 14.** Actividade de KPU-2, KPU-35, t-butil-fenila-histina e Mitoxantrona no Par de Linhas Celulares Sensíveis e Resistentes a Tumor de Leucemia Promielocítica Aguda Humana HL-60

<b>Composto</b>	<b>Sensível a HL-60</b>	<b>Resistente a HL-60</b>	
	<b>IC50 nM</b>	<b>IC50 nM</b>	<b>Proporção para Sensíveis</b>
KPU-2	6,4	8,17	1,28
KPU-35	9,2	7,3	0,79
t-butil-fenila-histina	255	175	0,69
Mitoxantrona	202	4870	24,1

3). Par de Linhas Celulares de Carcinoma de Mama Humana: MCF-7 (Sensível a Taxol) e MCF-7/ADR (Resistente a Taxol)

Este estudo envolveu KPU-2 em comparação com taxol. O KPU-2 demonstrou potências semelhantes em ambos os membros sensíveis e resistentes deste par de linhas celulares. Em contraste, o taxol foi virtualmente inativo na linha celular resistente considerando que havia baixa potência nanomolar na linha celular sensível (Tabela 15).

Estes estudos confirmam numa linha celular de tumor humano diferente que a resistência a taxol não se transfere a KPU-2.

**Tabela 15.** Actividade de KPU-2 e Taxol no Par de Linhas Celulares Sensíveis e Resistentes a Carcinoma de Mama Humana MCF-7

<b>Composto</b>	<b>Sensível a</b> <b>MCF-7</b>	<b>Resistente a MCF-7/ADR</b>	
	<b>IC50 nM</b>	<b>IC50 nM</b>	<b>Proporção para Sensíveis</b>
KPU-2	39,6	27,4	0,69
Taxol	2,6	>>100	>>38

C) Estudos do Mecanismo de Ação

1). Ação na Função dos Microtúbulos

Foram utilizadas neste estudo células endoteliais da veia umbilical humana (HuVEC da Cambrex), para avaliar os efeitos de KPU-2 e t-butil-fenila-histina em comparação com taxol e colchicina na tubulina por coloração da  $\alpha$ -tubulina.

Trinta minutos de exposição a KPU-2, t-butil-fenila-histina ou colchicina (todos a 2  $\mu$ M) induziu a despolimerização dos microtúbulos, como foi indicado pela falta de estruturas intactas de microtúbulos em contraste com o que foi observado no Controlo DMSO e modificação das membranas celulares (uma clara indicação de apoptose) nas células de HuVEC, considerando que o taxol não induziu despolimerização de microtúbulos sob estas condições. A colchicina é um conhecido agente despolimerizante de microtúbulos enquanto que o taxol é um agente estabilizador de tubulina. Foram obtidos resultados semelhantes quando células CCD-27sk foram expostas a KPU-2 ou colchicina.

## 2). Indução de Apoptose

A apoptose e sua desregulação desempenham um papel importante na oncologia; a indução selectiva do ciclo de morte celular programada em células de tumor é o objectivo de muitos programas de descoberta de fármacos quimioterapêuticos. Esta indução de apoptose pode ser demonstrada através de diferentes métodos incluindo a característica modificação da membrana celular, fragmentação de ADN, hiperfosforilação do factor antiapoptótico Bcl-2, activação da cascata de caspase e clivagem da poli (ribose de ADP) polimerase (PARP).

Os sinais característicos de morte celular apoptótica incluem modificação da membrana celular, rompimento do núcleo, encolhimento e condensação da célula e finalmente morte celular, o que é muito distinto da morte necrótica celular. O KPU-2 induziu as mudanças morfológicas típicas associadas com as fases iniciais de apoptose em células tumorais de próstata humana. Algo semelhante também foi claramente encontrado no tratamento de células HuVEC com KPU-2.

## 3). Fragmentação de ADN

Uma característica da fase avançada de apoptose é a clivagem internucleossómica do ADN que resulta num padrão distinto em escada que pode ser visualizado através de eletroforese em gel. Esta abordagem foi utilizada para estudar o efeito de KPU-2 no escadeamento do ADN em células Jurkat (linha de leucemia das células T humanas) em comparação com halimida e desidrofenila-histina (KPU-1). O KPU-2 induziu o escadeamento do ADN na

concentração de 1 nM enquanto que a halimida e o KPU-1 foram muito menos potentes.

#### 4). Activação da Cascata de Caspase

Várias enzimas na cascata de caspase são activadas durante a apoptose, incluindo Caspase-3, -8 e -9. A actividade de Caspase-3 foi monitorizada em células Jurkat depois do tratamento com KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina.

Os resultados indicam que a Caspase-3 foi activada de uma modo dependente da dose pelo tratamento com todos os três compostos de um modo semelhante à halimida. A activação da Caspase-3 ocorreu sob uma gama de concentração semelhante como para os valores de IC<sub>50</sub> para citotoxicidade na linha celular Jurkat (Tabela 16).

**Tabela 16.** Citotoxicidade de KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina em Células Jurkat

<b>Composto NPI</b>	<b>Citotoxicidade</b>	
	<b>Potência IC<sub>50</sub> nM</b>	<b>Eficácia de Morte Celular %</b>
KPU-2	11	94
KPU-35	5	93
t-butil-fenila-histina	165	93
Mitoxantrona	41	99

## 5). Clivagem de Poli (ribose-ADP) Polimerase (PARP) em Células Jurkat

Para avaliar a capacidade destes compostos para induzir apoptose em células Jurkat, foi monitorizada a clivagem de poli (ribose-ADP) polimerase (PARP). A PARP é uma proteína nuclear de 116 kDa que é um dos principais alvos intracelulares da Caspase-3. A clivagem da PARP gera um produto estável de 89 kDa, e este processo pode ser monitorizado facilmente por coloração de Western. A clivagem de PARP pelas caspases é uma das características marcantes da apoptose, e como tal serve como um indicador excelente para este processo. KPU-2 em 100 nM induziu clivagem da PARP em células Jurkat 10 horas depois da exposição das células ao composto. O KPU-2 pareceu ser mais activo que a halimida ou KPU-1.

## 6). Permeabilidade Vascular Aumentada em Células HuVEC

Verificou-se que os compostos que despolimerizam microtúbulos (e. g., fosfato-A-4 de combretastatina, ZD6126) induzem colapso vascular em tumores *in vivo*. Este colapso vascular é precedido por uma rápida indução de permeabilidade celular vascular inicialmente a electrólitos e em seguida a moléculas maiores. A permeabilidade aumentada das células de HuVEC ao dextrano marcado como fluorescente é utilizada como um ensaio de rastreio de colapso vascular.

KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina induziram todos rapidamente (dentro de 1 hora) uma significativa permeabilidade de mono-camada de HuVEC, numa extensão semelhante a colchicina.

O agente taxol estabilizador de microtúbulos foi inactivo neste ensaio (Figura 12).

#### 7). Perfil num Rastreio Amplo de Cinases

O KPU-2 foi inicialmente rastreado a uma concentração de 10  $\mu$ M num painel de 60 cinases diferentes; a concentração de ATP foi de 10  $\mu$ M. Quatro cinases foram inibidas em mais de 50% no rastreio primário e os valores de IC50 determinados em rastreio secundário são apresentados na Tabela 17. Todos os valores de IC50 estão na gama micromolar baixa, o que indica que a inibição destas cinases não está relacionada com as baixas actividades nanomolares observadas para a citotoxicidade das células tumorais.

**Tabela 17.** Actividade de KPU-2 contra Cinases Selecionadas

<b>Cinase</b>	<b>IC50 (<math>\mu</math>M)</b>
CDK1/Ciclina B (humana)	10,1
c-RAF (humana)	8,9
JNK3 (rato)	6,8
Lin (murganho)	11,1

## EXEMPLO 9

### Farmacologia in vivo

Foram realizados estudos preliminares com KPU-2 utilizando os modelos de xenoenxerto MX-1 (mama) e HT-29 (cólon) e o modelo de tumor de leucemia de murino P-388, no murganho. Outros modelos de tumor seleccionados com base na actividade no painel de tumores *in vitro* foram os das linhas celulares DU-145 (próstata), MCF-7 (mama) e A549 (pulmão). O tumor pancreático humano (MiaPaCa-2) também foi incluído. Os novos compostos foram estudados como monoterapia e em combinação com um agente quimioterapêutico utilizado clinicamente. As doses dos novos compostos seleccionados foram determinadas a partir do teste de tolerabilidade aguda (Dose Máxima Tolerada, DMT) e foram ajustadas conforme necessário durante cada estudo. As doses dos agentes quimioterapêuticos utilizados clinicamente foram seleccionadas com base em estudos históricos.

O KPU-2 foi o primeiro composto a ser estudado nestes cinco modelos de tumor. No seguimento dos resultados iniciais deste estudo, todos os três compostos foram comparados nos modelos de xenoenxerto de tumor de cólon humano HT-29, próstata humana DU-145 e tumor de mama humana MCF-7.

Os modelos acima utilizam todos a técnica de implantação subcutânea do xenoenxerto e estão potencialmente sujeitos a efeitos selectivos de um composto na vasculatura subcutânea produzindo uma actividade antitumoral aumentada (ou aparente). Para evitar esta possibilidade, foram incorporados na pesquisa dois outros modelos de tumor. Um destes foi a observação de metástases de pulmão depois da injecção intravenosa de células

B16-F10 de tumor de melanoma de rato. O outro modelo foi a implantação de células MDA-231 de tumor de mama humana na almofada adiposa mamária de murganho. Enquanto este último modelo é um modelo de xenoenxerto, a vasculatura subcutânea não desempenha um papel.

## Métodos

### 1). Modelos de Xenoenxerto

Os animais utilizados foram (as excepções são indicadas para estudos individuais): murganhos *nude* fêmeas (*nu/nu*) entre 5 e 6 semanas de idade (~20 g, Harlan); o tamanho do grupo foi de 9-10 murganhos por grupo, salvo indicação em contrário.

As linhas celulares utilizadas para implantação do tumor foram: tumor de cólon humano HT-29; tumor de mama humana MCF-7; células não-pequenas de tumor pulmonar humano A549; tumor de pâncreas humano MiaPaCa-2; tumor de próstata humana DU-145.

Foram administrados novos compostos seleccionados como monoterapia através da via intraperitoneal (i.p.) nas doses indicadas para o estudo individual; para os estudos de combinação, os agentes seleccionados de quimioterapia de referência foram injectados 15-30 min antes do composto.

Os veículos utilizados nestes estudos foram: DMSO a 12,5%, Cremaphor a 5% e óleo de amendoim a 82,5% para os novos compostos seleccionados; (1:3) Polissorbato 80:13% de etanol para taxotere; (1:1) Cremaphor:etanol para paclitaxel; para CPT-11 cada mL de solução continha 20 mg de cloridrato de

irinotecano, 45 mg de pó NF de sorbitol, e 0,9 mg de ácido láctico, sendo o pH ajustado a 7,4 com NaOH ou HCl. Foram utilizadas diluições em soro fisiológico para alcançar as concentrações de injecção utilizadas para os compostos de referência.

#### Modelo de Tumor de Cólón Humano HT-29

Os animais foram implantados subcutaneamente (s.c.) por trocarte com fragmentos de tumores HT-29 recolhidos de tumores s.c. em crescimento em murganhos *nude* hospedeiros. Quando o tamanho do tumor alcançou 5 mm x 5 mm (cerca de 10-17 dias) os animais foram emparelhados em grupos de tratamento e controlo. Os murganhos foram pesados duas vezes por semana e as medidas do tumor foram obtidas utilizando paquímetros duas vezes por semana, começando no Dia 1. As medidas do tumor foram convertidas em peso estimado de tumor em mg utilizando a fórmula  $(W^2 \times L)/2$ . Quando o peso estimado do tumor do grupo de controlo alcançou uma média de 1000 mg os murganhos foram pesados, sacrificados e o tumor removido. Os tumores foram pesados e foi calculado peso médio de tumor por grupo e foi determinada a inibição do crescimento tumoral (TGI) para cada grupo (100% menos a variação no peso médio de tumor tratado/a variação no peso médio de tumor de controlo x 100).

Neste modelo, salvo indicação em contrário para o estudo individual, os novos compostos seleccionados foram injectados intraperitonealmente a cada terceiro dia durante 15 dias [1, 4, 8, 11 e 15 (q3d x 5)]; o CPT-11 foi administrado intraperitonealmente nos dias 1, 8 e 15 (qw x 3).

#### MCF-7 Modelo de Tumor de Mama Humana

Um murganho *nude* fêmea (~20 g) foi implantado s.c. com pastilhas de distribuição de estrogénio de 21 dias (0,25 mg), 24 horas antes da implantação s.c. com fragmentos de tumor MCF-7 (recolhidos de tumores s.c. em murganhos *nude* hospedeiros). O estudo prosseguiu então como divulgado para o modelo HT-29, utilizando taxotere como o agente convencionais de quimioterapia.

Neste modelo, salvo indicação em contrário para o estudo individual, os novos compostos foram injectados diariamente através da via intraperitoneal nos Dias 1-5, incluindo (qd x 5); taxotere foi administrada intravenosamente nos Dias 1, 3 e 5 (qod x 3).

#### Modelo de Tumor Pulmonar Humano A549

Os animais foram implantados s.c. por trocarte com fragmentos de tumores A549 recolhidos de tumores s.c. em crescimento em murganhos *nude* hospedeiros. Quando o tamanho do tumor alcançou 5 mm x 5 mm (cerca de 10-17 dias) os animais foram emparelhados em grupos de tratamento e controlo. O resto do estudo prosseguiu como descrito para o modelo HT-29, utilizando taxotere e CPT-11 como os agentes convencionais de quimioterapia.

Neste modelo, salvo indicação em contrário para o estudo individual, os compostos testados foram administrados através da via intraperitoneal num esquema de dose (q3d x 5) para a combinação com CPT-11 ou num regime de dose (qd x 5) para a

combinação com taxotere; o CPT-11 foi administrado pela via intraperitoneal num esquema (qw x 3); o taxotere foi administrada intravenosamente num regime de dose (qod x 3).

#### Modelo de Tumor de Pâncreas Humano MiaPaCa-2

Os animais foram implantados s.c. por trocarte com fragmentos de tumores de MiaPaCa-2 recolhidos de tumores s.c. em crescimento em murganhos *nude* hospedeiros. Quando o tamanho do tumor alcançou 5 mm x 5 mm (cerca de 10-17 dias) os animais foram emparelhados em grupos de tratamento e controlo. O resto do estudo prosseguiu como descrito para o modelo HT-29, utilizando gemcitabina como agente convencional de quimioterapia.

Neste modelo, salvo indicação em contrário para o estudo individual, foram administrados compostos de teste a cada terceiro dia através da via intraperitoneal nos Dias 1, 4, 7, 10 e 15 (q3d x 5); a gemcitabina foi administrada pela via intraperitoneal nos Dias 1, 4, 7 e 10 (q3d x 4).

#### Modelo de Tumor de Próstata Humana DU-145

Murganhos machos foram implantados s.c. por trocarte com fragmentos de tumores DU-145 recolhidos de tumores s.c. em crescimento em murganhos *nude* hospedeiros machos. Quando os tumores alcançaram ~5 mm x 5 mm (cerca de 13-17 dias) os animais foram emparelhados em grupos de tratamento e controlo. O resto do estudo prosseguiu como para o modelo HT-29, utilizando taxotere como agente convencional de quimioterapia.

Neste modelo, salvo indicação em contrário para o estudo individual, os compostos de teste foram administrados pela via intraperitoneal nos Dias 1, 3, 5, 8 e 11 (q3d x 5); o taxotere foi administrada intravenosamente nos Dias 1, 3 e 5 (q2d x 3).

## 2). Modelos de Tumor de Implantação Não-Subcutânea

Os animais utilizados foram: murganhos *nude* fêmeas (*nu/nu*) (estudo MDA-231) ou murganhos B6D2F1 (estudos B16-F10) entre 5 e 6 semanas de idade (~20 g, Harlan); o tamanho de grupo foi de 10 murganhos por grupo, salvo indicação em contrário.

As linhas celulares utilizadas foram: tumor de mama humana MDA-MB-231 e células de melanoma de murino B16-F10.

Foram administrados compostos de NPI como monoterapia através da via intraperitoneal nas doses indicadas para o estudo individual; para os estudos de combinação os agentes de quimioterapia de referência seleccionados foram injectados 15-30 min antes do composto de NPI.

### Tumor de Mama Humana MDA-231

Murganhos *nude* fêmea foram injectados na almofada adiposa mamária com  $2 \times 10^6$  células MDA-231 recolhidas de uma cultura de células *in vitro*. Quando o tamanho do tumor alcançou 5 mm x 5 mm (cerca de 14-28 dias) os animais foram emparelhados em grupos de tratamento e controlo. O estudo prosseguiu então como descrito para o modelo HT-29, utilizando paclitaxel como agente convencional de quimioterapia.

Neste modelo, salvo indicação em contrário para o estudo individual, os compostos de teste foram administrados pela via intraperitoneal nos Dias 1, 4, 8, 11 e 15 (q3d x 5); o paclitaxel foi administrado pela via intraperitoneal nos Dias 1-5 (qd x 5).

#### Modelo de Melanoma Metastático de Murino B16-F10

Os murganhos receberam células B16-F10 (preparadas a partir de uma cultura celular *in vitro* de células B16-F10) pela via i.v. (intravenosa) no Dia 0. No Dia 1, os murganhos foram arbitrariamente colocados em grupos de tratamento e controlo, e o tratamento começou. Os murganhos foram pesados duas vezes por semana, começando no Dia 1. Todos os murganhos foram sacrificados no Dia 16, os pulmões removidos, pesados e as colónias de superfície foram contadas. Os resultados foram expressos como média de colónias de murganhos tratados/média de colónias de murganhos de controlo (T/C x 100%). A inibição de crescimento de metástases (MGI) é este número subtraído de 100%. O paclitaxel foi o agente convencional de quimioterapia utilizado neste estudo.

Neste modelo, salvo indicação em contrário para o estudo individual, os compostos de teste foram administrados pela via intraperitoneal nos Dias 1-5 (qd x 5); o paclitaxel foi administrado intravenosamente nos Dias 1-5 (qd x 5).

Quando apropriado ( $n \geq 3$ ), os resultados são apresentados como médias  $\pm$ SEM. A análise estatística dos estudos com vários grupos foi realizada utilizando ANOVA com pós-teste de Neuman-

Keuls, salvo especificação em contrário. Um teste-t com uma repetição foi também utilizado baseado na hipótese de que o composto ou fármaco, ou a combinação, reduziria o crescimento tumoral.

## Resultados

### Estudos no Modelo de Xenoenxerto de Tumor de Cólón Humano HT-29

#### 1. Avaliação In Vivo de KPU-2 +/- CPT-11 no Modelo de Xenoenxerto de Tumor de Cólón Humano HT-29

Este estudo avaliou variações na força da dosagem e no regime de dosagem para KPU-2 isolada e em combinação com um quimioterapêutico relevante CPT-11 no modelo HT-29.

O KPU-2 foi administrado diariamente a doses de 7,5 mg/kg i.p. (intraperitonealmente) durante cinco dias (qd x 5), 3,75 mg/kg i.p. durante cinco dias, 7,5 mg/kg i.p. a cada dois dias durante 10 dias (qod x 5) e 7,5 mg/kg i.p. a cada três dias durante 15 dias (q3d x 5). A combinação de CPT-11 com NPI-2358 na dose de 7,5 mg/kg i.p. q3d x 5 resultou num efeito significativamente maior do que para qualquer composto isoladamente, o qual perdurou durante o estudo (Figura 13). Estas observações durante a porção em vida do estudo foram confirmadas pelos pesos médios finais de tumor do grupo na autópsia, para os quais só o grupo de combinação apresentou um peso mais baixo de tumor estatisticamente significativo do que os controlos. Além disso a diferença entre os pesos médios de tumor da terapia de combinação e os grupos de monoterapia CPT-11

foi estatisticamente significativa (Figura 14). Quando são examinados os pesos de tumor finais individuais na autópsia, o maior efeito da co-terapia é claro (Figura 14). A TGI de co-terapia foi de 78% quando comparada aos 38,9% do CPT-11 isoladamente. A TGI para o grupo de terapia combinada excede em 58% o critério de NCI para um resultado positivo.

## 2. Estudo de KPU-2 +/- Quimioterapia Convencional versus Cinco Modelos de Xenoenxerto de Tumores Humanos

Este estudo consiste de cinco ramos diferentes, cada um com seu próprio protocolo, período, regime de dosagem e composto de referência. Cada ramo será considerado dentro da apresentação do modelo de tumor particular.

O objectivo do ramo HT-29 do estudo foi investigar uma dose ligeiramente mais alta de KPU-2 (10 mg/kg i.p. q3d x 5) no modelo de xenoenxerto de tumor de cólon humano HT-29 comparado àqueles utilizados no estudo acima divulgado, no qual uma notável sinergia foi observada entre KPU-2 (7,5 mg/kg i.p. q3d x 5) e CPT-11 (100 mg/kg i.p. qw x 3).

Como pode ser observado na Figura 15, a combinação de CPT-11 e KPU-2 neste modelo resultou numa marcante sinergia na inibição do crescimento tumoral, sendo o crescimento tumoral quase completamente inibido até Dia 29 do tratamento no grupo de terapia de combinação. A terapia combinada manteve eficácia e o crescimento estimado do tumor para este grupo foi significativamente mais baixo que para qualquer outro grupo de monoterapia. Por conseguinte, a administração de KPU-2 e CPT-11

inibiu o crescimento tumoral, e é um eficiente tratamento antitumoral.

As observações da porção em vida do estudo (crescimento estimado do tumor, Figura 15) são suportadas por medidas dos pesos dos tumores retirados na autópsia (Figura 16). Os pesos de tumor para o grupo de combinação foram significativamente menores que os Controlos ( $p < 0,01$ ), assim como foram os pesos de tumor para CPT-11 isoladamente ( $p < 0,05$ ).

Quando os pesos de tumor individuais finais foram considerados (Fig. 16), o tamanho do tumor para o grupo de combinação foi geralmente menor que para os outros grupos de controlo tratados. A TGI do grupo de combinação foi de 65,8%, indicando um efeito positivo pelo critério de NCI, enquanto a monoterapia não alcançou o critério de NCI de  $TGI > 58\%$ .

### 3. Estudo de actividade de KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenilahistina no Estudo de Xenoenxerto de Tumor de Cólón Humano HT-29

Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 17 e Tabela 18. Todos os grupos de terapia de combinação indicaram uma sinergia acentuada entre os novos compostos e CPT-11. Os pesos de tumor individuais demonstraram a efectividade do tratamento de co-terapia (Figura 18). Em cada caso, a TGI para o grupo de combinação ultrapassa critério de NCI para um efeito positivo, considerando que a TGI para monoterapia CPT-11 não alcançou este nível.

**Tabela 18.** Sumário de Estudos Realizados no Modelo de Tumor de Cólono Humano HT-29

Descrição do estudo		Composto NPI		Agente quimioterapêutico		Combinação		comentários
Número do estado	Ponto final	Número, mg/kg i.p.	resulado % TGI	Nome, dose	resulado % TGI	resulado % TGI	Excede o critério NCI (TGI≥58%)	
2164	TGI	KPU-2 7,5 qd x 5 7,5 q3d x 5	Sem Efeito Sem Efeito	CPT-11 100 i.p. qw x 3	39*	78 **, #	Combinacão	Sinergia
2288	TGI	KPU-2 10 → 7,5 q3d x 5	Sem Efeito	CPT-11 100 i.p. qw x 3	36,5*	65,8 **	Combinacão	Sinergia Ver Texto
2139	TGI	KPU-2 7,5 q3d x 5	Sem Efeito	CPT-11 100 i.p. qw x 3	32,7	80,7 **, #	Combinacão	Sinergia
2139	TGI	KPU-35 10 → 7,5 q3d x 5	Sem Efeito	CPT-11 100 i.p. qw x 3	32,7	83,3 **, ##	Combinacão	Sinergia 1+dia 13 1+dia 27
2139	TGI	t-butil-fenila-histina 30 q3d x 5	Sem Efeito	CPT-11 100 i.p. qw x 3	32,7	77,7 *, #	Combinacão	Sinergia

\* p < 0,05 versus Controlo; \*\* p < 0,01 versus Controlo; # p < 0,05 versus CPT-11 isolado; ## p < 0,01 versus CPT-11 isolado;  
+ = Número de Mortes

4. Sumário dos Efeitos de KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina em Combinação com CPT-11 no Modelo de Xenoenxerto de Tumor de Cólon Humano HT-29

Quando combinado com CPT-11, o KPU-2 aumentou o efeito do CPT-11, o agente quimioterapêutico convencional, a um nível que excede em muito o critério de NCI de  $TGI \geq 58\%$  para um efeito positivo. Os resultados gerados nos três estudos são muito comparáveis tanto para as observações em vida (Figura 19) como para os pesos dos tumores extraídos na autópsia (Figura 20).

Estudos no Modelo de Xenoenxerto de Tumor da Próstata Humana DU-145

Foram completados dois estudos com este modelo: o primeiro estudo envolveu KPU-2 isolada e em combinação com taxotere; o segundo estudo comparou KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina isolada e em combinação com taxotere.

1. Efeito de KPU-2 em Combinação com Taxotere no Modelo de Xenoenxerto de Tumor da Próstata Humana DU-145

Como pode ser observado a partir dos dados obtidos durante a porção em vida deste estudo (Fig. 21), o tratamento mais eficaz do tumor de próstata humana DU-145 foi a terapia combinada de KPU-2 mais taxotere. O efeito do tratamento foi mais pronunciado no começo do estudo e pareceu reduzir à medida em que o estudo progrediu. No tratamento nos Dias 20-27, a terapia de combinação proporcionou uma TGI aparente que excedeu o critério de NCI

(TGI  $\geq$  58%), e o peso estimado do tumor da terapia combinada foi significativamente menor que para qualquer outra monoterapia.

2. Actividade de KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina isoladamente ou em Combinação com Taxotere no Modelo de Xenoenxerto de Tumor da Próstata Humana DU-145

Baseado nos dados obtidos com KPU-2 em combinação com taxotere no estudo acima descrito, foi iniciado um segundo estudo comparando KPU-2 a KPU-35 e t-butil-fenila-histina isolada e em combinação com taxotere.

As observações feitas durante a porção em vida deste estudo indicaram que a combinação de KPU-2 ou KPU-35 com taxotere tem uma maior redução no crescimento tumoral do que do taxotere isolado (Figura 22). O crescimento tumoral foi quase completamente bloqueado pelo KPU-35 em combinação com taxotere.

Os pesos dos tumores extraídos na autópsia confirmaram as observações feitas durante o segmento em vida do estudo. A combinação de KPU-2 (Figura 23) ou KPU-35 (Figura 24) com taxotere foi significativamente mais eficaz do que com o taxotere isolado, bloqueando o crescimento tumoral. No caso do KPU-35, três entre dez murganhos mostraram evidência de encolhimento do tumor. Os índices de inibição do crescimento tumoral indicaram uma inibição acentuada do crescimento tumoral para KPU-2 (média do grupo = 74,1%) e um bloqueamento quase total para KPU-35 (média do grupo = 92,5%). O taxotere isolado não alcança o critério NCI estabelecido para um efeito positivo (TGA  $\geq$  58%).

## 5. Estudos no Modelo de Xenoenxerto de Tumor de Mama Humana

### MCF-7

Este estudo comparou os efeitos de KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina no Modelo de Xenoenxerto de Tumor de Mama Humana MCF-7. As doses dos compostos foram administradas nos Dias 1, 2, 3, 4, e 7; o taxotere foi administrado nos Dias 1, 3 e 7.

Os novos compostos seleccionados têm inicialmente efeitos estatisticamente significativos quando utilizados em combinação com taxotere neste modelo, aparentemente quase bloqueando completamente o crescimento estimado do tumor (Figura 25). Dos três compostos, KPU-2 pareceu ser o mais eficiente, com a t-butil-fenila-histina também apresentando uma potenciação significativa do taxotere.

## 6. Estudos no Modelo de Xenoenxerto de Células Não-Pequeñas de Tumor Pulmonar Humano A549

As observações em vida durante este estudo (Figura 26) indicaram que a combinação do composto KPU-2 (7,5 mg/kg i.p., qd x 5) com taxotere resultou numa notável inibição do crescimento tumoral, quando comparado ao controlo ou qualquer outro grupo de monoterapia. Isto foi confirmado pelos pesos de tumor da autópsia, já que a média do grupo de co-terapia foi significativamente menor que aquela do taxotere isolado ou do grupo de controlo (Figura 27). Os pesos de tumor do grupo de co-terapia formam um agrupamento de baixos pesos tumoriais, indicando a consistência do efeito.

Quando o índice de crescimento tumoral é calculado, o grupo de co-terapia teve uma TGI de 74,4% quando comparado ao grupo de controlo, excedendo em muito o critério de NCI para um efeito positivo ( $TGI \geq 58\%$ ). O taxotere isolado teve uma TGI de 26,1%.

#### 7. Estudos no Modelo de Xenoenxerto de Tumor Ortotópico de Mama Humana MDA-231

Este modelo envolve a colocação do tecido de tumor humano na almofada adiposa mamária de murganho, um substituto do ambiente natural. Deste modo, é evitada a possibilidade de um efeito positivo devido a uma acção específica no leito vascular subcutâneo. Este estudo comparou o efeito de KPU-2 (7,5 mg/kg i.p., q3d x 5) isolada e em combinação com paclitaxel (16 mg/kg i.p., qd x 5).

Três semanas no estudo e já houve uma substancial inibição do crescimento tumoral no grupo de terapia de combinação, um efeito altamente significativo. Este efeito parecia ser mais acentuado do que para o taxotere isolado (Figura 28).

#### 8. Estudos no Modelo de Tumor Metastático de Melanoma de Murino B16-F10

Este estudo examinou o efeito de KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina isolada e em combinação com paclitaxel no número de metástases que surgem na superfície do pulmão 16 dias depois da injecção intravenosa de células de melanoma B16-F10 no murganho. Este modelo não é um Modelo de xenoenxerto; porém, não envolve um alto grau de vascularização na massa tumoral.

Neste modelo, o tratamento mais eficaz foi de KPU-2 isoladamente (Figura 29), tendo uma média de contagem de metástases de cerca de 10% menos que aquela do paclitaxel (MGI de 41,6% e 35,0%, respectivamente). Embora este estudo não estabelece que a terapia de combinação é mais eficaz que a monoterapia, indica que KPU-2, KPU-35 e t-butil-fenila-histina são muito eficazes em tumores altamente vascularizados.

#### EXEMPLO 10

##### Ensaios de Actividade Contra Fungos Patogénicos

A actividade comparativa de uma desidrofenila-histina ou seu análogo contra um fungo patogénico, relativamente a compostos antifúngicos conhecidos, acima citados, para utilização na determinação do valor de AF/IS da desidrofenila-histina ou seu análogo, é medido directamente contra o organismo fúngico, e. g., através de adaptação de placa de microtitulação do método de macrodiluição do meio NCCLS descrito em Diagn. Micro. And Infect. Diseases 21:129-133 (1995). A actividade antifúngica também pode ser determinada em modelos de infecção fúngica de um animal inteiro. Por exemplo, pode-se utilizar o modelo de mucormicose pulmonar de murganho tratado com esteróide (Goldaill, L. Z. & Sugar, A. M. 1994 J. Antimicrob. Chemother. 33:369-372). A título ilustrativo, nesses estudos, a diversos animais não é dada nenhuma desidrofenila-histina ou o seu análogo, várias doses de desidrofenila-histina ou do seu análogo (e/ou combinações com um ou mais agentes antifúngicos) ou um controlo positivo (por exemplo Anfotericina B), respectivamente, começando antes da, no momento da, ou depois da infecção com o

fungo. Os animais podem ser tratados uma vez a cada 24 horas com a dose seleccionada de desidrofenila-histina ou do seu análogo, com controlo positivo ou somente um veículo. O tratamento é continuado por um número pré-determinado de dias, e. g., até dez dias. Os animais são observados durante algum tempo depois do período de tratamento, e. g., por um total de três semanas, sendo a mortalidade avaliada diariamente. Os modelos podem envolver modelos sistémicos, pulmonares, vaginais e outros de infecção com ou sem outros tratamentos (e. g., tratamento com esteróides) concebidos para mimetizar um indivíduo humano suscetível à infecção.

Para ilustração adicional, um método para determinar a eficiência *in vivo* da terapia ( $ED_{50}$ , e. g., expresso em mg de desidrofenila-histina ou seu análogo/kg do indivíduo), é um sistema de modelo de roedor. Por exemplo, um murganho é infectado com o patogénio fúngico tal como através de infecção intravenosa com cerca de 10 vezes a dose 50% letal do patogénio ( $10^6$  células de *C. Albicans*/murganho). Imediatamente após a infecção fúngica, os compostos de desidrofenila-histina são administrados ao murganho a um volume dosado pré-determinado. O  $ED_{50}$  é calculado pelo método de Van der Waerden (Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. 195:389-412, 1940) a partir da taxa de sobrevivência registada no 20º dia pós-infecção. Geralmente, os animais de controlo sem tratamento morrem de 7 a 13 dias pós-infecção.

Noutra forma de realização ilustrativa, *C. Albicans* Wisconsin (C43) e *C. Tropicalis* (C112), cultivados em agar de dextrose Sabouraud (SDA) inclinado durante 48 h a 28 °C, são suspensos em soro fisiológico e ajustados para transmissão de 46% a 550 nm num espectrofotómetro. O inócuo é ainda ajustado

por hemacitómetro e confirmado por contagens de placa como sendo aproximadamente 1 ou  $5 \times 10^7$  CFU/mL. Murganhos CF-1 são infectados por injeção de 1 ou  $5 \times 10^6$  CFU na veia da cauda. Os agentes antifúngicos são administrados intravenosamente ou subcutaneamente em etanol e água (10:90), 4 h pós-infecção e depois disso uma vez diariamente durante 3 ou 4 dias. A sobrevivência é monitorizada diariamente. O ED<sub>50</sub> pode ser definido como aquela dose que permite 50% de sobrevivência dos murganhos.

#### EXEMPLO 11

##### Avaliação da Actividade Antimicótica

As benzimidazoles e griseofulvina são agentes antitubulina capazes de se ligarem a microtúbulos fúngicos. Uma vez ligados, estes compostos interferem com a divisão celular e o transporte intracelular em organismos sensíveis, resultando em morte celular. Comercialmente, as benzimidazoles são utilizadas como agentes fungicidas em medicina veterinária e no controlo de doenças de plantas. Uma ampla variedade de espécies fúngicas, incluindo *Botrytis Cinerea*, *Beauveria Bassiana*, *Helminthosporium Solani*, *Saccharomyces Cerevisiae* e *Aspergillus* são susceptíveis a estas moléculas. Questões de toxicidade e a crescente resistência aos fármacos, porém, tiveram um impacto negativo na sua utilização. A griseofulvina é clinicamente utilizada para tratar infecções de tinta da pele, cabelos e unhas, provocadas por *Trichophyton Sp.*, *Microsporum Sp.* e *Epidermophyton Floccosum*. Porém, o seu espectro antifúngico é restrito a esta classe de organismos fúngicos. A genotoxicidade é também um efeito colateral significativo. A terbinafina, enquanto um

tratamento alternativo de primeira linha, é mais caro. Além disso, foi observada recentemente resistência clínica em *Trichophyton Rubrum* (o principal agente causador de todas as infecções dermatófitas).

Em *Candida Albicans*, a formação de microtúbulos/microfilamentos é afectada quando as células são expostas aos inibidores de microtúbulos nocodazole e cloropropam. Estes resultados validam adicionalmente a exploração de inibidores de citoesqueleto como agentes antimicóticos eficazes. Por conseguinte, vários dos compostos aqui divulgados foram avaliados para a actividade antimicótica.

Especificamente, os compostos divulgados foram avaliados ao lado de inibidores de microtubulina comercialmente disponíveis, assim como agentes antifúngicos reconhecidos. Os compostos de teste e controlos utilizados neste estudo: (-)-Fenila-histina, KPU-1, KPU-2, KPU-11 e KPU-17, KPU-35, t-butil-fenila-histina, Colchicina (inibidor de microtubulina comercial testado contra 3 isolados de *Candida*), Benomil (inibidor de microtubulina comercial testado contra 3 isolados de *Candida*), Griseofulvina (inibidor de microtubulina comercial e antibiótico de controlo para teste versus 6 *Dermatophyte* Isolado), Anfotericina B (antibiótico de controlo para teste contra 3 isolados de *Candida*), Itraconazole (antibiótico de controlo para teste contra 2 isolados de *Aspergillus*).

Os microrganismos contra os quais estes compostos foram testados incluíram: *Candida Albicans*, *Candida Galbrata*, *Aspergillus Fumigatus*, *Trichophyton Rubrum*, *Trichophyton Mentagrophytes*, *Epidermophyton Floccosum*. Com a excepção de

*Candida Galbrata* (um isolado), foram testados dois isolados de cada espécie.

O teste de susceptibilidade antifúngica foi realizado de acordo com os métodos delineados no Comité Nacional para Padrões Clínicos de Laboratório, M38-A, "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming Filamentous Fungi; Approved Standard". Isto inclui o teste em RPMI-1640 com glutamina e sem bicarbonato, um tamanho de inócuo de  $0,4 - 5 \times 10^4$ , e incubação a 30 ou 35 °C durante 48 horas. A concentração mínima inibidora (CMI) foi definida como a mais baixa concentração que resultou numa redução de 80% na turbidez quando comparada com um tubo de ensaio de controlo livre de fármaco. As concentrações de fármaco foram de 0,03-16 µg/mL para os compostos em investigação, 0,015-8 µg/mL para itraconazole e griseofulvina.

A concentração mínima inibidora (CMI) na qual um composto preveniu o crescimento do microrganismo alvo foi avaliada de acordo com a versão modificada do protocolo NCCLS. As concentrações mínimas inibidoras (CMI) foram determinadas no primeiro intervalo de 24 horas em que o crescimento poderia ser determinado no tubo de ensaio de controlo livre de fármacos. A CMI definida foi a mais baixa concentração que apresentou uma redução de 80% na turbidez quando comparada ao controlo de crescimento. A concentração mínima letal (CML) foi determinada por plaqueamento de 0,1 µL da concentração CMI e cada concentração acima da CMI. A CML foi atribuída à primeira concentração que apresentou cinco ou menos colónias de crescimento fúngico representando 99,95% de mortes. Quando uma CMI foi obtida, uma concentração mínima fungicida (CMF) foi determinada para avaliar a natureza fungo-estática/fungicida do

composto. Este processo requer diluição de amostras de células tratadas com fármaco (removidas de poços de teste contendo composto com a CMI, e acima desta) para concentrações de composto significativamente abaixo da concentração inibidora e depositando-as em placas de agar. O composto é pontuado como fungostático se as células puderem retomar o crescimento, e fungicida se não for possível crescimento adicional devido ao composto ter morto os organismos.

Os compostos aqui divulgados demonstraram ser eficazes contra duas espécies de *Trichophyton*. *T. Rubrum* é o principal agente causador para infecções dermatofíticas humanas e seria o organismo fundamental como alvo do desenvolvimento de um agente clínico.

Os compostos KPU-2, KPU-11 e KPU-17, KPU-35 e t-butil-fenila-histina foram equivalentes em potência ou nalguns casos mais potentes que a griseofulvina, um agente farmacêutico convencional corrente, utilizado para tratar infecções dermatofíticas.

Os compostos (-)-Fenila-histina e KPU-1 foram significativamente menos potentes que os outros compostos quando testados versus *T. Rubrum* e mais fracos mas mais comparáveis aos outros contra o isolado de *T. Mentagrophytes* sensível.

Nesses casos, quando uma MFC pudesse ser determinada, os resultados indicaram que estes compostos são fungostáticos por natureza (ver Tabelas 19 e 20).

**Tabela 19.** Actividade antifúngica de Desidrofenila-histinas e dos seus Análogos

Composto	CMI e CMF, µg/mL									
	<i>C. Albicans</i> 90028		<i>C. Albicans</i> 10231		<i>C. Galbrata</i>		<i>A. Fumigatus</i> isolado Nº1		<i>A. Fumigatus</i> isolado Nº2	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
(-)-Fenila-histina	>70	ND**	>70*	ND	>70	ND	>16	ND	>16	ND
KPU-1	>68*	ND	>68	ND	>68	ND	>16	ND	>16	ND
KPU-2	>32	ND	>32	ND	>32	ND	>16	ND	>16	ND
KPU-11 e KPU-17	>32	ND	>32	ND	>32	ND	>16	ND	0,06	>16
KPU-35	>32	ND	>32	ND	>32	ND	>16	ND	< 0,03	0,125
t-butil-fenila-histina	>32	ND	>32	ND	>32	ND	>16	ND	< 0,03	0,125
Anfotericina B	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	ND	ND	ND	ND
Griseofulvina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,5	ND
Itraconazole	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND
Colchicina	>128	ND	>128	ND	>128	ND	ND	ND	ND	ND
Benomil	64	>512	64	>512	64	>512	ND	ND	ND	ND

**Tabela 20.** Actividade Antifúngica de Desidrofenila-histinas e dos seus Análogos

Composto	CMI e CMF, $\mu\text{g/mL}$											
	<i>T. Rubrum</i> isolado Nº1		<i>T. Rubrum</i> isolado Nº2		<i>T. Menta-</i> <i>grophytes</i> isolado Nº1		<i>T. Menta-</i> <i>grophytes</i> isolado Nº2		<i>E.</i> <i>Flocco-</i> <i>sum</i> isolado Nº1		<i>E.</i> <i>Flocco-</i> <i>sum</i> isolado Nº2	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF		CMF
NPI2350	>16	ND	0,16	>16	16	>16	>16	ND	>16	ND	>16	ND
NPI2352	>16	ND	0,25	>16	4	>16	>16	ND	>16	ND	>16	ND
NPI2358	>16	ND	<0,03	0,125	2	>16	>16	ND	>16	ND	>16	ND
NPI2362	0,06	>16	<0,03	<0,03	1	>16	>16	ND	>16	ND	>16	ND
NPI2386	<0,03	0,125	<0,03	0,06	1	>16	>16	ND	>16	ND	>16	ND
NPI2460	<0,03	0,125	<0,03	<0,03	4	>16	>16	ND	>16	ND	>16	ND
Anfo-tericina B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Griseofulvina	0,5	ND	<0,015	ND	1	ND	2	ND	2	ND	4	ND
Itraconazole	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Colchicina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Benomil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Os exemplos descritos acima são apresentados apenas para ajudar na compreensão da invenção. Assim, os especialistas na técnica entenderão que os métodos e compostos divulgados englobam e podem, caso contrário, proporcionar derivados adicionais da desidrofenila-histina.

O especialista na técnica entenderá prontamente que a presente invenção está bem adaptada para obter, por exemplo, os fins e vantagens mencionadas, assim como outras inerentes. Os métodos e processos aqui descritos são presentemente representativos de formas de realização preferidas e são

exemplificativos. Modificações e outras utilizações irão ocorrer para os especialistas na técnica, as quais estão abrangidas no espírito da invenção.

Será prontamente evidente ao especialista na técnica que podem ser feitas substituições e modificações variadas à invenção aqui divulgada sem fugir do âmbito e espírito da invenção.

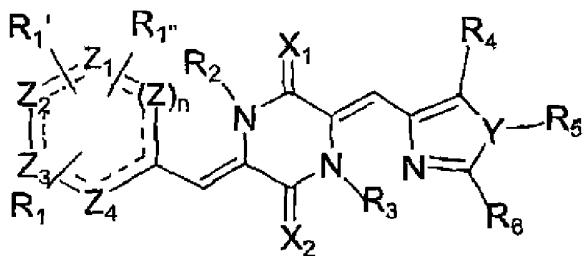
Como assinalado acima, todas as patentes e publicações mencionadas na descrição são indicativas dos níveis dos especialistas na técnica à qual a invenção pertence.

A invenção descreve aqui ilustrativamente pode ser praticada adequadamente na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações que não estejam especificamente aqui divulgados. Os termos e expressões que foram utilizados são utilizados como termos de descrição e não de limitação, e não há intenção de que na utilização desses termos e expressões isto indique a exclusão de equivalentes das características mostradas e descritas ou de suas porções. É reconhecido que várias modificações são possíveis dentro do âmbito da invenção. Assim, deve ser entendido que embora a presente invenção tenha sido especificamente divulgada através de formas de realização preferidas e características opcionais, modificações e variações dos conceitos aqui divulgados podem ser recorridas por especialistas na técnica, e que essas modificações e variações são consideradas como dentro do âmbito da invenção. O âmbito da invenção está unicamente definido pelas seguintes reivindicações.

Lisboa, 2 de Janeiro de 2008

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para a preparação sintética de um composto tendo a estrutura de Fórmula (I):



em que

$R_1$ ,  $R_4$  e  $R_6$  são, cada, separadamente, seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo $C_1-C_{24}$  saturado, alcenilo $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos, hidroxilo, carboxilo,  $-CO-O-R_7$ , ciano, tioalquilo, alquilo halogenado incluindo alquilo poli-halogenado, carbonilo halogenado e carbonilo  $-CCO-R_7$ , em que  $R_7$  é seleccionado de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo $C_1-C_{24}$  saturado, alcenilo $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos;

$R_1'$  e  $R_1''$  são, cada um independentemente, seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alceniloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos, hidroxilo, carboxilo, -CO-O-R<sub>7</sub>, ciano, tioalquilo, alquilo halogenado incluindo alquilo poli-halogenado, carbonilo halogenado e carbonilo -CCO-R<sub>7</sub>, em que R<sub>7</sub> é seleccionado de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alceniloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos;

$R_1'$  e  $R_1''$  são covalentemente ligados um ao outro ou não são covalentemente ligados um ao outro;

$R_2$ ,  $R_3$ , e  $R_5$  são, cada, separadamente, seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> saturado, alceniloC<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> insaturado, acilo, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro e grupos nitro substituídos, sulfonilo e grupos sulfonilo substituídos;

$X_1$  e  $X_2$  são separadamente seleccionados do grupo consistindo de um átomo de oxigénio, um átomo de azoto e um átomo de enxofre, cada, sendo não substituído ou substituído com um grupo  $R_5$ , conforme acima definido;

$Y$  é seleccionado do grupo consistindo de um átomo de azoto, um átomo de azoto substituído com  $R_5$ , um átomo de oxigénio, um átomo de enxofre, um átomo de enxofre oxidado, um grupo metíleno e um grupo de metíleno substituído;

$n$  é um número inteiro igual a zero, um ou dois;

$Z$ , para cada  $n$  separado, se  $n$  não for zero, e  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  e  $Z_4$  são, cada, separadamente, seleccionados de um átomo de carbono, um átomo de enxofre, um átomo de azoto ou um átomo de oxigénio; e

as ligações a tracejado podem ser ligações simples ou duplas;

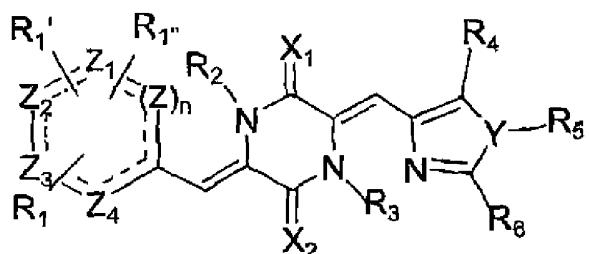
o referido método compreendendo:

fazer reagir uma diacildicetopiperazina com um primeiro aldeído para produzir um intermediário; e

fazer reagir o referido intermediário com um segundo aldeído para produzir o referido composto, em que o referido primeiro aldeído e o referido segundo aldeído são seleccionados do grupo consistindo de um oxazolecarboxaldeído,

imidazolecarboxaldeído, um benzaldeído, derivados de imidazolecarboxaldeído e derivados de benzaldeído, formando assim o composto.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o referido primeiro aldeído é um imidazolecarboxaldeído ou benzaldeído.
3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o referido segundo aldeído é um benzaldeído ou imidazolecarboxaldeído.
4. Composto tendo a estrutura de Fórmula (I):



em que

$R_1$  e  $R_6$  são, cada, separadamente, seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquilo $C_1-C_{24}$  saturado, alcenilo $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos, hidroxilo, carboxilo,  $-CO-O-R_7$ , ciano, tioalquilo, alquilo halogenado incluindo alquilo poli-halogenado, carbonilo halogenado e

carbonilo  $-\text{CCO}-\text{R}_7$ , em que  $\text{R}_7$  é seleccionado de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alceniloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos;

$\text{R}_4$  é um grupo butilo terciário;

$\text{R}_1'$  e  $\text{R}_1''$  são, cada, independentemente, seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alceniloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos, hidroxilo, carboxilo,  $-\text{CO}-\text{O}-\text{R}_7$ , ciano, tioalquilo, alquilo halogenado incluindo alquilo poli-halogenado, carbonilo halogenado e carbonilo  $-\text{CCO}-\text{R}_7$ , em que  $\text{R}_7$  é seleccionado de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alceniloC<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro, azido, nitro substituído, fenilo e grupos fenilo substituídos;

$\text{R}_1'$  e  $\text{R}_1''$  são covalentemente ligados um ao outro ou não são covalentemente ligados um ao outro;

$R_2$ ,  $R_3$  e  $R_5$  são, cada, separadamente, seleccionados do grupo consistindo de um átomo de hidrogénio, um átomo de halogéneo e alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> saturado, alceniloC<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> insaturado, acilo, cicloalquilo, cicloalcenilo, alcoxilo, cicloalcoxilo, arilo, arilo substituído, heteroarilo, heteroarilo substituído, amino, amino substituído, nitro e grupos nitro substituídos, sulfonilo e grupos sulfonilo substituídos;

$X_1$  e  $X_2$  são separadamente seleccionados do grupo consistindo de um átomo de oxigénio, um átomo de azoto e um átomo de enxofre, cada, sendo não substituído ou substituído com um grupo  $R_5$ , conforme acima definido;

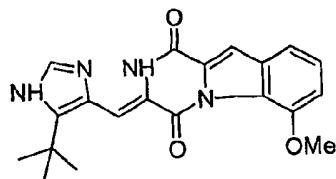
$Y$  é seleccionado do grupo consistindo de um átomo de azoto, um átomo de azoto substituído com  $R_5$ , um átomo de oxigénio, um átomo de enxofre, um átomo de enxofre oxidado, um grupo metíleno e um grupo de metíleno substituído;

$n$  é um número inteiro igual a zero, um ou dois;

$Z$ , para cada  $n$  separado, se  $n$  não for zero, e  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  e  $Z_4$  são, cada, separadamente, seleccionados de um átomo de carbono, um átomo de enxofre, um átomo de azoto ou um átomo de oxigénio; e

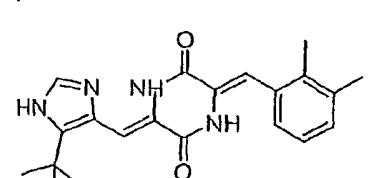
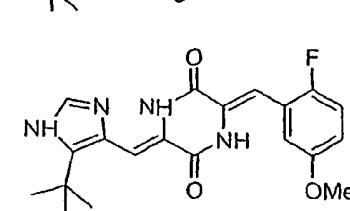
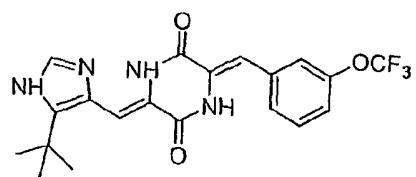
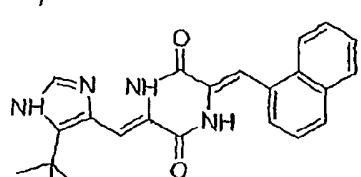
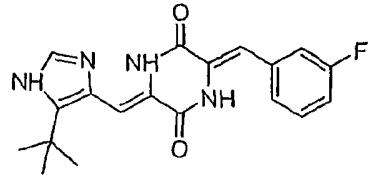
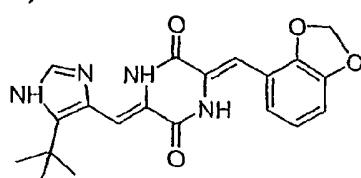
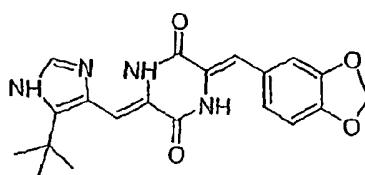
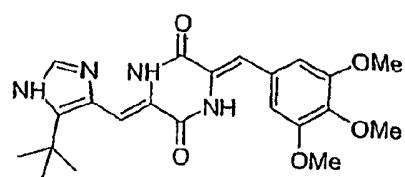
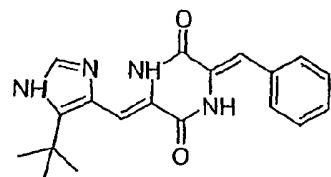
as ligações a tracejado podem ser ligações simples ou duplas.

5. Composto tendo a estrutura



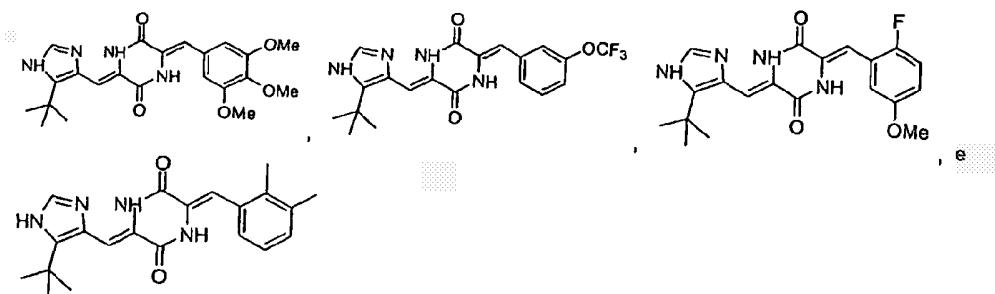
6. Método ou composto de acordo com as reivindicações 1 ou 4, em que cada  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_5$  e  $R_6$  é um átomo de hidrogénio.
7. Método ou composto de acordo com as reivindicações 1 ou 4, em que cada  $X_1$  e  $X_2$  é um átomo de oxigénio.
8. Método ou composto de acordo com a reivindicação 1, em que  $R_4$  é um alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> saturado.
9. Método ou composto de acordo com a reivindicação 8, em que o referido alquiloC<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> saturado é um grupo butilo terciário.
10. Método ou composto de acordo com as reivindicações 1 ou 4, em que  $R_1$  compreende um fenilo substituído.
11. Método ou composto de acordo com a reivindicação 10, em que o referido grupo fenilo substituído é metoxibenzeno.
12. Método ou composto de acordo com as reivindicações 1 ou 4, em que n é igual a zero ou um.
13. Método ou composto de acordo com as reivindicações 1 ou 4, em que n é igual a um.

14. Método ou composto de acordo com as reivindicações 1 ou 4, em que n é igual a um e Z, Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> e Z<sub>4</sub> são cada, um átomo de carbono.
15. Método ou composto de acordo com as reivindicações 1 ou 4, em que o referido composto é seleccionado do grupo consistindo de:



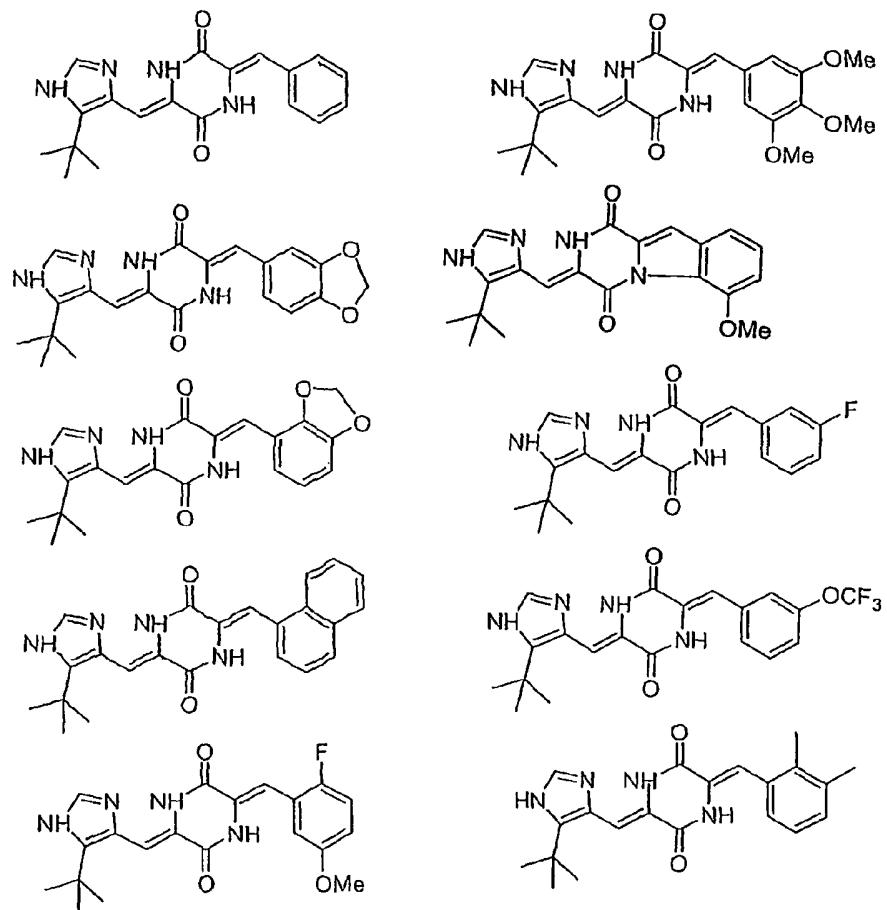
16. Composição farmacêutica compreendendo o composto das reivindicações 4 ou 5 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

17. Composição farmacêutica da reivindicação 16, em que o referido composto é seleccionado do grupo consistindo em:



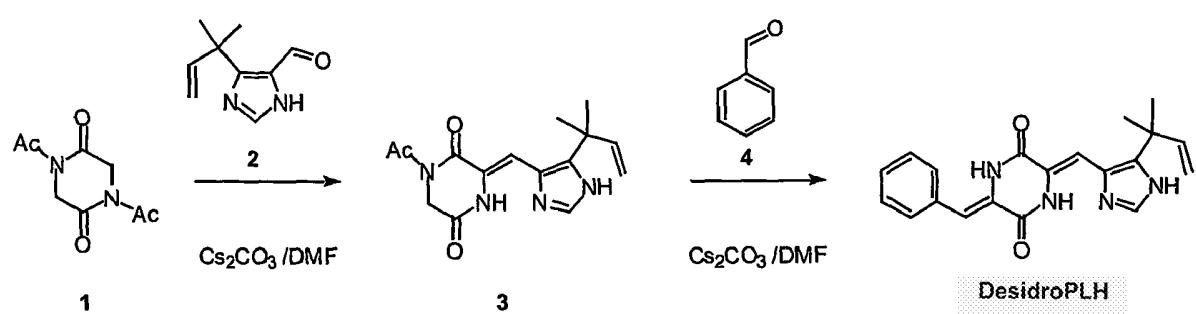
18. Composição farmacêutica da reivindicação 16, em que o referido composto tem uma actividade citotóxica.
19. Composição farmacêutica da reivindicação 16, em que o referido composto é um inibidor do ciclo celular.
20. Composição farmacêutica da reivindicação 16 para tratamento ou prevenção de uma infecção fúngica.
21. Composição farmacêutica da reivindicação 16 para tratamento ou prevenção de tumor.
22. Utilização de um composto das reivindicações 4 ou 5 na preparação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de, pelo menos, uma infecção fúngica num mamífero que sofre de, pelo menos, uma infecção fúngica.
23. Utilização de um composto das reivindicações 4 ou 5 na preparação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção do cancro num mamífero que sofre de cancro.

24. Utilização das reivindicações 22 ou 23, em que o referido composto é seleccionado do grupo consistindo em:



25. Composto das reivindicações 4 ou 5 para utilização como um medicamento.

Lisboa, 2 de Janeiro de 2008



**Figura 1**

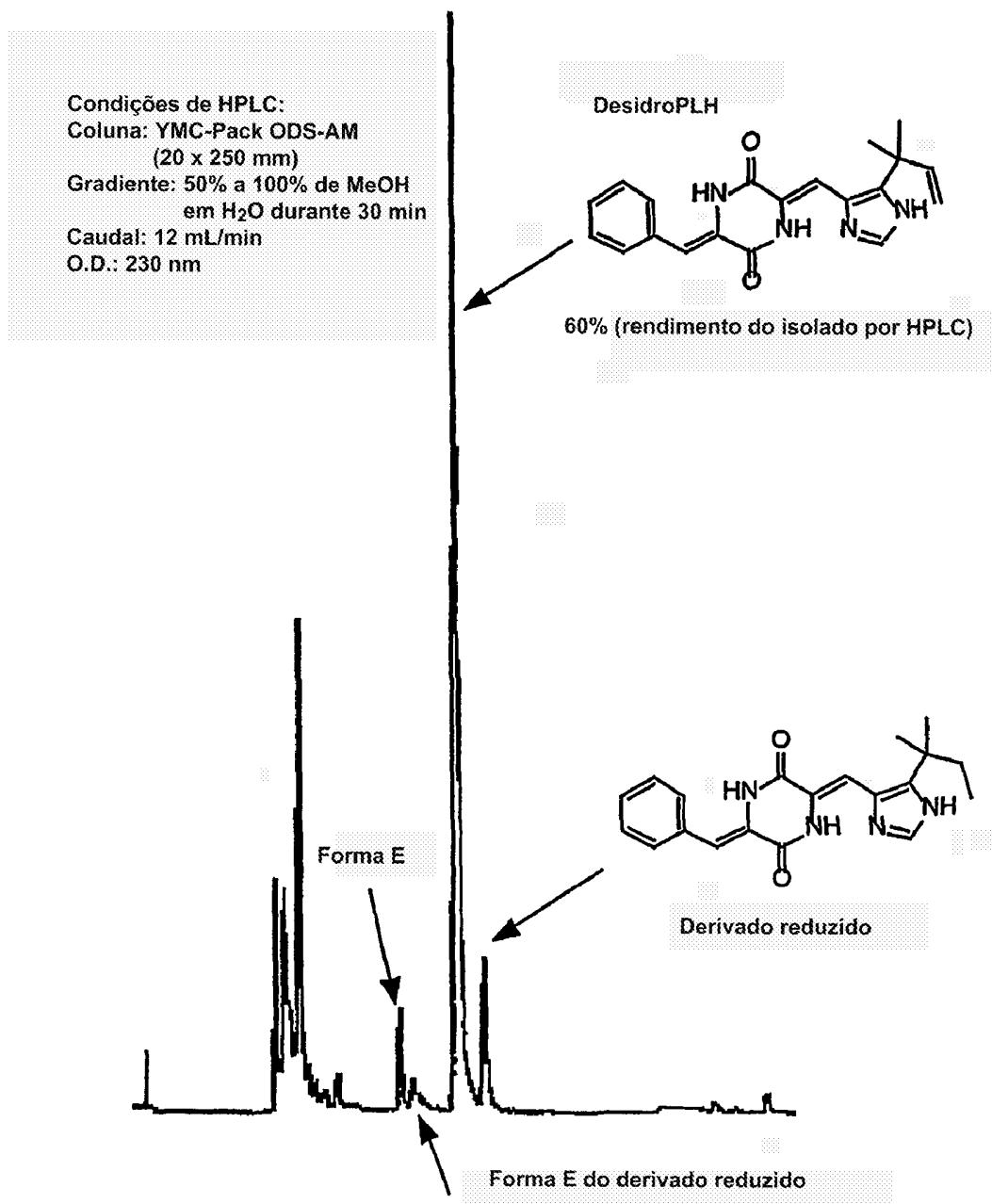


Figura 2

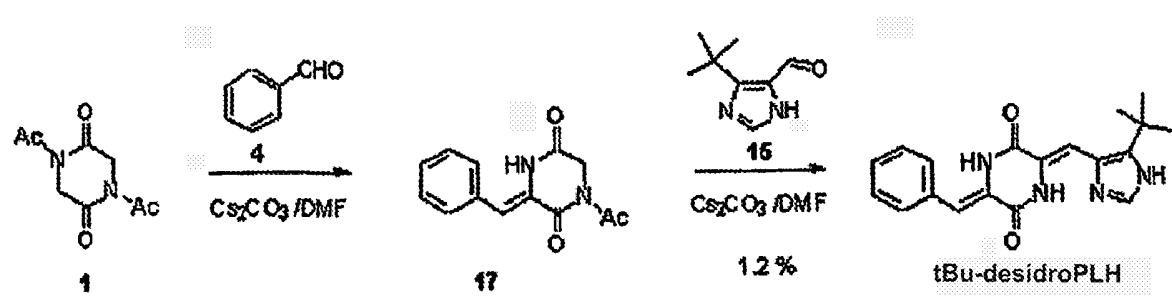


Figura 3

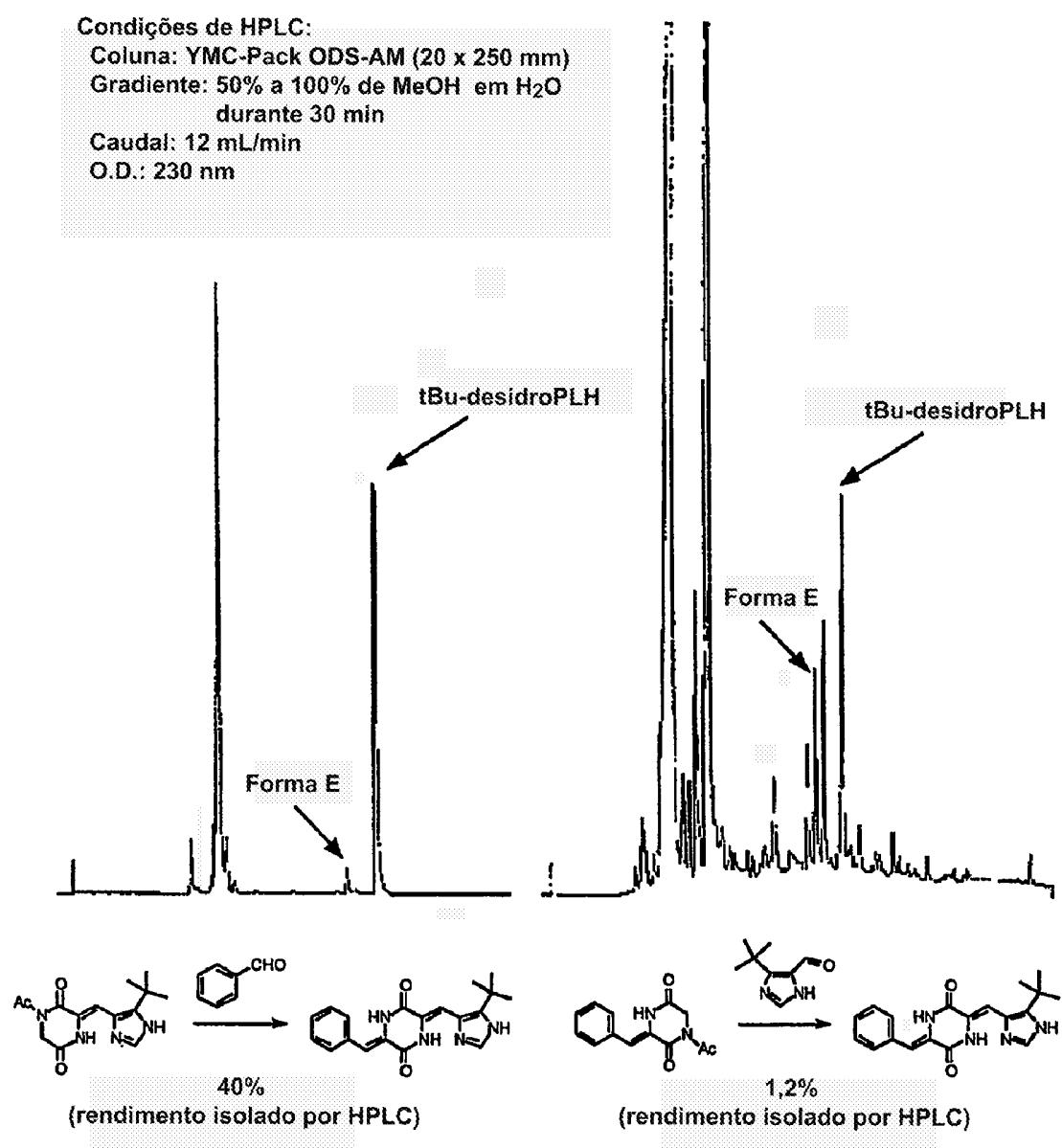


Figura 4

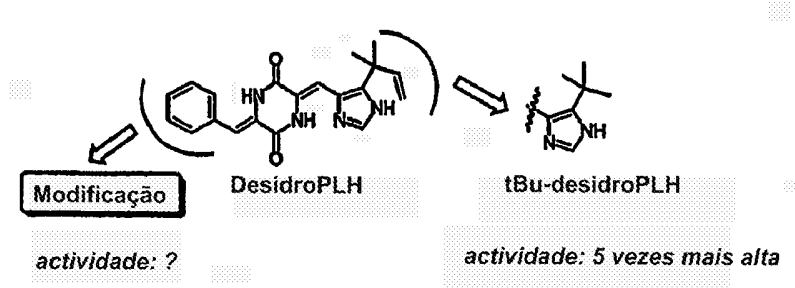
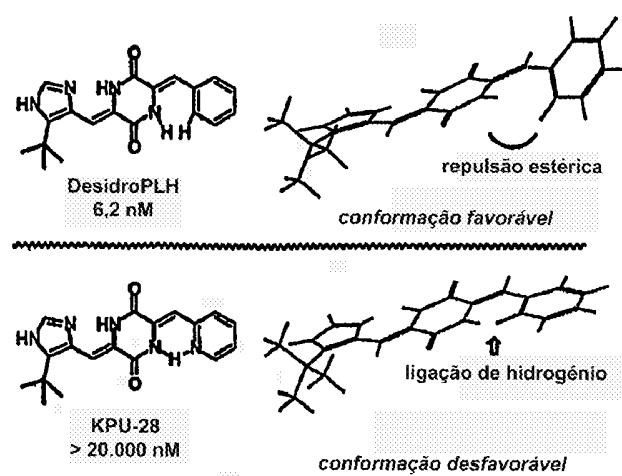
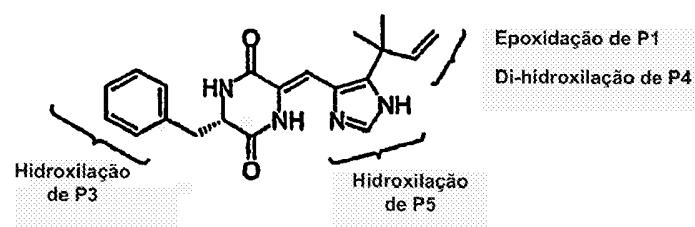


Figura 5



**Figura 6**



**Figura 7**

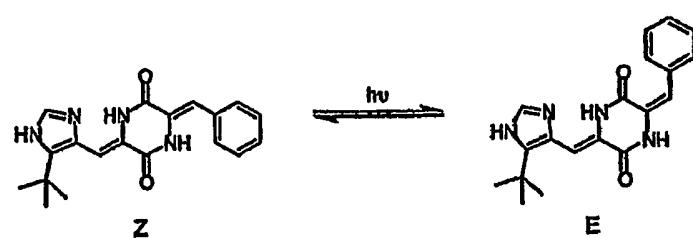


Figura 8

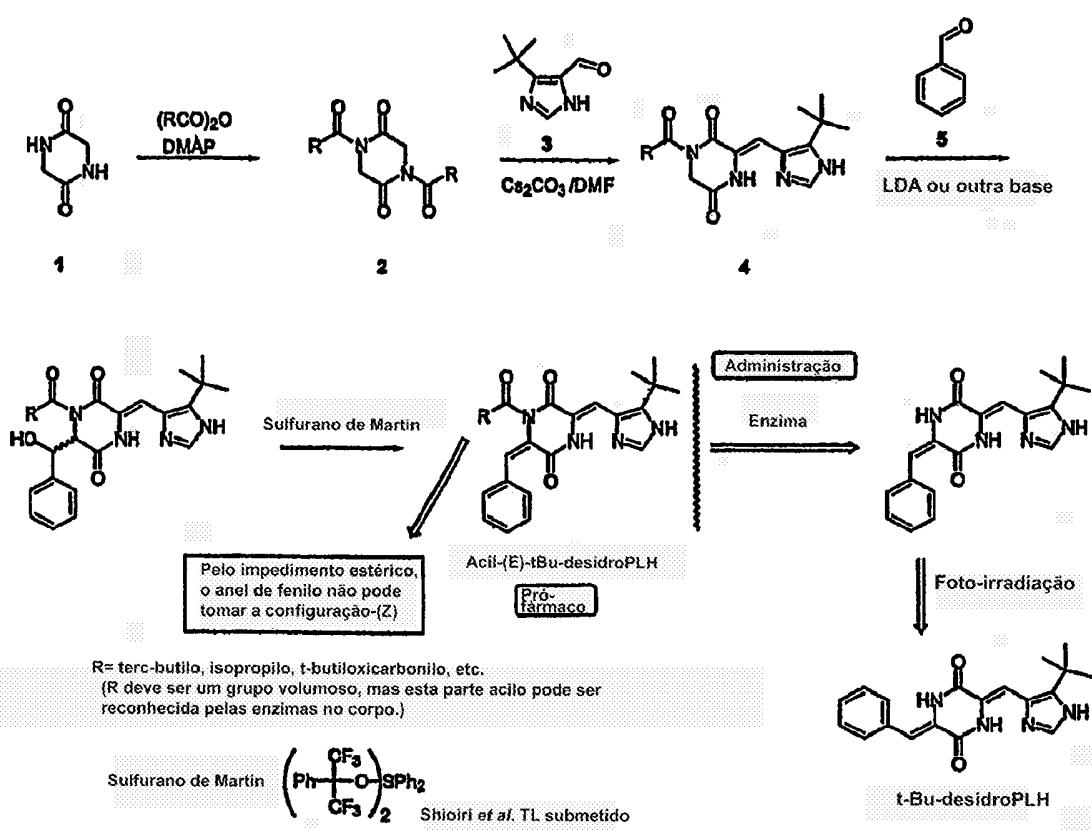
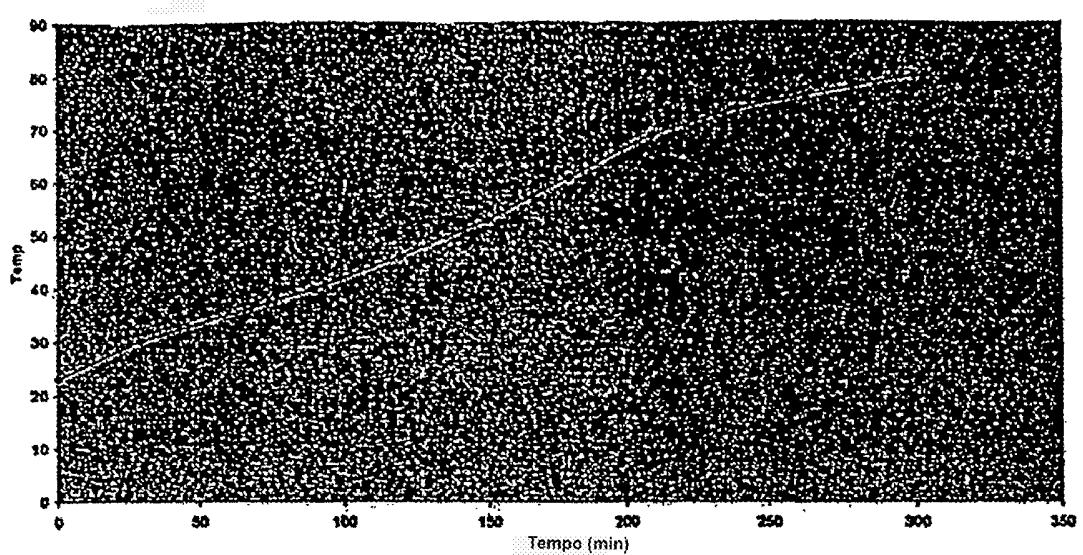
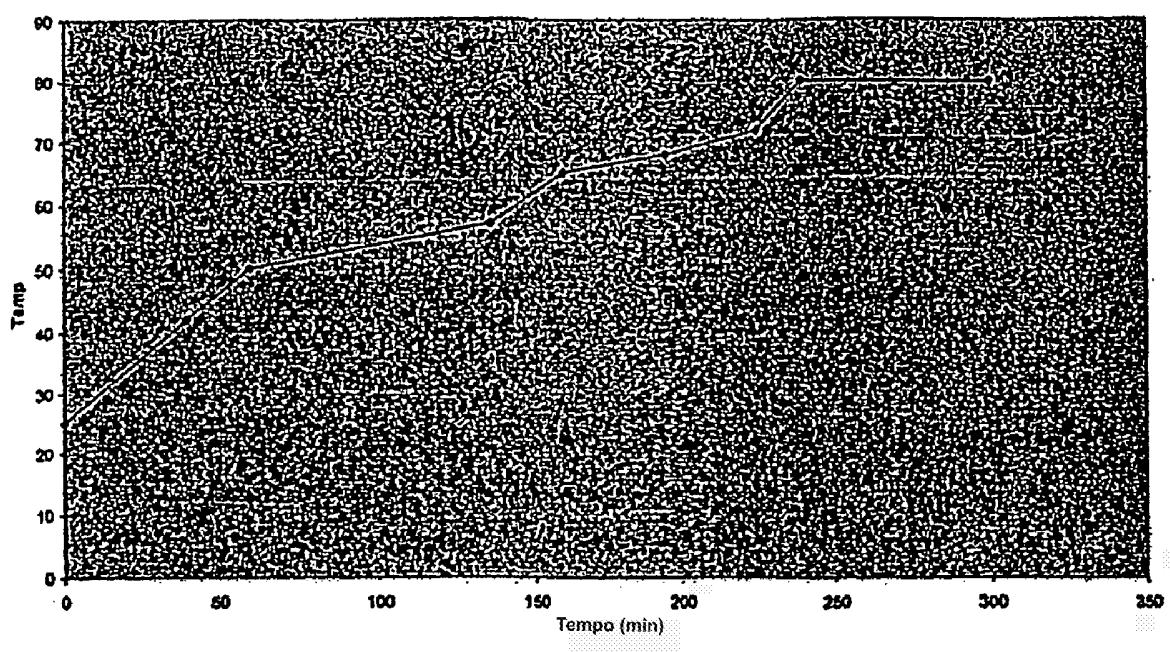


Figura 9



**Figura 10**



**Figura 11**

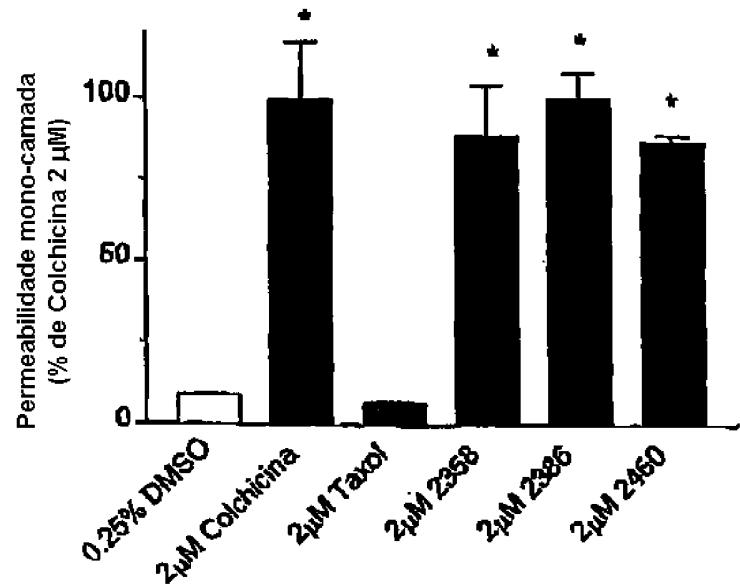


Figura 12

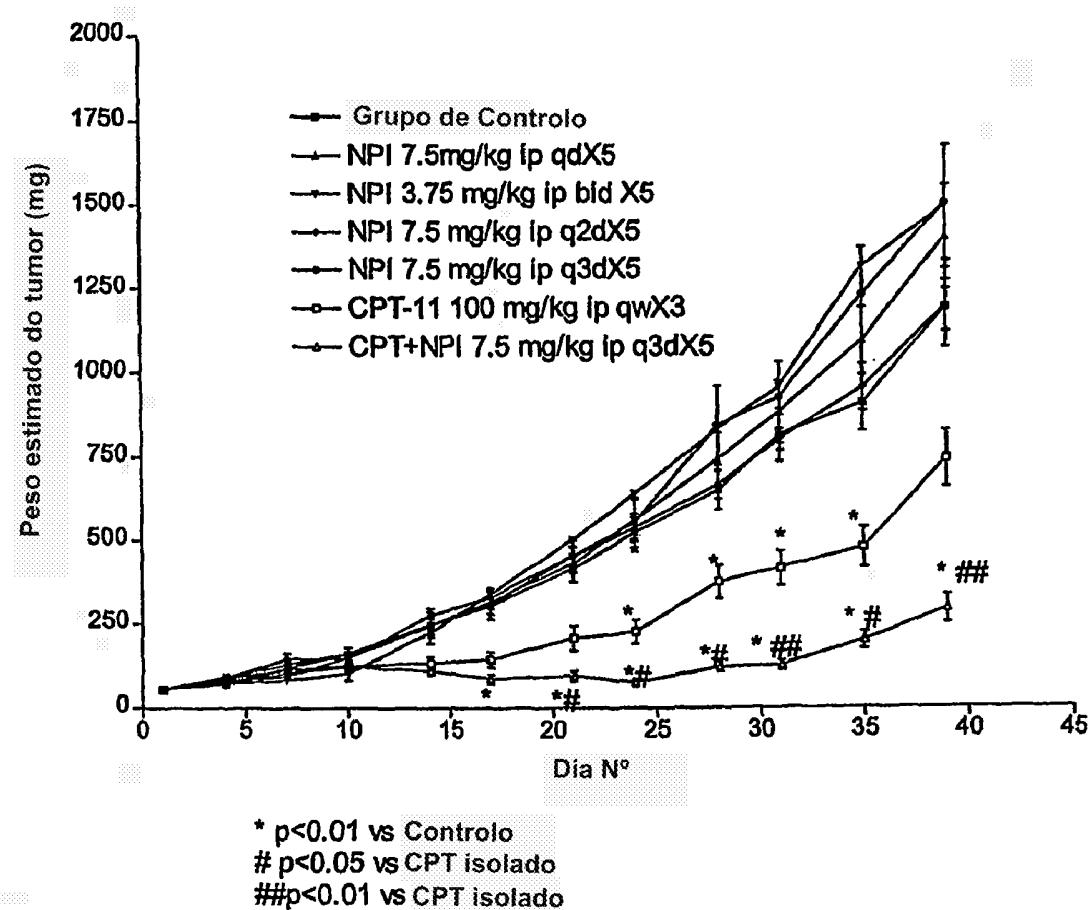
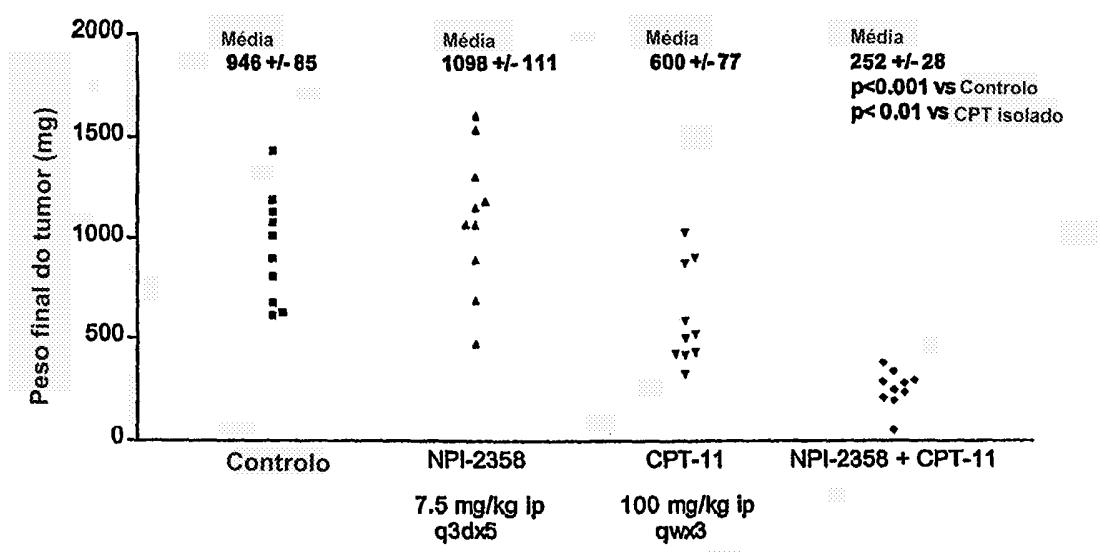


Figura 13



**Figura 14**

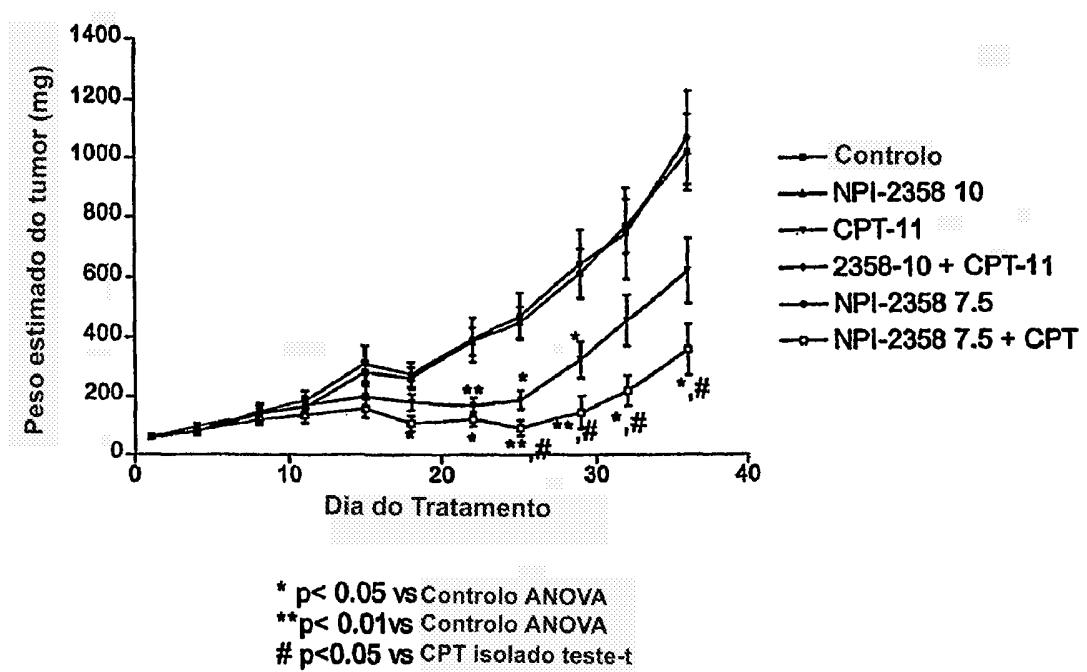


Figura 15

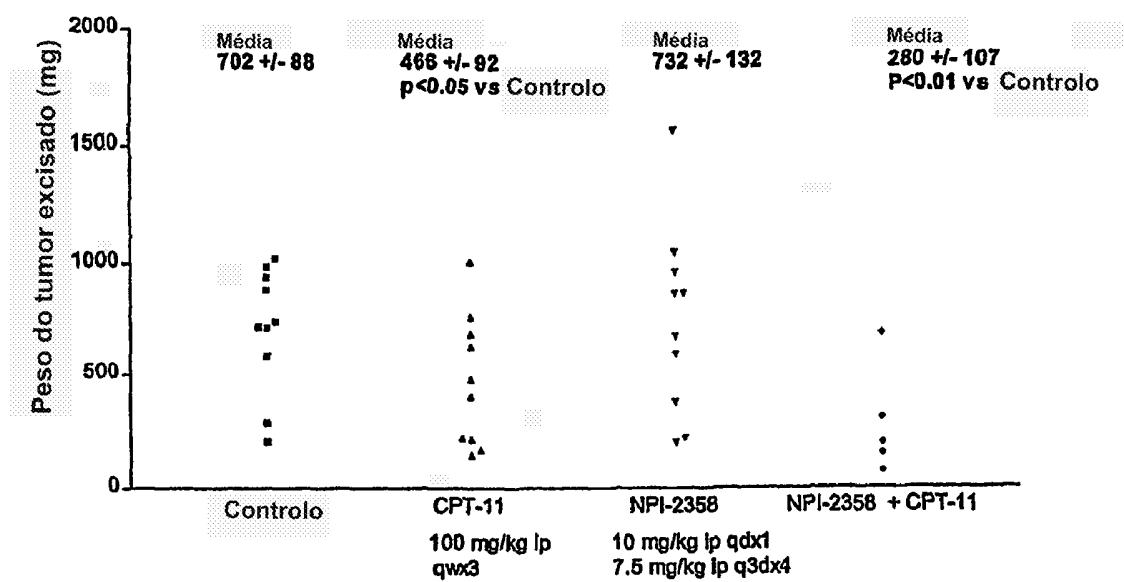


Figura 16

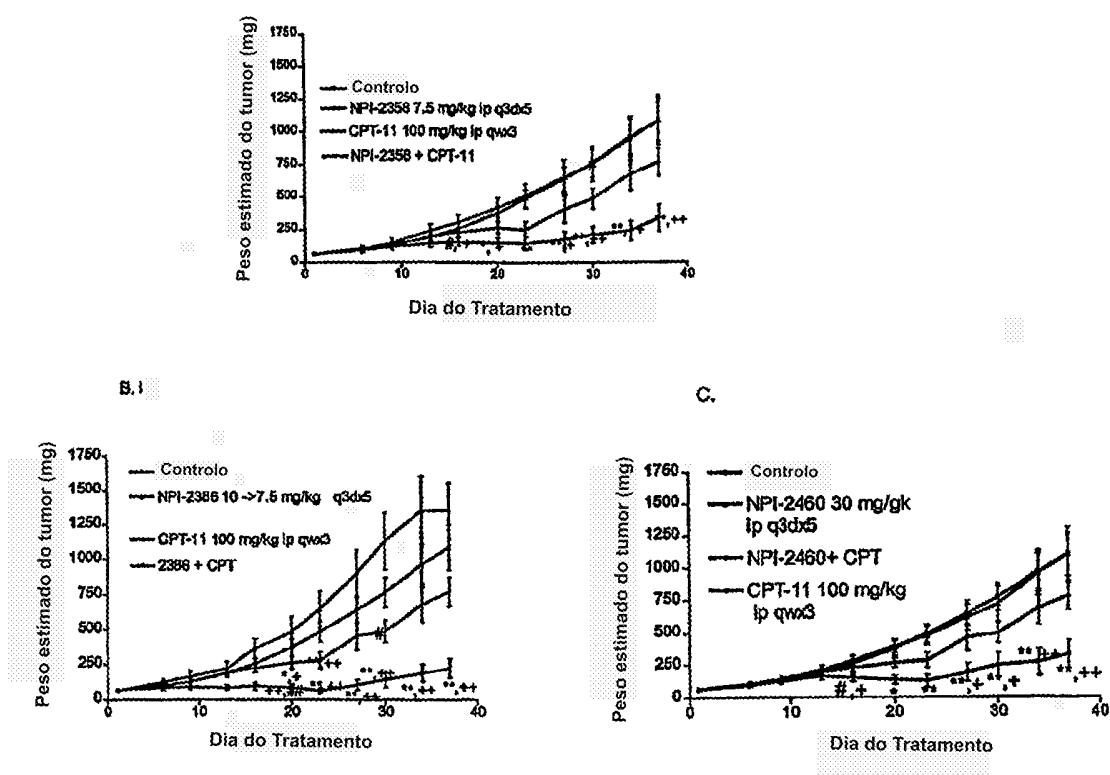


Figura 17

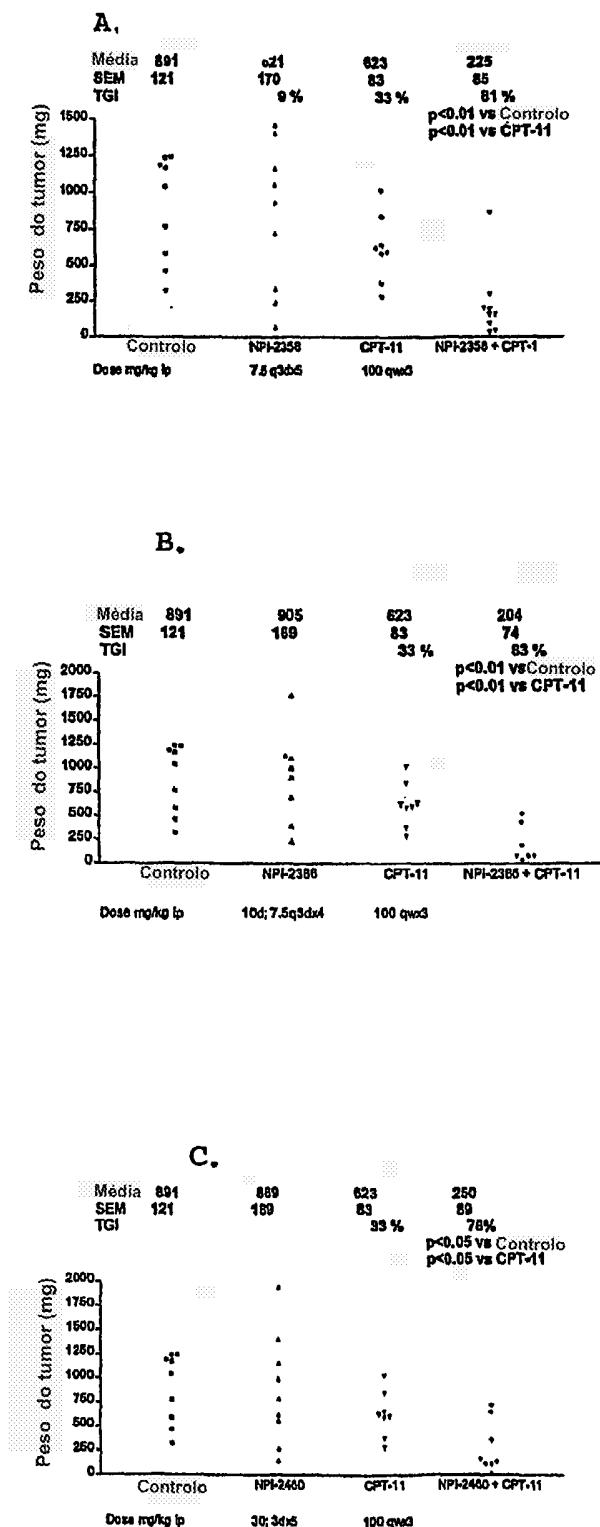


Figura 18

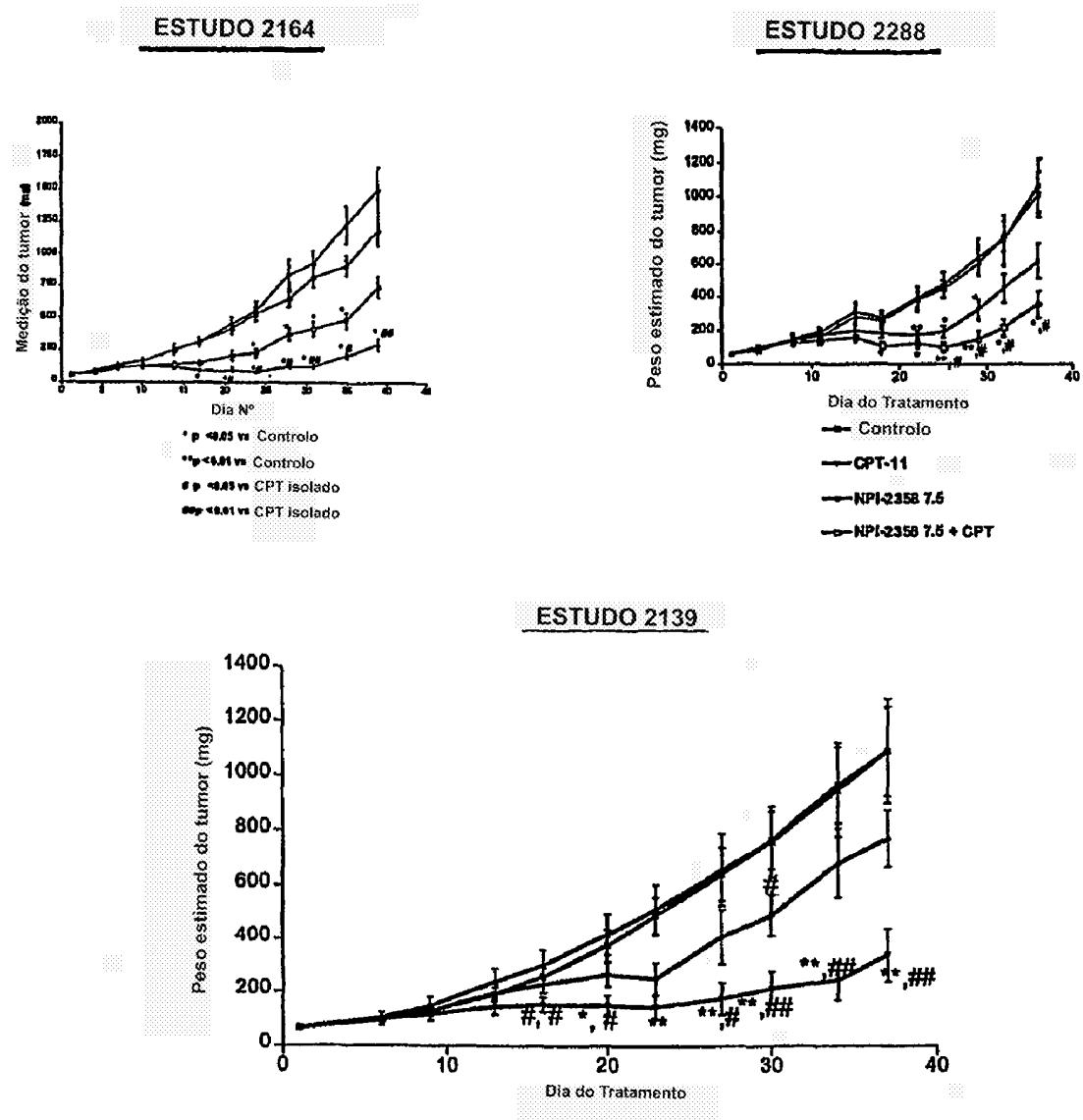


Figura 19

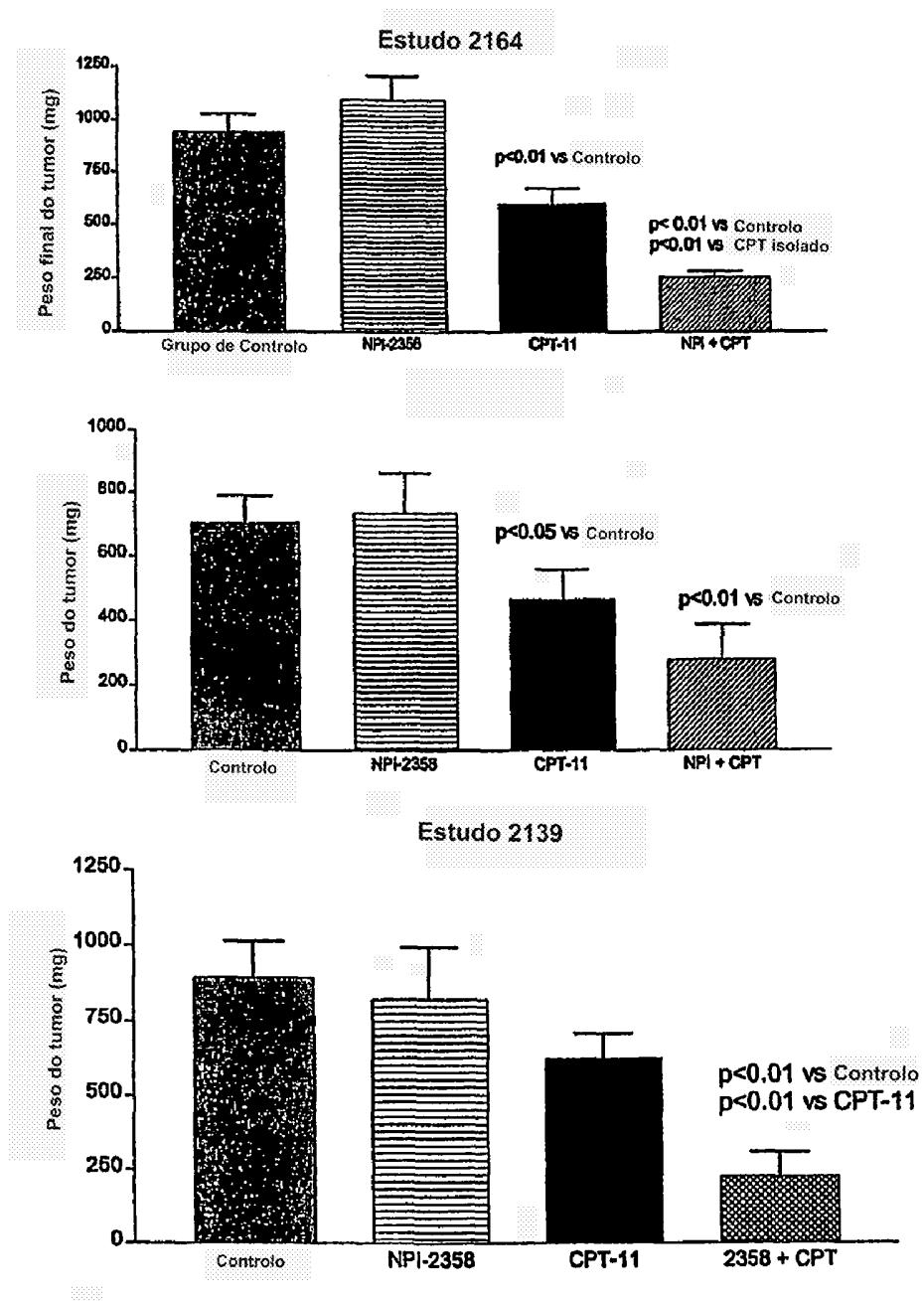


Figura 20

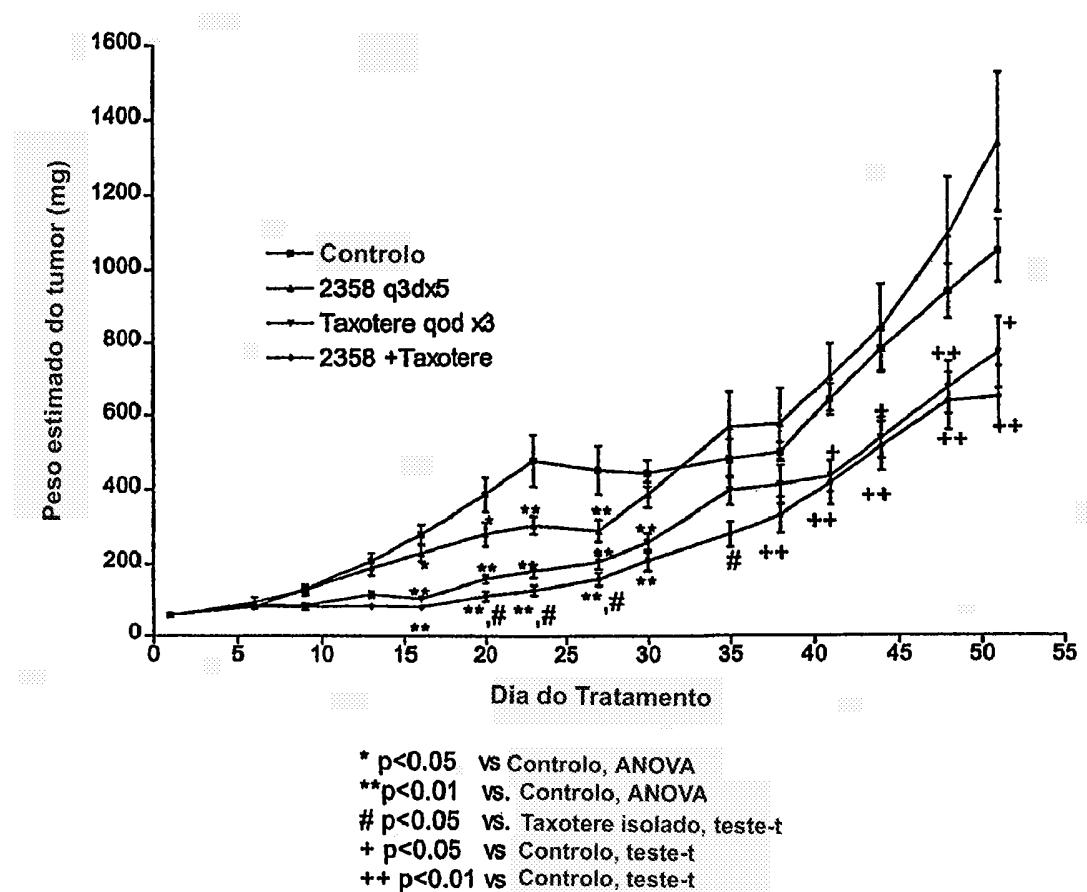


Figura 21

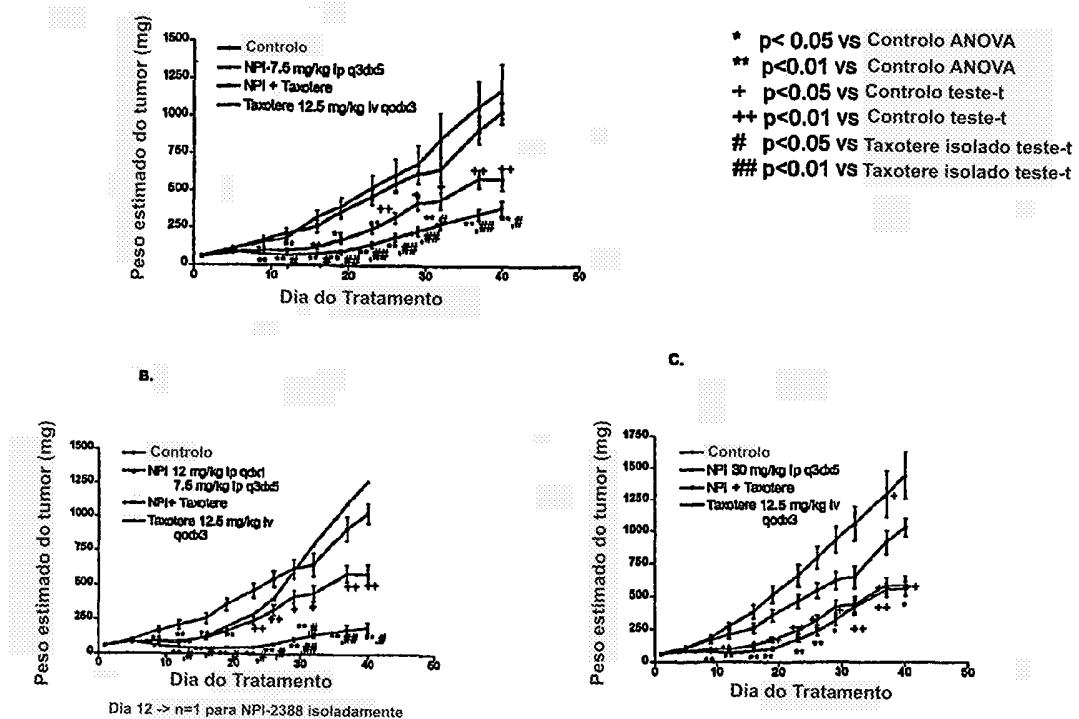


Figura 22

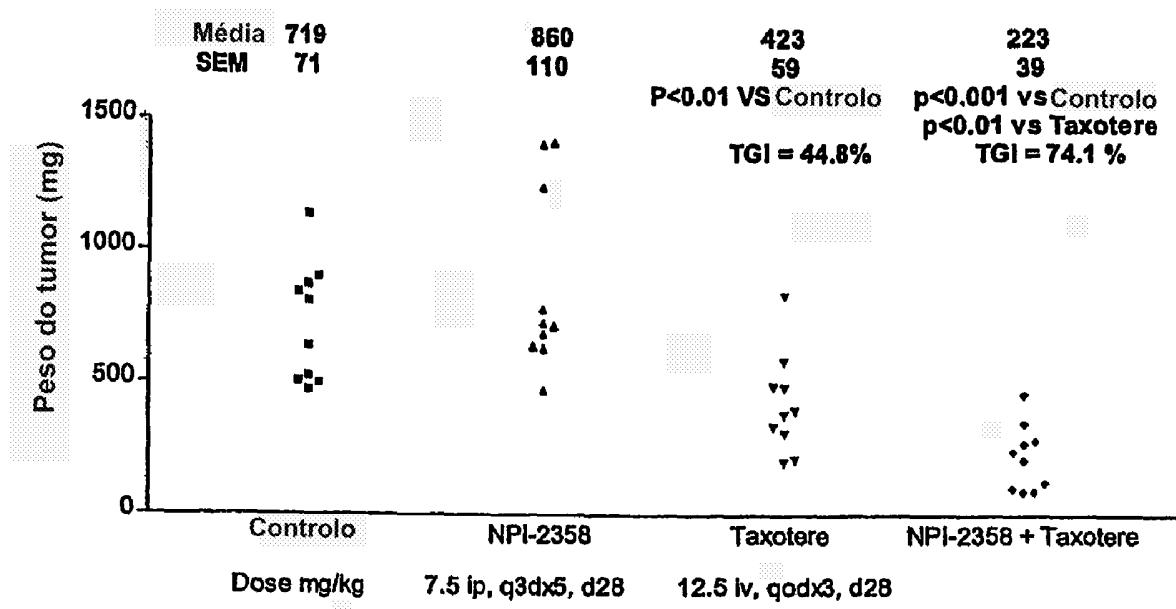


Figura 23

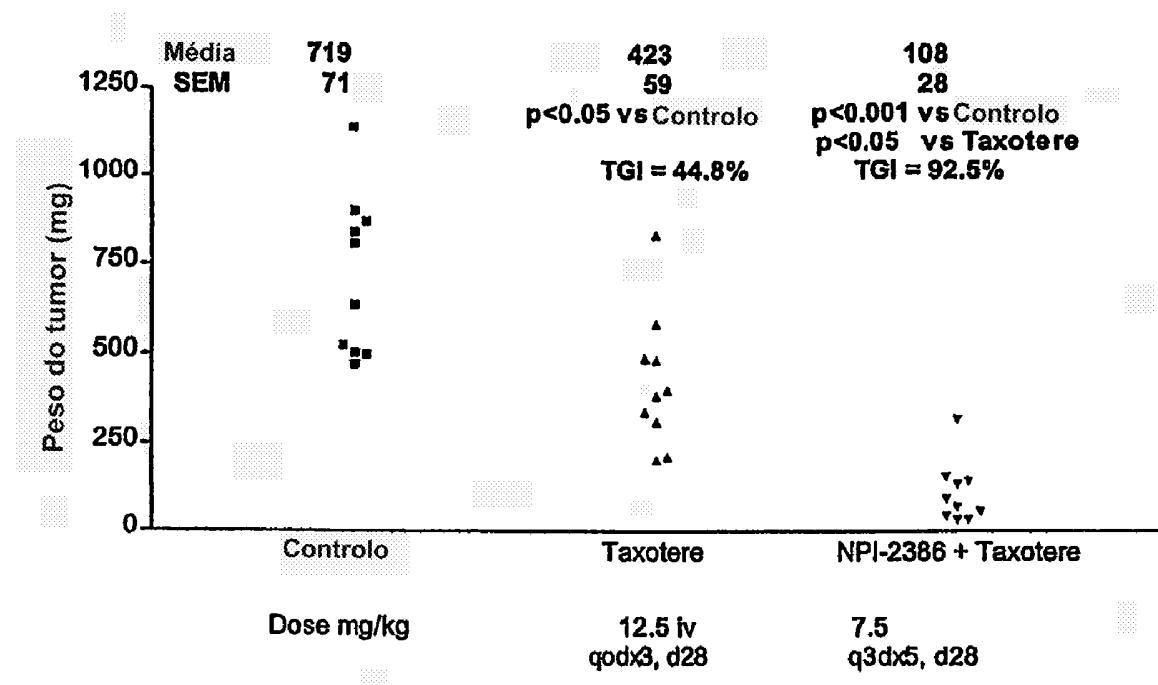


Figura 24

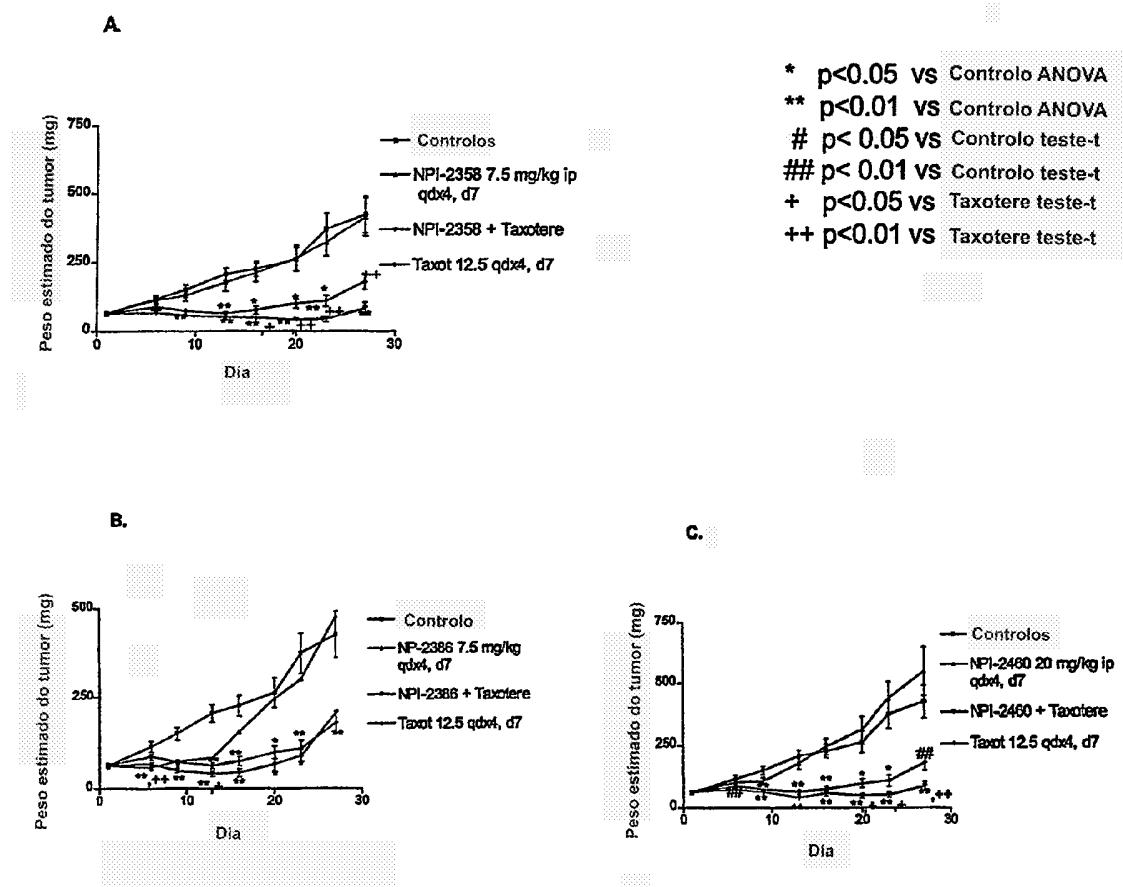


Figura 25

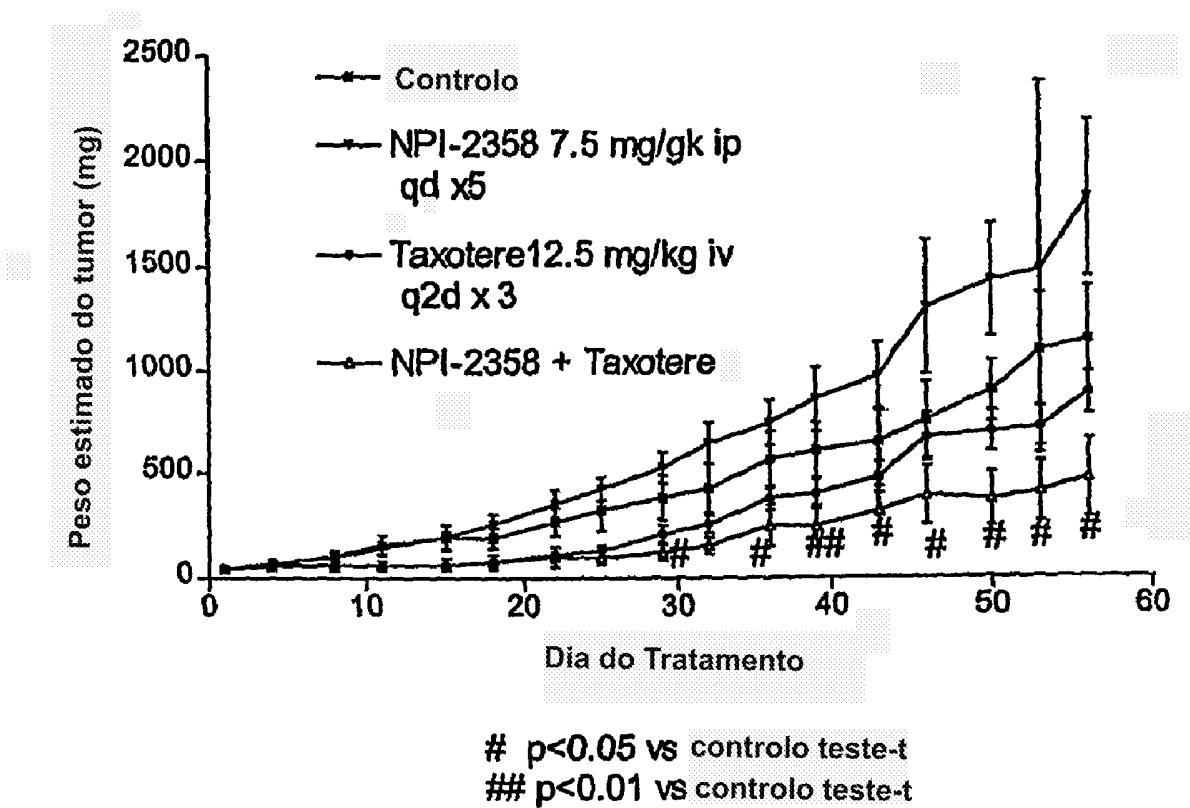


Figura 26

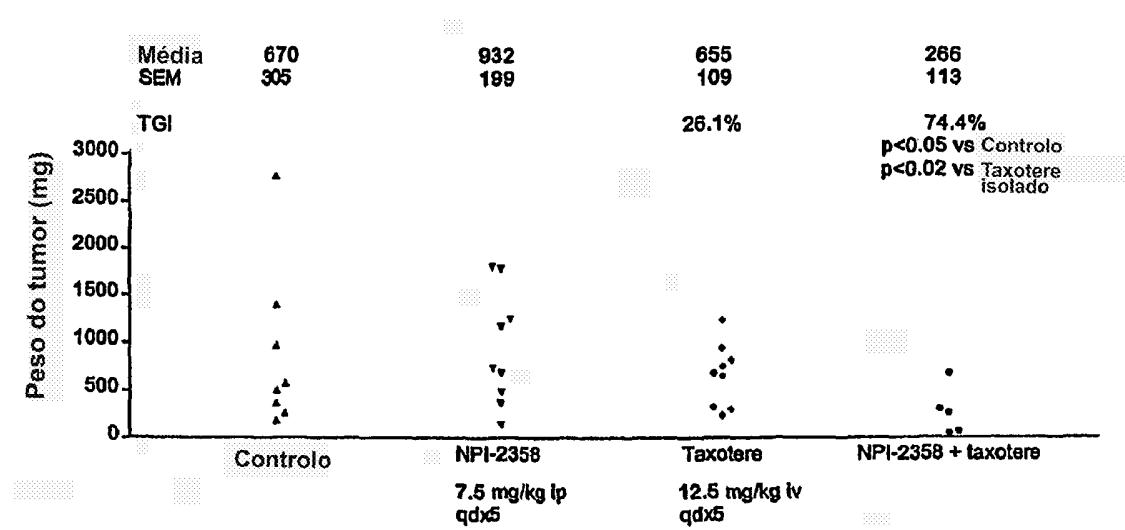


Figura 27

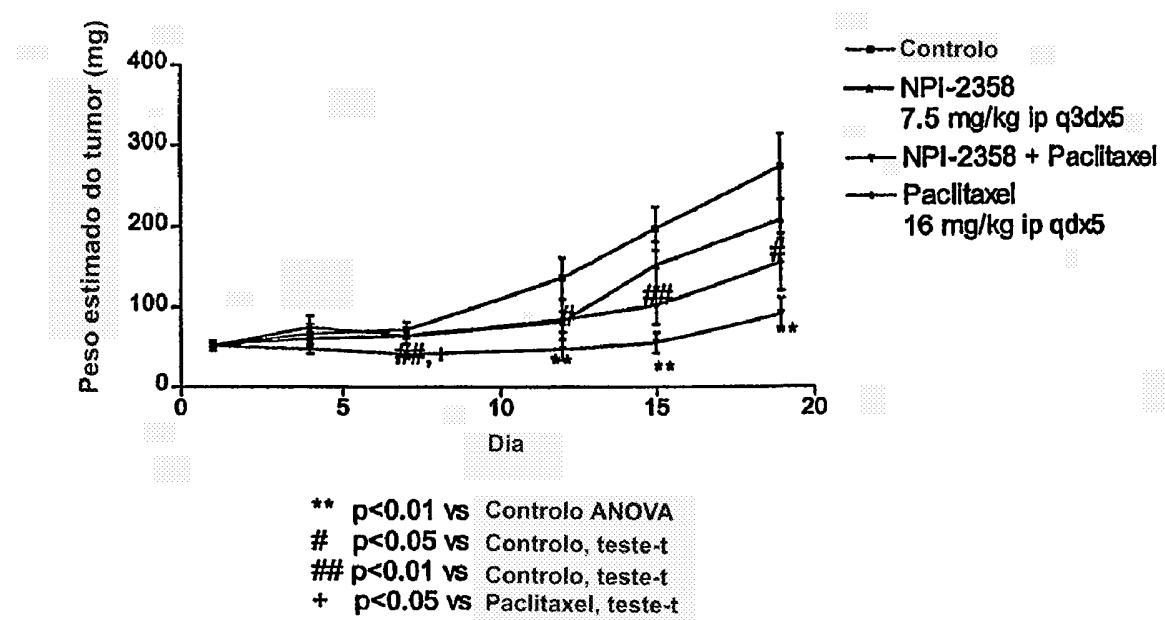


Figura 28

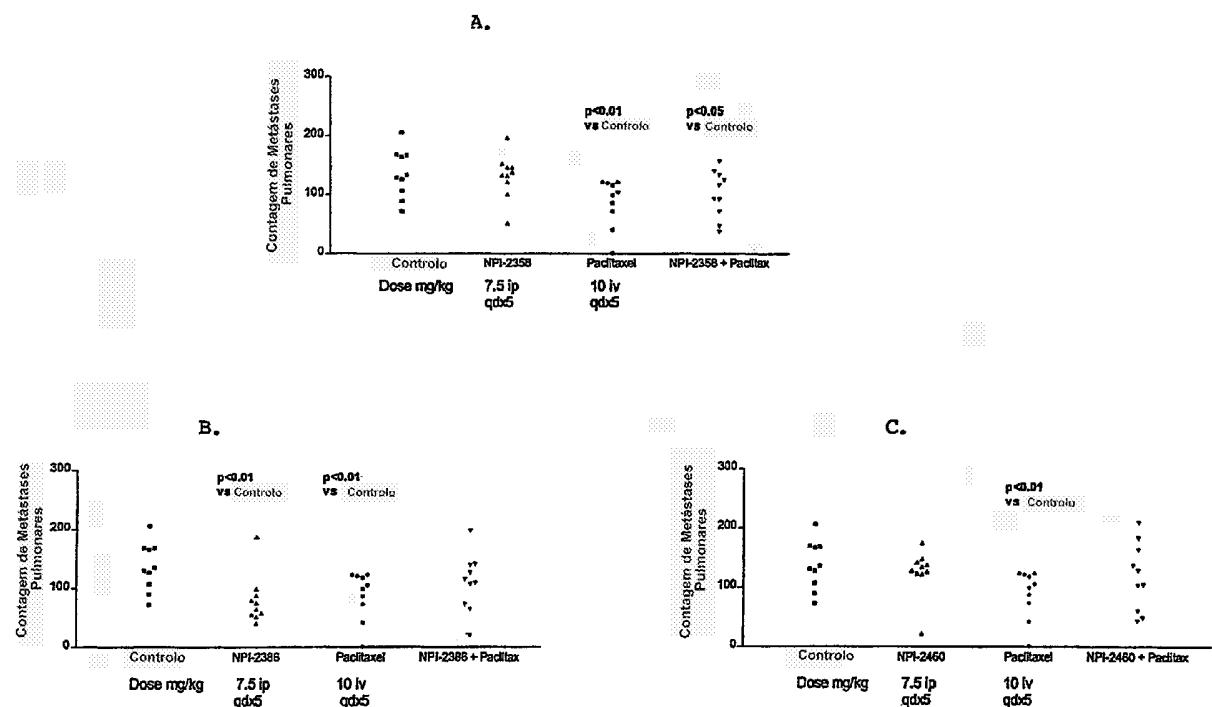


Figura 29