



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) BR 112019019301-4 A2**



**(22) Data do Depósito:** 16/03/2018

**(43) Data da Publicação Nacional:** 28/04/2020

**(54) Título:** COMPOSTOS ANTICÂNCER

**(51) Int. Cl.:** C07D 407/12; A61K 31/351; A61P 35/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 17/03/2017 EP 17382140.6.

**(71) Depositante(es):** PHARMA MAR, S.A..

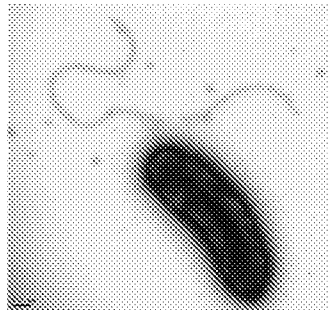
**(72) Inventor(es):** LIBRADA MARÍA CAÑEDO HERNÁNDEZ; FERNANDO DE LA CALLE VERDÚ; MARÍA PILAR RODRÍGUEZ RAMOS; MARÍA DEL CARMEN SCHLEISSNER SÁNCHEZ; PAZ ZÚÑIGA GIRÓN.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2018056665 de 16/03/2018

**(87) Publicação PCT:** WO 2018/167270 de 20/09/2018

**(85) Data da Fase Nacional:** 17/09/2019

**(57) Resumo:** Compostos anticâncer de fórmula geral I I em que R1 a R4 assumem diversos significados, para uso no tratamento de câncer. Uma nova cepa *Labrenzia* sp. denominada PHM005 com Número do Depósito de Acesso CECT-9225, um método para a produção dos compostos da invenção e análogos dos mesmos pelo uso da cepa PHM005 e o aglomerado de genes Lab que codificam a biossíntese de compostos tipo pederina e tipo onnamide são também fornecidos.

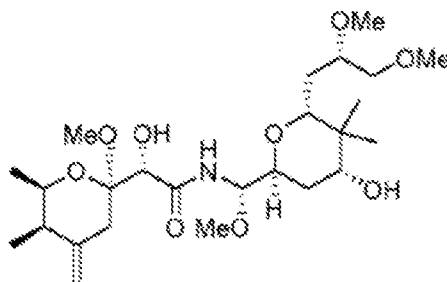


**COMPOSTOS ANTICÂNCER****CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção se refere a produção direta ou indireta de compostos anticâncer a partir de bactérias e a novos compostos anticâncer, composições farmacêuticas compreendendo os mesmos e seus usos como agentes anticâncer.

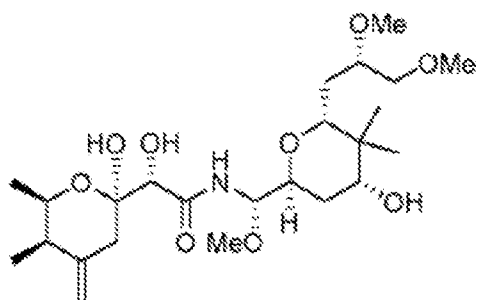
**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[002] Em 1949, Ueta reportou o isolamento do princípio tóxico do besouro *Paederus fuscipes* (*Kyushu Igaku Zasshi*, 1949, 249). Quatro anos depois, uma substância com propriedades físicas idênticas à da mesma espécie de besouro foi também descrita por Pavan e Bo (*Physiol. Comp. Oecol.* 1953, 3, 307). A estrutura deste composto tóxico, denominado pederina, foi primeiro proposta em 1965 por Cardani e colaboradores (*Tetrahedron Lett.* 1965, 2537) porém ela foi corrigida em 1968 por Furusaki e colaboradores com base na estrutura cristalina de um derivado. (*Tetrahedron Lett.* 1968, 6301). A estrutura da pederina é:

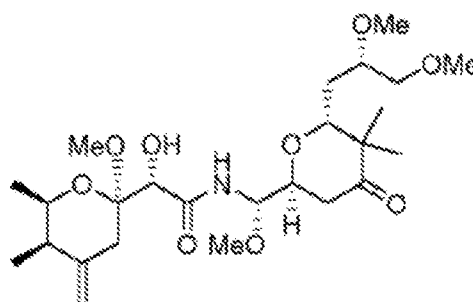


Pederina

[003] Adicionalmente, o grupo de Cardani reportou o isolamento de dois compostos adicionais de *Paederus fuscipes* que foram nomeados pseudopederina e pederona. A pederona foi descrita dois anos depois (*Tetrahedron Lett.* 1967, 41, 4023).



Pseudopederina

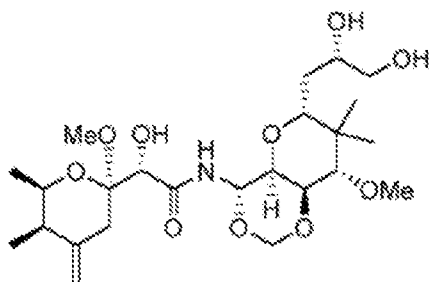


Pederona

[004] Pederina é um potente agente citotóxico e vesicante. Brega e colaboradores (*J. Cell Biol.* 1968, 485 - 496) testaram a pederina contra um número de linhagens celulares tais como EUE, E6D, HeLa, KB, Hep, AS, MEF, CE, BHK, Z1 e M1 e reportaram que concentrações da ordem de 3 nM são suficientes para causar morte celular dentro de quatro dias em todas as linhagens celulares analisadas. Em adição, a pederina causa um comprometimento imediato da síntese de proteína e DNA.

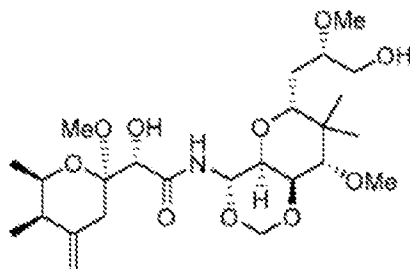
[005] A citotoxicidade da pseudopederina foi também descrita por Soldati e colaboradores (*Experientia* 1966, 3, 176 - 178). A pseudopederina apresenta toxicidade inferior a pederina, sendo ativa em doses 10 vezes mais altas.

[006] A patente europeia **EP0289203** descreve o isolamento e atividade antitumoral e antiviral da Micalamida A, um composto isolado de esponjas *Mycale sp.* coletadas na Nova Zelândia.



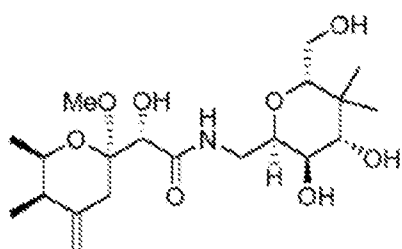
## Micalamida A

[007] Seus inventores, o grupo de Munro, ainda reportou o isolamento de Micalamida B, um composto intimamente relacionado com atividade antitumoral e antiviral, a partir da mesma fonte (*J. Org. Chem.* 1990, 55, 223).

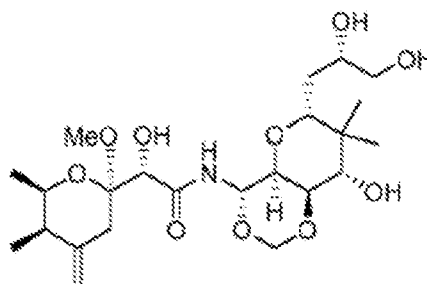


Micalamida B

[008] Eles ainda isolaram duas micalamidas adicionais, as Micalamidas C e D, de esponjas *Stylinos* (*J. Nat. Prod.* 2000, 63, 704). As Micalamidas A, B, C e D apresentam valores de IC50 contra a linhagem celular de leucemia murina P-388 de 3.0, 0.7, 95.0 e 35 ng / mL, respectivamente.



Micalamida C

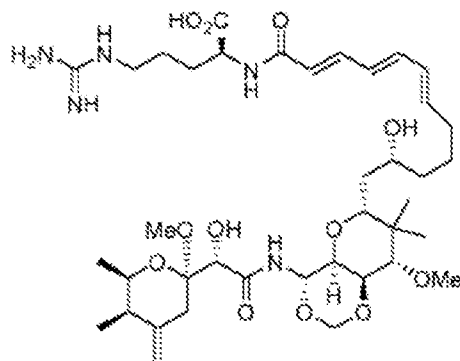


Micalamida D

[009] As Micalamidas foram também mostradas como poderosos agentes imunossupressores com eficácia *in vitro* comparável ao agente clínico ciclosporina A.

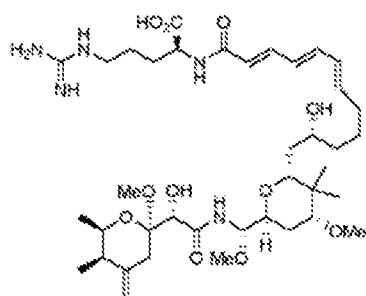
[010] O **US4801606** descreve o isolamento de Onnamide A de amostras de *Theonella sp.* coletadas da costa do Japão. A Onnamide A é um composto antitumoral com um valor de IC50 contra a linhagem celular murina P388 de 1 ng

/ mL. Ela também apresenta atividade antiviral.

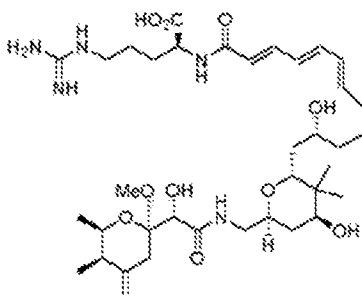


Onnamide A

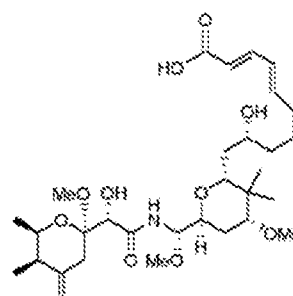
[011] A família onnamide contém diversos membros. Três deles, as Onnamides D - F, são isentas do anel dioxolano da onnamide A. As Onnamides D e E foram isoladas a partir de esponjas *Theonella* por Matsunaga e colaboradores (*Tetrahedron*, 1992, 48, 8369) e a Onnamide F foi coletada pelo grupo Capon a partir da esponja *Trachycladus laevispirulifer* (*J. Nat. Prod.* 2001, 64, 640).



Onnamide D



Onnamide E



Onnamide F

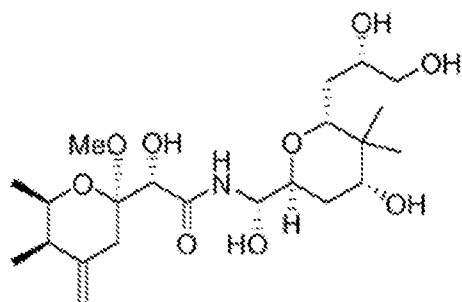
[012] A Onnamide E não mostrou atividade citotóxica contra a linhagem celular P388 em uma concentração de 0.4 µg / mL e a Onnamide F foi descrita como um potente nematocídeo.

[013] Evidências experimentais para uma biossíntese bacteriana de pederina foram primeiro fornecidas por Kellner, o qual reportou que o traço de produção de pederina poderia ser transferido para uma

linhagem de *Paederus spp.* não produtora pela alimentação com ovos de fêmeas positivas para a pederina (*Chemoecology*, 2001, 11, 127). Por outro lado, ovos tratados com antibióticos não causaram este efeito. Este resultado indicou a existência de uma bactéria produtora de pederina que é capaz de colonizar as não produtoras (*J. Insect. Physiol.*, 2001, 47, 475).

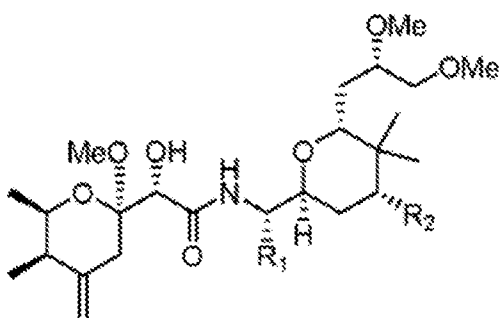
[014] Piel e colaboradores isolaram o aglomerado de gene para a policetídeo sintase (PKS) da pederina (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, 99, 14002 e **WO2003044186**) e as onnamides (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2004, 101, 16222). Este trabalho implicou fortemente em simbioses bacterianas como as verdadeiras fontes desses compostos, o que fornece uma explicação para o isolamento de compostos estruturalmente semelhantes de organismos díspares. Para uma revisão sobre a proposta de simbiote, vide Piel, J., *Curr. Med. Chem.* 2006, 13, 39.

[015] Outro composto intimamente relacionado, a diaforina, foi isolado do inseto *Diaphorina citri* por Nakabachi e colaboradores (*Current Biology* 2013, 23(15), 1478 - 1484). Este composto é também citotóxico com um valor de IC50 de ca. 1  $\mu$ M e ca. 2  $\mu$ M contra células B104 e HeLa, respectivamente. Sua presença em extratos de *Diaphorina citri* foi prevista na mesma publicação pela análise do sistema da policetídeo sintase (PKS) da *Candidatus Profftella armatura*, um simbiote bacteriano defensivo associado a *Diaphorina citri*.



Diaforina

[016] Por outro lado, o pedido de patente **WO2013016120** descreve uma síntese total de pederina e análogos dos mesmos de fórmula:



em que pelo menos um de R1 ou R2 inclui um ligante que inclui um grupo funcional reativo que pode se ligar a uma porção direcionadora. Esta síntese total está baseada em uma construção de um multicomponente acil amina.

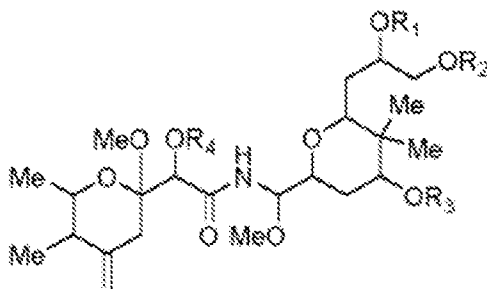
[017] Estudos detalhados das propriedades farmacológicas das pederinas, Micalamidas e onnamides foram dificultados devido à escassez desses compostos a partir de fontes naturais. Por exemplo, aproximadamente 100 kg de *Paederus fuscipes* foram requeridos para isolar material suficiente para elucidar a estrutura da pederina. Embora os sistemas de PKS das pederinas e onnamides tenha sido descrito, ainda não foi possível obter esses compostos por métodos biotecnológicos. Sendo assim, a única maneira prática de obter estes interessantes compostos no momento é a síntese total. Um número de sínteses total da pederina e Micalamidas foi reportado. Elas foram recentemente

revisadas por Witezak e colaboradores (*Mini Rev. Med. Chem.* 2012, 12(14), 1520 - 1532) e por Floreancig e Mosey (*Nat. Prod. Rep.* 2012, 29, 980).

[018] Estas sínteses levaram a rotas que são suficientemente curtas para entregar material suficiente para testes biológicos e forneceram análogos que têm sido úteis no desenvolvimento de relações estrutura - atividade para estes compostos. No entanto, a necessidade de fornecer uma rota mais concisa para estes compostos e novos análogos antitumorais dos mesmos permanece.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[019] Em um primeiro aspecto, a presente invenção está direcionada a um composto de fórmula geral **I** ou um sal, tautômero ou estereoisômero farmacologicamente aceitável do mesmo



**I**

em que:

R1, R2 e R3 são, cada, independentemente selecionados dentre hidrogênio, alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, -C(=O)Ra, -C(=O)ORb e -(C=O)NRcRd;

R4 é selecionado dentre hidrogênio, -C(=O)Ra, -C(=O)ORb e -C(=O)NRcRd;

Ra é selecionado dentre hidrogênio, alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, aril e heterociclil;

Rb é selecionado dentre alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, aril e heterociclil;

Rc e Rd são, independentemente, selecionados dentre hidrogênio, alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, aril e heterociclil;

com a condição de que R1 e R2 não são, simultaneamente, metil.

[020] Em um segundo aspecto, a presente invenção está direcionada a composições farmacêuticas compreendendo um composto de fórmula **I**, ou um sal, tautômero ou estereoisômero farmacêuticamente aceitável do mesmo, junto com um carreador ou diluente farmacêuticamente aceitável.

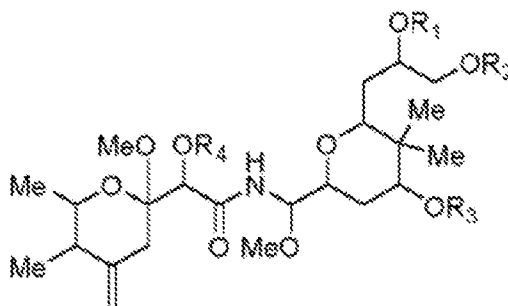
[021] Em um terceiro aspecto, a presente invenção está direcionada a compostos de fórmula **I**, ou sais, tautômeros ou estereoisômeros farmacêuticamente aceitáveis do mesmo, para uso como um medicamento, em particular, como um medicamento para o tratamento de câncer.

[022] Em um quarto aspecto, a presente invenção está direcionada a composições farmacêuticas compreendendo um composto de fórmula **I**, para uso como um medicamento, em particular, como um medicamento para o tratamento de câncer.

[023] Em um quinto aspecto, a presente invenção

está também direcionada ao uso de um composto de fórmula **I**, ou um sal, tautômero ou estereoisômero farmacologicamente aceitável do mesmo, no tratamento de câncer, ou no preparo de um medicamento, preferencialmente para o tratamento de câncer. Outros aspectos da invenção são métodos de tratamento e compostos para uso nestes métodos. Sendo assim, a presente invenção ainda fornece um método de tratamento de um paciente, notavelmente um humano afetado por câncer o qual compreende a administração ao referido indivíduo afetado em necessidade do mesmo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto tal como definido acima.

[024] Em um sexto aspecto, a presente invenção está direcionada a um processo para a obtenção de um composto de fórmula **II** ou um sal, tautômero ou estereoisômero farmacologicamente aceitável do mesmo



**II**

em que

R1, R2 e R3 são, cada, independentemente selecionados dentre hidrogênio, alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, -C(=O)Ra, -C(=O)ORb e -(C=O)NRcRd;

R4 é selecionado dentre hidrogênio, -C(=O)Ra, -C(=O)ORb e -C(=O)NRcRd;

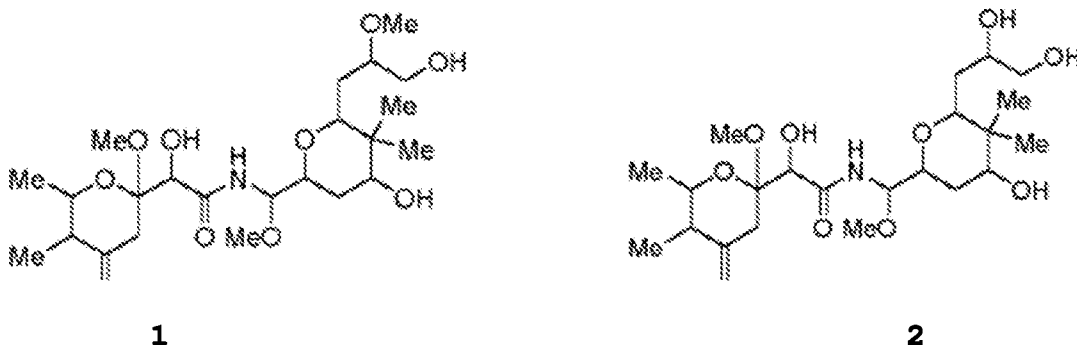
Ra é selecionado dentre hidrogênio, alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, aril e heterociclil;

Rb é selecionado dentre alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, aril e heterociclil;

Rc e Rd são, independentemente, selecionados dentre hidrogênio, alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, aril e heterociclil;

o processo compreendendo as etapas de:

- cultivo da cepa bacteriana marinha do tipo selvagem PHM005 ou seus mutantes sob condições adequadas para produzir compostos **1** e / ou **2** de fórmula:



- isolamento do composto **1** ou **2**; e, se necessário,  
- derivatização do composto **1** ou **2**.

[025] Em um sétimo aspecto, a presente invenção se refere a cepa PHM005. A alfaproteobactéria marinha de vida livre produtora dos compostos **1** e **2** foi depositada para fins patentário na coleção CECT com o código CECT-9225.

[026] Em um oitavo aspecto, a presente invenção fornece uma sequência de ácido nucleico isolado

compreendendo o aglomerado de gene biossintético Lab ou sendo complementar a uma sequência compreendendo o aglomerado de gene biossintético Lab. Este aglomerado de gene representa o primeiro exemplo de genes de uma bactéria cultivável que codifica a biossíntese de compostos tipo pederina e tipo onnamide.

[027] Em um nono aspecto, a presente invenção fornece fragmentos de ácido nucleico selecionados dentre o grupo que consiste nos genes *lab706*, *lab707*, *lab708*, *lab709*, *lab710*, *lab711*, *lab712*, *lab713*, *lab714*, *lab715*, *lab716*, *lab717*, *lab718*, *lab719*, *lab720*, *lab721*, *lab722*, *lab723*, *lab724*, *lab725* e / ou *lab726* tal como mostrados na Figura 3.

[028] Em um décimo aspecto, a invenção está direcionada a um sistema enzimático modular codificado por uma sequência de ácido nucleico tal como descrita acima. O sistema enzimático modular apresenta preferencialmente atividade funcional na biossíntese de compostos tipo pederina e tipo onnamide e / ou uma porção policetídic e / ou uma porção de peptídeo não ribossomal.

[029] Em um décimo primeiro aspecto, a presente invenção está direcionada a um vetor compreendendo um ácido nucleico consistindo essencialmente do aglomerado de gene biossintético Lab derivado de *Labrenzia* sp. e, em particular, da cepa PHM005 ou um vetor compreendendo uma sequência de ácido nucleico tal como descrita acima.

[030] Em um décimo segundo aspecto, a presente invenção está direcionada a uma célula hospedeira recombinante ou um organismo transgênico compreendendo o referido ácido nucleico ou contendo o referido vetor.

[031] Em um décimo terceiro aspecto, a presente invenção está direcionada a um método para a produção de compostos tipo pederina ou tipo onnamide usando um mutante de PHM005 ou uma célula hospedeira recombinante ou um organismo transgênico tal como descritos acima, compreendendo a etapa de:

- Cultura do mutante de PHM005 ou a célula hospedeira recombinante ou o organismo transgênico sob condições para expressar o aglomerado de gene biossintético Lab; e

- Isolamento dos compostos tipo pederina e / ou tipo onnamide produzidos.

[032] Outros aspectos da presente invenção estão direcionados ao uso de um ácido nucleico, tal como definido acima, no preparo de um aglomerado de gene biossintético Lab modificado, ao uso de um ácido nucleico, tal como definido acima, no preparo de um composto tipo pederina ou tipo onnamide e a processos para a melhora da produção de compostos tipo pederina e tipo onnamide em bactérias compreendendo as etapas de: a) cultura da cepa PHM005 na presença de um agente mutagênico por um período de tempo suficiente para permitir a mutagênese e b) seleção dos referidos mutantes por uma mudança no fenótipo que resulta em uma produção aumentada de compostos tipo pederina ou tipo onnamide. O agente mutagênico pode ser um agente químico, tal como daunorubicina e nitrosoguanidina; um agente físico, tal como radiação gama ou radiação ultravioleta; ou um agente biológico, tal como um transposon, por exemplo. Exemplos de modificações incluem o nocaute de genes de individualização para evitar metilações e hidroxilações.

**BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E DAS SEQUÊNCIAS**

[033] **Figura 1.** Microscopia eletrônica (coloração negativa) de PHM005 de *Labrenzia* sp.. As células na fase de crescimento exponencial intermediário foram adsorvidas em grades revestidas com colódio de carbono de 400 mesh por 2 min, negativamente coradas com 2 % de uranil acetato, imageadas com um microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1011 operado a 100 kV e fotografado com uma câmera CCD Gatan Erlangshen ES1000W.

[034] **Figura 2.** Árvore contendo os vizinhos com base nas sequências de genes de rRNA 16S que mostram que a relação entre o PHM005 e as cepas tipo de espécies intimamente relacionadas aos gêneros *Labrenzia* e *Stappia*. A árvore filogenética foi gerada pelo alinhamento pareado com base no coeficiente de similaridade e UPGMA para a análise de aglomerados usando BioNumerics V7.5 (matemática aplicada). Os vizinhos filogenéticos foram identificados e pareados por similaridades das sequências de genes de rDNA 16S calculadas por comparação com o banco de dados SILVA LTPs123.

[035] **Figura 3.** Mapa do aglomerado de gene biossintético Lab. Ilha do aglomerado de gene Lab total: 69 Kb.

[036] **Figura 4.** Espectro 1H NMR do composto 1 em CDCl<sub>3</sub>.

[037] **Figura 5.** Espectro 13C NMR do composto 1 em CDCl<sub>3</sub>.

[038] **Figura 6.** espectro gCOSY do composto 1 em CDCl<sub>3</sub>.

[039] **Figura 7.** Espectro TOCSY do composto 1 em

CDC13.

[040] **Figura 8.** Espectro gHSQC do composto **1** em CDC13.

[041] **Figura 9.** Espectro LR-HSQMBC do composto **1** em CDC13.

[042] **Figura 10.** Espectro ROESY do composto **1** em CDC13.

[043] As sequências mencionadas neste pedido estão listadas na listagem de sequências anexa. Estas sequências são brevemente resumidas a seguir:

[044] **SEQ ID NO: 1** Sequência (1355 bp) de genes do rRNA 16S de PHM005 de *Labrenzia* sp.

[045] **SEQ ID NO: 2** Sequência de ácido nucleico do aglomerado de gene biossintético Lab.

[046] **SEQ ID NO: 3** Sequência de proteína da proteína carreadora acil putativa Lab706.

[047] **SEQ ID NO: 4** Sequência de proteína da HMGS putativo Lab707.

[048] **SEQ ID NO: 5** Sequência de proteína da PKS Lab708.

[049] **SEQ ID NO: 6** Sequência de proteína da TransAT PKS Lab709.

[050] **SEQ ID NO: 7** Sequência de proteína da proteína carreadora acil putativa Lab710.

[051] **SEQ ID NO: 8** Sequência de proteína da oxigenase FAD putativa Lab711.

[052] **SEQ ID NO: 9** Sequência de proteína da ometiltransferase putativa Lab712.

[053] **SEQ ID NO: 10** Sequência de proteína do citocromo putativo P450 Lab713.

[054] **SEQ ID NO: 11** Sequência de proteína da transacilase malonil CoA-ACP putativa Lab714 ou oxidoreductase FMT.

[055] **SEQ ID NO: 12** Sequência de proteína da transacilase malonil CoA-ACP ou aciltransferase putativa Lab715.

[056] **SEQ ID NO: 13** Sequência de proteína da transacilase malonil CoA-ACP Lab716.

[057] **SEQ ID NO: 14** Sequência de proteína da hidratase enoil-CoA Lab717.

[058] **SEQ ID NO: 15** Sequência de proteína da Beta-cetoacil sintetase Lab718.

[059] **SEQ ID NO: 16** Sequência de proteína da Lab719 TransAT PKS / NRPS.

[060] **SEQ ID NO: 17** Sequência de proteína da Lab720 monooxigenase FAD putativa.

[061] **SEQ ID NO: 18** Sequência de proteína da Lab721, parte da TransAT PKS.

[062] **SEQ ID NO: 19** Sequência de proteína da Lab722, parte da TransAT PKS.

[063] **SEQ ID NO: 20** Sequência de proteína da Lab723, parte da PKS.

[064] **SEQ ID NO: 21** Sequência de proteína da Lab724, parte da TransAT PKS / NRPS.

[065] **SEQ ID NO: 22** Sequência de proteína da Lab725, parte da PKS.

[066] **SEQ ID NO: 23** Sequência de proteína da ometiltransferase putativa Lab726.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES PREFERIDAS**

[067] A presente invenção se refere a compostos de

fórmula geral I tal como definido acima.

[068] Nos compostos definidos pela fórmula Markush e neste relatório descritivo, os grupos podem ser selecionados de acordo com a seguinte orientação:

[069] Grupos alquil podem ser ramificados ou não ramificados e, preferencialmente, apresentam de cerca de 1 a cerca de 12 átomos de carbono. Uma classe mais preferida de grupos alquil apresenta de 1 a cerca de 6 átomos de carbono. Ainda mais preferidos são os grupos alquil apresentando 1, 2, 3 ou 4 átomos de carbono. Metil, etil, *n*-propil, isopropil e butil, incluindo *n*-butil, *tert*-butil, *sec*-butil e isobutil são grupos alquil particularmente preferidos nos compostos da presente invenção. Tal como aqui utilizado, o termo alquil, a menos se indicado de outra forma, se refere a ambos grupos cíclicos e não cíclicos, embora os grupos cíclicos vão compreender pelo menos três membros no anel de carbono.

[070] Grupos alquenil e alquinil nos compostos da presente invenção podem ser ramificados ou não ramificados, apresentar uma ou mais ligações insaturadas e de 2 a cerca de 12 átomos de carbono. Uma classe mais preferida de grupos alquenil e alquinil apresenta de 2 a cerca de 6 átomos de carbono. Ainda mais preferidos são os grupos alquenil e alquinil apresentando 2, 3 ou 4 átomos de carbono. Os termos alquenil e alquinil, tal como aqui utilizados, se refere a ambos grupos cíclicos e não cíclicos, embora os grupos cíclicos vão compreender pelo menos três membros no anel de carbono.

[071] Grupos aril adequados nos compostos da presente invenção incluem compostos com um único ou

múltiplos anéis, incluindo compostos de múltiplos anéis que contêm grupos aril separados e / ou fundidos. Grupos aril típicos contêm de 1 a 3 anéis separados ou fundidos e de 6 a cerca de 18 átomos de carbono no anel. Preferencialmente, os grupos aril contêm de 6 a cerca de 14 átomos de carbono no anel. Grupos aril especialmente preferidos incluem fenil substituído ou não substituído, naftil substituído ou não substituído, bifenil substituído ou não substituído, fenantril substituído ou não substituído e antril substituído ou não substituído. O grupo aril mais preferido é fenil substituído ou não substituído.

[072] Grupos heterocíclicos adequados incluem grupos heteroaromáticos e heteroalíclicos contendo de 1 a 3 anéis separados e / ou fundidos e de 5 a cerca de 18 átomos no anel. Preferencialmente, grupos heteroaromáticos e heteroalíclicos contêm de 5 a cerca de 10 átomos no anel, mais preferencialmente 5, 6 ou 7 átomos no anel. Grupos heteroaromáticos adequados nos compostos da presente invenção contêm um, dois ou três heteroátomos selecionados dentre os átomos N, O ou S e incluem, por exemplo, cumarinil incluindo 8-cumarinil, quinolil, incluindo 8-quinolil, isoquinolil, piridil, pirazinil, pirazolil, pirimidinil, furil, pirrolil, tienil, tiazolil, isotiazolil, triazolil, tetrazolil, isoxazolil, oxazolil, imidazolil, indolil, isoindolil, indazolil, indolizinil, ftalazinil, pteridinil, purinil, oxadiazolil, tiadiazolil, furazanil, piridazinil, triazinil, cinolinil, benzimidazolil, benzofuranil, benzofurazanil, benzotiofenil, benzotiazolil, benzoxazolil, quinazolinil, quinoxalinil, naftiridinil e furopiridil. Grupos

heteroalíclicos adequados nos compostos da presente invenção contêm um, dois ou três heteroátomos selecionados dentre os átomos N, O ou S e incluem, por exemplo, pirrolidinil, tetrahidrofuranyl, tetrahidrotienil, tetrahidrotiopiranyl, piperidil, morfolinil, tiomorfolinil, tioxanyl, piperazinil, azetidil, oxetanil, tietanyl, homopiperidil, oxepanyl, tiepanil, oxazepinil, diazepinil, tiazepinil, 1,2,3,6-tetrahidropiridil, 2-pirrolinil, 3-pirrolinil, indolinil, 2H-piranyl, 4H-piranyl, dioxanyl, 1,3-dioxolanil, pirazolinil, ditianil, ditiolanil, dihidropiranyl, dihidrotienil, dihidrofuranyl, pirazolidinil, imidazolinil, imidazolidinil, 3-azabicyclo [3.1.0]hexil, 3-azabicyclo [4.1.0]heptil, 3H-indolil e quinolizininil.

[073] Os grupos acima mencionados podem ser substituídos em uma ou mais posições disponíveis por um ou mais grupos adequados tais como OR', =O, SR', SOR', SO<sub>2</sub>R', OSO<sub>2</sub>R', NO<sub>2</sub>, NHR', NR'R', =N-R', N(R')COR', N(COR')<sub>2</sub>, N(R')SO<sub>2</sub>R', N(R')C(=NR')N(R')R', CN, halogênio, COR' COOR', OCOR', OCOOR', OCONHR', OCON(R')R', CON(R')R', CON(R')OR', CON(R')SO<sub>2</sub>R', PO(OR')<sub>2</sub>, PO(OR')R', PO(OR')(N(R')R'), OH protegido, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> substituído ou não substituído, alquenil C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> substituído ou não substituído, alquinil C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> substituído ou não substituído, aril substituído ou não substituído e grupo heterocíclico substituído ou não substituído, em que cada um dos grupos R' é independentemente selecionado do grupo que consiste de hidrogênio, OH, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, SH, CN, halogênio, COH, COalquil, COOH, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> substituído ou não substituído, alquenil C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> substituído ou não substituído, alquinil

C2-C12 substituído ou não substituído, aril substituído ou não substituído e grupo heterocíclico substituído ou não substituído. Quando tais grupos são, eles mesmos, substituídos, os substituintes podem ser escolhidos a partir da lista acima.

[074] Grupos halogênio adequados ou substituintes nos compostos da presente invenção incluem F, Cl, Br e I.

[075] Grupos de proteção adequados para o OH, incluindo grupos de proteção para 1,2-diois, são bem conhecidos por um técnico no assunto. Uma revisão geral dos grupos de proteção em química orgânica é fornecida por Wuts, PGM e Greene TW em Grupos de proteção na Síntese Orgânica, 4<sup>a</sup> Edição, Wiley - Interscience e por Kocienski PJ em Grupos de proteção, 3<sup>a</sup> Edição, Georg Thieme Verlag. Estas referências fornecem seções sobre grupos de proteção para o OH. Todas estas referências são incorporadas por referência em sua totalidade.

[076] Dentro do escopo da presente invenção, um grupo de proteção do OH é definido como sendo a porção ligada ao O resultante da proteção do grupo OH através da formação de um grupo OH protegido adequado. Exemplos de tais OH protegidos incluem éteres, silil éteres, ésteres, sulfonatos, sulfenatos e sulfinatos, carbonatos e carbamatos. No caso dos éteres, o grupo de proteção para o OH pode ser selecionado dentre metil, metoximetil, metiltiometil, (fenildimetilsilil) metoximetil, benziloxi metil, *p*-metoxibenziloximetil, [(3,4-dimetoxibenzil) oxi]metil, *p*-nitrobenziloximetil, *o*-nitrobenziloximetil, [(*R*)-1-(2-nitrofenil)etoxi]metil, (4-metoxifenoxi)metil, guaiacol metil, [(*p*-fenilfenil)-oxi]metil, *t*-butoximetil,

4-penteniloximetil, siloximetil, 2-metoxietoximetil, 2-cianoetoximetil, bis(2-cloroetoxi)metil, 2,2,2-tricloroetoximetil, 2-(trimetilsilil)-etoximetil, mentoximetil, *O*-bis(2-acetoxietoxi)metil, tetrahidropiranyl, flúor tetrahidro piranyl, 3-bromotetrahidro piranyl, tetrahidro tiopiranyl, 1-metoxiciclohexil, 4-metoxitetrahidro piranyl, 4-metoxitetrahidro tiopiranyl, *S,S*-dióxido de 4-metoxi tetrahidro tiopiranyl, 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxi piperidin-4-il, 1-(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-il, 1-(4-clorofenil)-4-metoxipiperidin-4-il, 1,4-dioxan-2-il, tetrahidrofuranil, tetrahidrotiofuranil, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-octahidro-7,8,8-trimetil-4,7-metanobenzofuran-2-il, 1-etoxietil, 1-(2-cloroetoxi)etil, 2-hidroxietil, 2-bromoetil, 1-[2-(trimetilsilil)etoxi]etil, 1-metil-1-metoxietil, 1-metil-1-benziloxietil, 1-metil-1-benziloxi-2-fluoroetil, 1-metil-1-fenoxietil, 2,2,2-tricloroetil, 1,1-dianisil-2,2,2-tricloroetil, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-fenilisopropil, 1-(2-cianoetoxi)etil, 2-trimetilsililetil, 2-(benziltio)etil, 2-(fenilselenil)etil, *t*-butil, ciclohexil, 1-metil-1'-ciclopropilmetil, alil, prenil, cinamil, 2-fenalil, propargil, *p*-clorofenil, *p*-metoxifenil, *p*-nitrofenil, 2,4-dinitrofenil, 2,3,5,6-tetrafluoro-4-(trifluorometil)fenil, benzil, *p*-metoxibenzil, 3,4-dimetoxibenzil, 2,6-dimetoxibenzil, *o*-nitrobenzil, *p*-nitrobenzil, pentadienil nitrobenzil, pentadienil nitropiperonil, halobenzil, 2,6-diclorobenzil, 2,4-diclorobenzil, 2,6-difluorobenzil, *p*-cianobenzil, flúor benzil, 4-flúor alcoxibenzil, trimetilsililxilil, *p*-fenilbenzil, 2-fenil-2-propil, *p*-acilaminobenzil, *p*-azidobenzil, 4.azido-3-clorobenzil, 2-trifluorometilbenzil,

4-trifluorometilbenzil, *p*-(metilsulfinil)benzil, *p*-siletanilbenzil, 4-acetoxibenzil, 4-(2-trimetilsilil)etoximetoxibenzil, 2-naftilmetil, 2-picolil, 4-picolil, *N*-óxido de 3-metil-2-picolil, 2-quinolinilmetil, 6-metoxi-2-(4-metilfenil-4-quinolinemetil, 1-pirenilmetil, difenilmetil, 4-metoxidifenilmetil, 4-fenildifenilmetil, *p,p'*-dinitrobenzidril, 5-dibenzosuberil, trifenilmetil, tris(4-*t*-butilfenil)metil,  $\alpha$ -naftildifenilmetil, *p*-metoxifenildifenilmetil, di(*p*-metoxifenil)fenilmetil, tri(*p*-metoxifenil)metil, 4-(4'-bromofenaciloxi)fenildifenilmetil, 4,4',4''-tris(4,5-dicloroftalimidofenil)metil, 4,4',4''-tris(levulinoiloxifenil)metil, 4,4',4''-tris(benzoiloxifenil)metil, 4,4'-dimetoxi-3''-[*N*-(imidazolilmetil)]tritol, 4,4'-dimetoxi-3''-[*N*-(imidazoliletal) carbamoil]tritol, bis(4-metoxifenil)-1'-pirenilmetil, 4-(17-tetrabenzo[*a,c,g,i*]fluorenilmetil)-4,4''-dimetoxitritil, 9-antril, 9-(9-fenil)xan-tenil, 9-feniltioxantil, 9-(9-fenil-10-oxo)antril, 1,3-benzoditiolan-2-il e 4,5-bis(etoxicarbonil)-[1,3]-dioxolan-2-il, *S,S*-dióxido de benzisotiazolil. No caso dos silil éteres, o grupo de proteção para o OH pode ser selecionado dentre trimetil silil, trietil silil, triisopropil silil, dimetilisopropil silil, dietilisopropil silil, dimetilhexil silil, 2-norbornildimetil silil, *t*-butildimetil silil, *t*-butildifenil silil, tribenzil silil, tri-*p*-xilil silil, trifenil silil, difenilmetil silil, di-*t*-butilmetil silil, bis-(*t*-butil)-1-pirenilmetoxi silil, tris(trimetilsilil) silil, (2-hidroxistiril) dimetilsilil, (2-hidroxistiril) diisopropil silil, *t*-butilmetoxfenil silil, *t*-butoxidifenil silil, 1,1,3,3-tetraisopropil-3-[2-

(trifenilmetoxi)e-toxi]disiloxano-1-il e flúor silil. No caso dos ésteres, o grupo de proteção para o OH, junto com o átomo de oxigênio do OH não protegido ao qual ele está ligado, forma um éster que pode ser selecionado dentre formato, benzoilformato, acetato, cloroacetato, dicloroacetato, tricloroacetato, tricloroacetamido, trifluoroacetato, metoxiacetato, trifenilmetoxiacetato, fenoxiacetato, *p*-clorofenoxiacetato, fenilacetato, difenilacetato, 3-fenilpropionato, propanoil do tipo de cadeia bisflúor, 4-pentenoato, 4-oxopentanoato, 4,4-(etileneditio) pentanoato, 5-[3-bis(4-metoxifenil)hidroximetil fenoxi] levulinato, pivaloato, 1-adamantoato, crotonato, 4-metoxicrotonato, benzoato, *p*-fenilbenzoato, 2,4,6-trimetilbenzoato, 4-bromobenzoato, 2,5-difluorobenzoato, *p*-nitrobenzoato, picolinato, nicotinato, 2-(azidometil)benzoato, 4-azidobutirato, (2-azidometil)fenilacetato, 2-{{[trilitio]oxi]metil}benzoato, 2-{{[4-metoxitritilitio]oxi]metil}benzoato, 2-{{[metil(trilitio)amino]metil}benzoato, 2-{{[[4-metoxitritil]tio]metilamino]-metil}benzoato, 2-(aliloxi)fenilacetato, 2-(preniloximetil)benzoato, 6-(levuliniloximetil)-3-metoxi-2-nitrobenzoato, 6-(levuliniloximetil)-3-metoxi-4-nitrobenzoato, 4-benziloxi butirato, 4-trialquilsililoxi butirato, 4-acetoxi-2,2-dimetil butirato, 2,2-dimetil-4-pentenoato, 2-iodobenzoato, 4-nitro-4-metilpentanoato, *o*-(dibromometil)benzoato, 2-formilbenzenosulfonato, 4-(metiltiometoxi) butirato, 2-(metiltiometoximetil) benzoato, 2-(cloroacetoximetil)benzoato, 2-[(2-cloroacetoxi)etil] benzoato, 2-[2-benziloxi)etil] benzoato, 2-[2-(4-metoxibenziloxi)etil]benzoato, 2,6-dicloro-4-metilfenoxi acetato, 2,6-dicloro-4-

(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenoxiacetato, 2,4-bis(1,1-dimetilpropil)fenoxiacetato, clorodifenilacetato, isobutirato, monosuccinato, (E)-2-metil-2-butenato, o-(metoxicarbonil) benzoato,  $\alpha$ -naftoato, nitrato, alquil N,N,N',N'-tetrametilfosforo diamidato e 2-clorobenzoato. No caso dos sulfonatos, sulfenatos e sulfinatos, o grupo de proteção para o OH, junto com o átomo de oxigênio do OH não protegido ao qual ele está ligado, forma um sulfonato, sulfenato ou sulfinato que podem ser selecionados dentre sulfato, alilsulfonato, metanosulfonato, benzilsulfonato, tosilato, 2-[(4-nitrofenil)etil]sulfonato, 2-trifluorometil benzenosulfonato, 4-monometoxitritilsulfenato, alquil 2,4-dinitrofenilsulfenato, 2,2,5,5-tetrametilpirrolidin-3-ona-1-sulfinato e dimetilfosfinotiolil. No caso dos carbonatos, o grupo de proteção para o OH, junto com o átomo de oxigênio do OH não protegido ao qual ele está ligado, forma um carbonato que pode ser selecionado dentre metil carbonato, metoximetil carbonato, 9-fluorenilmetil carbonato, etil carbonato, bromoetil carbonato, 2-(metiltiometoxi)etil carbonato, 2,2,2-tricloroetil carbonato, 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetil carbonato, 2-(trimetilsilil)etil carbonato, 2-[dimetil(2-naftilmetil) silil]etil carbonato, 2-(fenilsulfonil)etil carbonato, 2-(trifenilfosfônio)etil carbonato, cis-[4-[(metoxitritil) sulfenil]oxi]tetrahydrofuran-3-il]oxi carbonato, isobutil carbonato, t-butil carbonato, vinil carbonato, alil carbonato, cinamil carbonato, propargil carbonato, p-clorofenil carbonato, p-nitrofenil carbonato, 4-etoxi-1-naftil carbonato, 6-bromo-7-hidroxicumarin-4-ilmetil carbonato, benzil carbonato, o-nitrobenzil carbonato, p-

nitrobenzil carbonato, *p*-metoxibenzil carbonato, 3,4-dimetoxibenzil carbonato, antraquinon-2-ilmetil carbonato, 2-dansiletil carbonato, 2-(4-nitrofenil)etil carbonato, 2-(2,4-dinitrofenil)etil carbonato, 2-(2-nitrofenil)propil carbonato, alquil 2-(3,4-metilenedioxi-6-nitrofenil)propil carbonato, 2-ciano-1-feniletil carbonato, 2-(2-piridilamino-1-feniletil carbonato, 2-[*N*-metil-*N*-(2-piridil)]amino-1-feniletil carbonato, fenacil carbonato, 3',5'-dimetoxibenzoína carbonato, metil ditiocarbonato e *S*-benzil tiocarbonato. E no caso dos carbamatos, o grupo de proteção para o OH, junto com o átomo de oxigênio do OH não protegido ao qual ele está ligado, forma um carbamato que pode ser selecionado dentre dimetiltiocarbamato, *N*-fenilcarbamato e *N*-metil-*N*-(*o*-nitrofenil)carbamato.

[077] Dentro do escopo da presente invenção, um grupo de proteção 1,2-diol é definido como sendo a porção ligada ao O que resulta da proteção simultânea do 1,2-diol através da formação de um 1,2-diol protegido. Exemplos de tais 1,2-diois protegidos inclui acetais e cetais cíclicos, orto ésteres cíclicos, derivados de silil, derivados de dialquilsilileno, carbonatos cíclicos, boronatos cíclicos. Exemplos de acetais e cetais cíclicos incluem metileno acetal, etilideno acetal, *t*-butilmetilideno acetal, 1-*t*-butiletilideno cetal, 1-feniletilideno cetal, 2-(metoxicarbonil) etilideno (Mocdeno) acetal ou 2-(*t*-butilcarbonil) etilideno (Bocdeno) acetal, fenilsulfoniletilideno acetal, 2,2,2-tricloroetilideno acetal, 3-(benziloxi)propil acetal, acroleína acetal, acetónídeo (isopropilideno cetal), ciclopentilideno cetal, ciclohexilideno cetal, cicloheptilideno cetal, benzilideno

acetal, *p*-metoxi benzilideno acetal, 1-(4-metoxifenil) etilideno cetal, 2,4-dimetoxi benzilideno acetal, 3,4-dimetoxi benzilideno acetal, *p*-acetoxi benzilideno acetal, 4-(*t*-butildimetilsililoxi) benzilideno acetal, 2-nitro benzilideno acetal, 4-nitrobenzilideno acetal, mesitileno acetal, 6-bromo-7-hidroxicumarin-2-ilmetilideno acetal, 1-naftaldeído acetal, 2-naftaldeído acetal, 9-antraceno acetal, benzofenona cetal, di-(*p*-anisil)metilideno acetal, xanten-9-ilideno cetal, 2,7-dimetilxanten-9-ilideno cetal, difenilmetileno cetal, cânfora cetal e mentona cetal. Exemplos de orto ésteres cíclicos incluem metoximetileno acetal, etoximetileno acetal, 2-oxaciclopentilideno orto éster, dimetoximetileno orto éster, 1-metoxietilideno orto éster, 1-etoxietilideno orto éster, ftalídeo orto éster, 1,2-dimetoxietilideno orto éster,  $\alpha$ -metoxibenzilideno orto éster, derivado de 1-(*N,N*-dimetilamino)etilideno, derivado de  $\alpha$ -(*N,N*-dimetilamino)benzilideno, butano 2-3-bisacetal (BBA), ciclohexane-1,2-diacetal (CDA) e dispirocetais. Exemplos de derivados de silil incluem o grupo di-*t*-butilsilileno (DTBS(OR)<sub>2</sub>), 1-(ciclohexil)-1-(metil)silileno (Cy)(Me)Si(OR)<sub>2</sub>, di-isopropilsilileno (*i*-propil)<sub>2</sub>Si(OR)<sub>2</sub>, dicitclohexilsilileno (Cy)<sub>2</sub>Si(OR)<sub>2</sub>, derivados de 1,3-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxanilideno) (TIPDS(OR)<sub>2</sub>), derivado de 1,1,3,3-tetra-*t*-butoxidissiloxanilideno (TBDS(OR)<sub>2</sub>), metileno-bis-(diisopropilsilanoxanilideno) (MDPS(OR)<sub>2</sub>) e 1,1,4,4-tetrafenil-1,4-disilanilideno (SIBA(OR)<sub>2</sub>). Exemplos de boronatos cíclicos incluem metil boronato, etil boronato, fenil boronato e *o*-acetamidofenil boranato.

[078] A menção destes grupos não deve ser

interpretada como uma limitação ao escopo da invenção, uma vez que eles foram mencionados como uma mera ilustração de grupos de proteção para o OH, porém grupos adicionais apresentando a referida função podem ser conhecidos por um técnico no assunto e eles devem ser entendidos como estando também abrangidos pela presente invenção.

[079] O termo "sal farmacologicamente aceitável" se refere a qualquer sal farmacologicamente aceitável o qual, sob a administração ao paciente, é capaz de fornecer (diretamente ou indiretamente) um composto tal como aqui descrito. No entanto, será apreciado que sais não farmacologicamente aceitáveis também estão abrangidos pelo escopo da invenção, uma vez que estes podem ser úteis no preparo de sais farmacologicamente aceitáveis. O preparo de sais pode ser realizado por métodos conhecidos no estado da técnica.

[080] Por exemplo, sais farmacologicamente aceitáveis de compostos aqui fornecidos são sintetizados a partir do composto pai, o qual contém uma porção básica ou ácida, por métodos químicos convencionais. Em geral, tais sais são, por exemplo, preparados pela reação das formas de ácido livre ou base livre destes compostos com uma quantidade estequiométrica da base ou ácido apropriado em água ou em um solvente orgânico ou em uma mistura de ambos. Em geral, meios não aquosos como o éter, etil acetato, etanol, 2-propanol ou acetonitrila são preferidos. Exemplos de sais de adição de ácido incluem sais de adição de ácido minerais, tais como, por exemplo, hidrocloreto, hidrobrometo, hidriodeto, sulfato, nitrato, fosfato e sais de adição de ácido orgânico, tais como, por exemplo,

acetato, triflúor acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartarato, malato, mandelato, metanossulfonato e *p*-toluenossulfonato. Exemplos de sais de adição alcalina incluem sais inorgânicos, tais como, por exemplo, sais de sódio, potássio, cálcio e amônio e sais alcalinos orgânicos tais como, por exemplo, etilenodiamina, etanolamina, *N,N*-dialquilenolamina, trietanolamina e sais de aminoácidos básicos.

[081] Os compostos da invenção podem estar na forma cristalina ou amorfa tanto como compostos livres ou como solvatos (por exemplo hidratos, alcoolatos, particularmente metanolatos) e têm-se a intenção de que quaisquer dessas formas estejam dentro do escopo da presente invenção. Métodos de solvatação são, em geral, conhecidos na técnica. Os compostos da invenção podem apresentar diferentes formas polimórficas e têm-se a intenção de que a invenção abranja todas as referidas formas.

[082] Qualquer composto aqui referido tem a intenção de representar tal composto específico, bem como determinadas variações ou formas. Em particular, os compostos aqui referidos podem apresentar centros assimétricos e, dessa forma, existem em diferentes formas enantioméricas ou diastereoisoméricas. Logo, qualquer composto fornecido aqui referido tem a intenção de representar qualquer um de um racemato, uma ou mais formas enantioméricas, uma ou mais formas diastereoisoméricas e misturas das mesmas. Da mesma forma, estereoisomerismo ou isomerismo geométrico acerca da dupla ligação é também possível, sendo assim, em alguns casos, a molécula pode

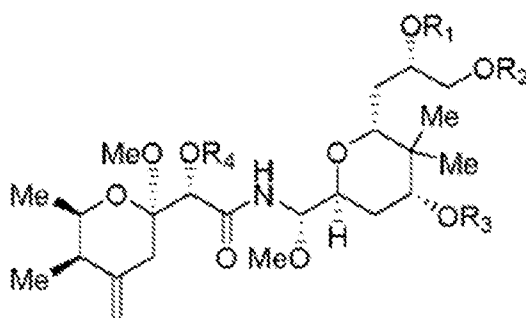
existir como um (*E*)-isômero ou (*Z*)-isômero (isômeros *trans* e *cis*). Se a molécula contém diversas duplas ligações, cada dupla ligação irá apresentar seu próprio estereoisomerismo, que poderia ser o mesmo ou ser diferente ao estereoisomerismo das outras duplas ligações da molécula. Além disso, os compostos aqui referidos podem existir como atropisômeros. Todos os estereoisômeros, incluindo enantiômeros, diastereoisômeros, isômeros geométricos e atropisômeros dos compostos aqui referidos e misturas dos mesmos, estão considerados dentro do escopo da presente invenção.

[083] Além disso, qualquer composto aqui referido pode existir como tautômeros. Especificamente, o termo tautômeros se referem a um de dois ou mais isômeros estruturais de um composto que existe em equilíbrio e são prontamente convertidos a partir de uma forma isomérica para outra. Pares tautoméricos comuns são amina - imina, amida - ácido imídico, ceto - enol, lactama - lactima, etc.

[084] A menos se indicado de outra forma, os compostos da invenção também devem incluir formas isotopicamente marcadas, por exemplo, compostos os quais diferem apenas na presença de um ou mais átomos isotopicamente enriquecidos. Por exemplo, os compostos que apresentam as presentes estruturas, com exceção da substituição de pelo menos um átomo de hidrogênio por um deutério ou trítio, ou a substituição de pelo menos um átomo de carbono por carbono <sup>13</sup>C- ou <sup>14</sup>C- enriquecido, ou a substituição de pelo menos um átomo de nitrogênio por nitrogênio <sup>15</sup>N enriquecido estão dentro do escopo desta invenção.

[085] Para fornecer uma descrição mais concisa, algumas das expressões quantitativas aqui fornecidas não são qualificadas com o termo "cerca de". É entendido que, se o termo "cerca de" é usado explicitamente ou não, toda quantidade aqui fornecida deve se referir ao valor real fornecido e também deve se referir à aproximação ao valor fornecido que poderia ser razoavelmente inferida com base em habilidades comuns à técnica, incluindo equivalentes e aproximações devido às condições experimentais e / ou medidas para cada valor fornecido.

[086] Mais particularmente, compostos preferidos de fórmula **I** são aqueles também apresentando a fórmula geral **III** ou um sal, tautômero e estereoisômero farmacologicamente aceitável do mesmo



**III**

em que R1, R2, R3 e R4 são tal como definidos acima na fórmula geral **I**.

[087] Nos compostos de fórmula geral **I** e **III**, o R1 particularmente preferido é selecionado dentre hidrogênio e alquil C1-C12 substituído ou não substituído. Mais preferencialmente, o R1 é selecionado dentre hidrogênio e alquil C1-C6 substituído ou não substituído. Ainda mais preferencialmente, o R1 é selecionado dentre hidrogênio, metil, etil, *n*-propil, isopropil, *n*-butil, *tert*-butil, *sec*-butil e isobutil. O R1 mais preferido são hidrogênio e

metil.

[088] Nos compostos de fórmula geral **I** e **III**, o R2 particularmente preferido é selecionado dentre hidrogênio e -C(=O)Ra, em que Ra é alquil C1-C12 substituído ou não substituído. O Ra mais preferido é o alquil C1-C6 substituído ou não substituído. Ainda mais preferencialmente, o Ra é selecionado dentre metil, etil, *n*-propil, isopropil, *n*-butil, *tert*-butil, *sec*-butil e isobutil. O R2 mais preferido são hidrogênio e acetil.

[089] Nos compostos de fórmula geral **I** e **III**, os R3 e R4 particularmente preferidos são, independentemente, selecionados dentre hidrogênio e -C(=O)Ra, em que Ra na mesma ocorrência, é independentemente selecionado dentre alquil C1-C12 substituído ou não substituído. Mais preferencialmente, o Ra na mesma ocorrência é independentemente selecionado dentre alquil C1-C6 substituído ou não substituído. Ainda mais preferencialmente, o Ra na mesma ocorrência é independentemente selecionado dentre metil, etil, *n*-propil, isopropil, *n*-butil, *tert*-butil, *sec*-butil e isobutil. Mais preferencialmente, os R3 e R4 são, independentemente, selecionados dentre hidrogênio e acetil.

[090] Em modalidades preferidas adicionais, as preferências acima descritas para os diferentes substituintes são combinadas. A presente invenção está também direcionada a tais combinações de substituições preferidas na fórmula geral **I** e **III** acima.

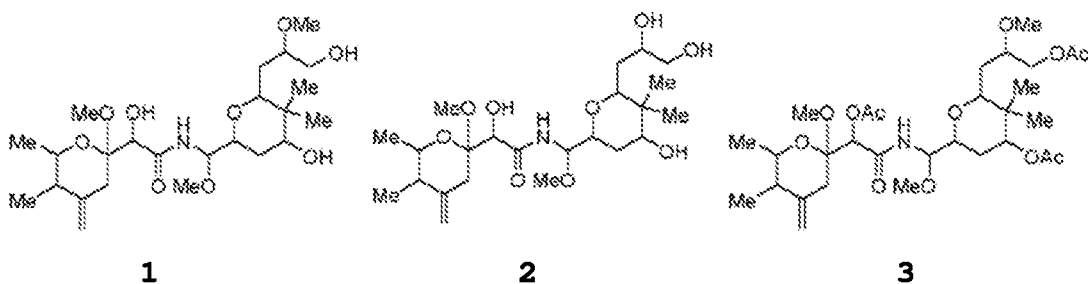
[091] Em uma modalidade, R1 é selecionado dentre alquil C1-C6 substituído ou não substituído e R2 é hidrogênio.

[092] Em outra modalidade, R1 é selecionado dentre alquil C1-C6 substituído ou não substituído e R2 é -C(=O)Ra, em que Ra é alquil C1-C12 substituído ou não substituído.

[093] Em uma modalidade adicional, ambos R1 e R2 são hidrogênios.

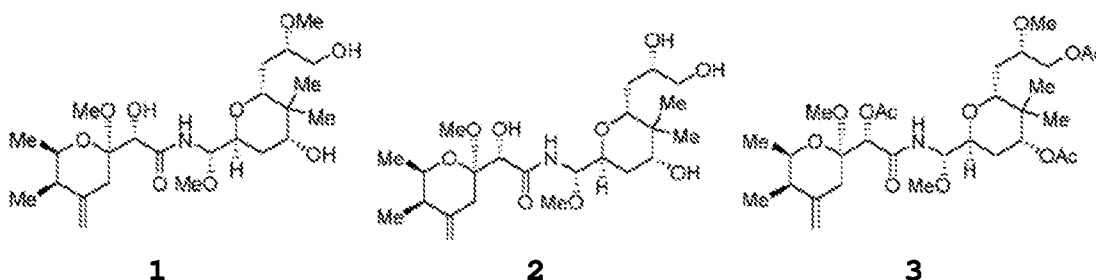
[094] Na presente descrição e definições, quando existem diversos grupos Ra, Rb, Rc, Rd ou R' presentes nos compostos da invenção e, a menos que seja explicitamente indicado desta forma, deve ser entendido que eles podem ser, cada, independentemente diferentes dentro da definição fornecida, isto é, Ra não representa, necessariamente o mesmo grupo simultaneamente em um determinado composto da invenção.

[095] Particularmente, os compostos preferidos da invenção são os que seguem



ou sais, tautômeros ou estereoisômeros farmacologicamente aceitáveis dos mesmos.

[096] Os compostos mais preferidos da invenção são os que seguem:



ou sais, tautômeros ou estereoisômeros farmacologicamente aceitáveis dos mesmos.

[097] Os compostos **1** e **2** foram isolados da *Labrenzia sp.*, denominada cepa PHM005. Esta alfa-proteobactéria foi isolada a partir de uma amostra de sedimento marinho coletado no Oceano Índico. A observação das células pela microscopia eletrônica de transmissão (Figura 1) permitiu a identificação de hastes móveis (0.6 - 0.8 µm de largura e 1.6 - 2.1 µm de comprimento) com flagelos únicos, subpolares inseridos. Uma cultura desta cepa foi depositada no CECT ("Coleção Espanhola de Cultivos Tipo") na Universidade de Valência, Espanha, sob o número de acesso CECT-9225. Este depósito foi feito sob as provisões do Tratado de Budapeste.

[098] A bactéria é claramente dependente de sal marinho, uma vez que ela necessita de mais do que 2.5 % de NaCl para crescer, com a concentração ótima de sal marinho para a produção de **1** sendo de 36 g / L, similar às condições do oceano. As colônias em ágar marinho 2216 (DIFCO) são beges, quase transparentes, suaves e com margem inteira. Após três semanas, as colônias tornaram-se marrom mais escuro, talvez devido ao efeito da produção de bacterioclorofila A e carotenoides, tal como descrito para a *Labrenzia alexandrii* DFL-11T (Biebl e colaboradores, *Evol, Microbiol*, **2007**, 57, 1095 - 1107).

[099] Para o isolamento do microrganismo produtor, todas as manipulações foram realizadas em condições assépticas. A PHM005 foi isolada a partir de uma amostra de sedimento congelada espalhada diretamente em placas de Petri com um meio de sal marinho de seguinte composição (g

/ L): sais marinhos (Tropic Marin® PRO-REEF, 27); ágar, 16; suplementado com cicloheximida 0.2 mg / mL. As placas foram incubadas a 28 °C por três semanas sob pressão atmosférica. Após este período, uma colônia levemente marrom foi picada e transferida para o mesmo meio de sal marinho para confirmar a pureza e iniciar os estudos de taxonomia e fermentação.

[100] Uma avaliação taxonômica de PHM005 foi conduzida por uma sequência parcial de rRNA 16S seguindo procedimentos padrões. A PHM005 foi crescida em caldo marinho (DIFCO 1196) por 72 horas. As células foram recuperadas e lisadas por fervura com 4 % de NP40 por 10 minutos. Os restos celulares foram descartados por centrifugação. O rRNA 16S foi amplificado por reação em cadeia de polimerase usando os iniciadores bacterianos F1 e R5 descritos por Cook e Myers (*Jornal Internacional de Microbiologia Sistemática e Evolucionária*, 2003, 53, 1907 - 1915). A sequência de gene do rRNA 16S de comprimento quase completo obtida é mostrada na SEQ NO: 1.

[101] A árvore filogenética foi gerada pelo alinhamento pareado com base no coeficiente de similaridade e UPGMA para a análise do aglomerado usando o BioNumerics V7.5 para análise de aglomerados. Os vizinhos filogenéticos foram identificados e pareados com as similaridades da sequência de gene do rRNA 16S calculadas por comparação com o banco de dados SILVA LTPs123. A árvore filogenética é mostrada na Figura 2.

[102] A PHM005 produz os compostos **1** e **2** quando esta é cultivada sob condições controladas em um meio adequado. Esta cepa claramente necessita de sal marinho

para crescer. Esta cepa é preferencialmente crescida em um meio de nutriente aquoso convencional. A cultura deve ser conduzida em condições aeróbicas e a produção de compostos **1** e **2** deve começar após 3 dias de temperatura de controle de crescimento entre 26 - 28 °C. Verificou-se que os tanques de fermentação convencionais são bem adequados para realizar o cultivo deste organismo. A adição de nutrientes e o controle do pH, bem como agentes anti-espuma durante os diferentes estágios da fermentação, pode ser necessária para aumentar a produção e evitar a formação de espuma.

[103] Os compostos da presente invenção podem ser produzindo a partir de uma colônia ou uma cultura pura congelada da cepa PHM005 para o desenvolvimento de biomassa suficiente. Esta etapa pode ser repetida inúmeras vezes tal como necessário e o material coletado será usado como um inóculo para semear um ou diversos frascos ou tanques de fermentação com o meio de cultura apropriado. Estes frascos ou tanques podem ser usados para o desenvolvimento do inóculo ou para o estágio de produção, dependendo do volume de caldo necessário. Algumas vezes, o meio de produção pode ser diferente a partir daqueles usados para o desenvolvimento do inóculo.

[104] Os compostos da presente invenção podem ser isolados do caldo de fermentação principalmente a partir de células e a partir do sobrenadante da cepa PHM005 por extração com uma mistura adequada de solventes ou absorção em resinas adequadas.

[105] A separação e purificação da presente invenção a partir do extrato ativo bruto podem ser realizadas usando uma combinação adequada de técnicas

cromatográficas convencionais.

[106] Adicionalmente, os compostos da invenção podem ser obtidos pela modificação daqueles já obtidos a partir da fonte natural ou pela modificação adicional daqueles já modificados pelo uso de uma variedade de reações químicas. Logo, grupos hidroxil podem ser acilados por procedimentos padrão de acoplamento ou acilação, por exemplo, pelo uso de cloreto de acetil ou anidrido acético em piridina ou similares. Grupos formato podem ser obtidos pela reação do alcóxido correspondente com anidrido fórmico acético. Os carbamatos podem ser obtidos pelo aquecimento de precursores do hidroxil com isocianatos. Os carbonatos podem ser obtidos pelo uso do anidrido correspondente e um ativador, tal como  $Mg(ClO_4)_2$  ou  $Zn(OAc)_2$ , grupos hidroxil podem também ser convertidos em grupos alcoxi por alquilação usando um brometo iodeto de alquil ou sulfonato ou em um grupo alcoxi amino inferior pelo uso, por exemplo, de uma 2-bromoetilamina protegida. Quando necessário, grupos de proteção apropriados podem ser usados nos substituintes para garantir que grupos reativos não sejam afetados e para toda a funcionalização seletiva dos grupos hidroxil. Os procedimentos e reagentes necessários para preparar estes derivados são conhecidos por um técnico no assunto e podem ser encontrados em livros gerais tais como Química Orgânica Avançada de March, 7ª Edição, 2013, Wiley Interscience.

[107] Uma importante característica dos compostos acima descritos de fórmula **I** e **III** é sua bioatividade e, em particular, sua atividade citotóxica contra células de tumor. Logo, com esta invenção, nós fornecemos composições

farmacêuticas de compostos de fórmula geral **I** e **III**, ou um sal, tautômero ou estereoisômero farmacêuticamente aceitável do mesmo que possui atividades de citotoxicidade e seu uso como agentes anticâncer. A presente invenção ainda fornece composições farmacêuticas compreendendo um composto de fórmula geral **I** e **III**, ou um sal, tautômero ou estereoisômero farmacêuticamente aceitável do mesmo, com um carreador ou diluente farmacêuticamente aceitável.

[108] Exemplos de composições farmacêuticas incluem qualquer composição sólida (comprimidos, pílulas, cápsulas, grânulos, pós para frascos, etc.) ou líquida (soluções, suspensões ou emulsões) para administração oral, tópica ou parenteral.

[109] A administração dos compostos ou composições da presente invenção pode ser por qualquer método adequado, tal como infusão intravenosa, preparações orais e administração intraperitoneal e intravenosa. Nós preferimos que tempos de infusão de até 24 horas sejam usados, mais preferencialmente 1 - 12 horas, com 1 - 6 horas mais preferido. Curtos tempos de infusão os quais permitem que o tratamento seja realizado sem um pernoite no hospital são especialmente desejáveis. No entanto, a infusão pode ser de 12 a 24 horas ou até mesmo mais longa se desejado. A infusão pode ser realizada em intervalos adequados do dia 1 a 4 semanas. As composições farmacêuticas contendo os compostos da invenção podem ser distribuídas por lipossomas ou encapsulamento de nano esferas, em formulações de liberação sustentada ou por outros meios de distribuição padrão.

[110] A dosagem correta dos compostos irá variar

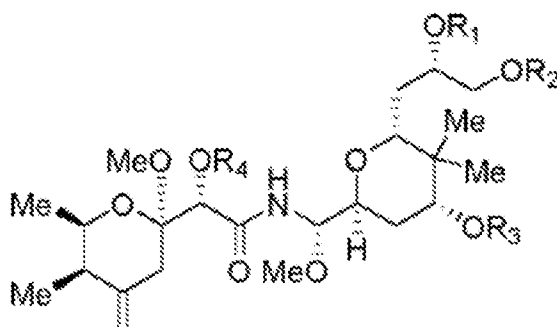
de acordo com a formulação particular, o modo de aplicação, e o estado particular, hospedeiro e tumor a ser tratado. Outros fatores, como idade, peso corporal, sexo, dieta, tempo de administração, taxa de excreção, condição do hospedeiro, combinações de fármacos, sensibilidades a reações e severidade da doença devem ser considerados. A administração pode ser realizada continuamente ou periodicamente dentro da dose máxima tolerada.

[111] Como aqui utilizado, os termos "tratar", "tratando" e "tratamento" incluem a erradicação, remoção, modificação ou controle de um tumor ou células ou tecido com câncer primário, regional ou metastático e a minimização do retardo do espalhamento do câncer.

[112] Os compostos da invenção apresentam atividade anticâncer contra diversos tipos de câncer, os quais incluem, porém não estão limitados a câncer de pulmão, câncer de cólon, câncer de mama e câncer de pâncreas.

[113] Logo, em modalidades alternativas da presente invenção, a composição farmacêutica compreendendo um composto de fórmula **I** e **III** tal como definido acima é para o tratamento de câncer de pulmão, câncer de cólon, câncer de mama ou câncer de pâncreas.

[114] Em um sexto aspecto, a presente invenção está direcionada a um processo para a produção de compostos de fórmula **II**. Processos preferidos de acordo com este aspecto da invenção são aqueles que produzem um composto também apresentando a fórmula **IV**



IV

ou um sal, tautômero ou estereoisômero farmacologicamente aceitável do mesmo;

em que R1, R2, R3 e R4 são tal como definidos acima na fórmula geral **II**.

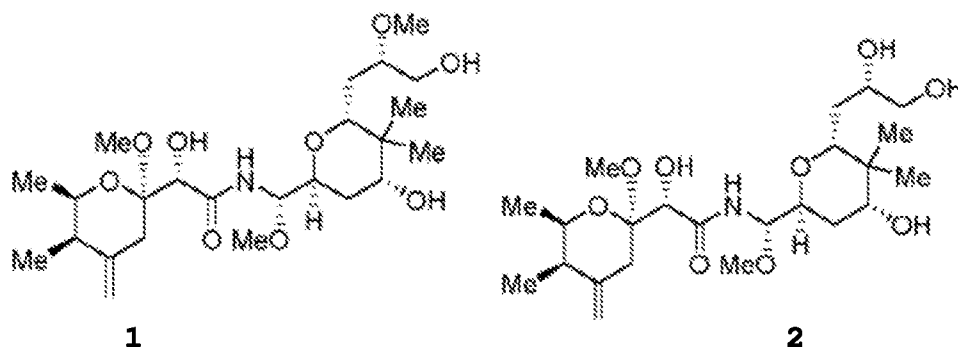
[115] Nos processos para a síntese de compostos de fórmula **II** e **IV**, o R1 particularmente preferido é selecionado dentre hidrogênio, alquil C1-C12 substituído ou não substituído e -C(=O)Ra, em que Ra é alquil C1-C12 substituído ou não substituído. Mais preferencialmente, R1 é selecionado dentre hidrogênio, alquil C1-C6 substituído ou não substituído e -C(=O)Ra, em que Ra é alquil C1-C6 substituído ou não substituído. Ainda mais preferencialmente, R1 é selecionado dentre hidrogênio, metil, etil, *n*-propil, isopropil, *n*-butil, *tert*-butil, *sec*-butil, isobutil e -C(=O)Ra em que Ra é selecionado dentre metil, etil, *n*-propil, isopropil, *n*-butil, *tert*-butil, *sec*-butil e isobutil. O R1 mais preferido é selecionado dentre hidrogênio e metil.

[116] Em processos para a síntese de compostos de fórmula **II** e **IV**, o R2 particularmente preferido é selecionado dentre hidrogênio, alquil C1-C12 substituído ou não substituído e -C(=O)Ra em que Ra é alquil C1-C12 substituído ou não substituído. Mais preferencialmente, R2 é selecionado dentre hidrogênio, alquil C1-C6 substituído

ou não substituído e  $-(C=O)Ra$  em que  $Ra$  é alquil C1-C6 substituído ou não substituído. Ainda mais preferencialmente,  $R2$  é selecionado dentre hidrogênio, metil, etil, *n*-propil, isopropil, *n*-butil, *tert*-butil, *sec*-butil, isobutil e  $-(C=O)Ra$  em que  $Ra$  é selecionado dentre metil, etil, *n*-propil, isopropil, *n*-butil, *tert*-butil, *sec*-butil e isobutil. Os  $R2$  mais preferidos são hidrogênio, metil e acetil.

[117] Em processos para a síntese de compostos de fórmula **II** e **IV**, os  $R3$  e  $R4$  particularmente preferidos são, independentemente, selecionados dentre hidrogênio e  $-(C=O)Ra$ , em que  $Ra$  na mesma ocorrência, é independentemente selecionado dentre alquil C1-C12 substituído ou não substituído. Mais preferencialmente,  $Ra$ , em cada ocorrência, é independentemente selecionado dentre alquil C1-C6 substituído ou não substituído. Ainda mais preferencialmente,  $Ra$  é selecionado dentre metil, etil, *n*-propil, isopropil, *n*-butil, *tert*-butil, *sec*-butil e isobutil. Os  $R3$  e  $R4$  mais preferidos são, independentemente, selecionados dentre hidrogênio e acetil.

[118] Em processos para a síntese de compostos de fórmula **II** e **IV**, compostos **1** e **2** particularmente preferidos apresentam, respectivamente, a seguinte estereoquímica relativa:



[119] Em modalidades preferidas adicionais, as preferências acima descritas para os diferentes substituintes são combinadas. A presente invenção está também direcionada a tais combinações de substituições preferidas nos processos para a síntese de compostos de fórmula **II** e **IV** acima.

[120] Em uma modalidade mais preferida deste aspecto da invenção, o composto de fórmula **II** ou **IV** é pederina.

[121] Em uma modalidade ainda mais preferida, a pederina é obtida a partir do composto **1'** pela:

- Proteção de todos os grupos hidroxil no composto **1'** com um grupo de proteção para o -OH adequado para ser seletivamente removido a partir de um OH primário protegido na presença de um OH secundário protegido. Exemplos de tais grupos de proteção incluem trimetilsilil, trietilsilil, triisopropilsilil e *tert*-butildimetilsilil. O grupo de proteção mais preferido para esta etapa é o *tert*-butildimetilsilil;

- Remoção seletiva do grupo de proteção do OH primário;

- Metilação do grupo de hidroxil primário resultante com um reagente de metilação adequado; e

- Remoção dos outros grupos de proteção para o OH.

[122] Em outra modalidade mais preferida, a pederina é obtida a partir do composto **2'** por:

- Proteção do grupo 1,2-diol com um grupo de proteção adequado para 1,2-diois. Exemplos de grupos de proteção adequados para 1,2-diois incluem, porém não estão limitados a, aqueles grupos que, após a reação com o 1,2-

diol correspondente, geram Mocdeno acetal, Bocdeno acetal, acroleína acetal, benzilideno acetal, (*t*-butil dimetil sililoxi) benzilideno acetal, mesitileno acetal, metoximetileno acetal, etoximetileno acetal, carbonatos cíclicos, metil boronato e etil boronato. Os grupos de proteção mais preferidos para esta etapa são aqueles que geram um Mocdeno acetal, Bocdeno acetal, benzilideno acetal e carbonatos cíclicos sendo o grupo de proteção que gera um benzilideno acetal o mais preferido;

- Proteção de outro grupo hidroxil com um grupo de proteção para o -OH que é ortogonal com o grupo de proteção 1,2-diol da etapa anterior. Exemplos de grupos de proteção para o OH adequados para esta etapa são trimetilsilil, trietilsilil, triisopropilsilil *tert*-butildimetilsilil e acetil. Os grupos de proteção mais preferidos para esta etapa são *tert*-butildimetilsilil e acetil;

- Remoção do grupo de proteção 1,2-diol;

- Metilação do 1,2-diol resultante com uma reagente de metilação adequado; e

- Remoção dos outros grupos de proteção para o OH.

[123] Exemplos de reagente de metilação adequados incluem metil iodeto, metil brometo, dimetilsulfato e metil triflato.

[124] O ácido nucleico isolado de acordo com o oitavo aspecto da invenção é preferencialmente derivado de *Labrenzia sp* e, em particular, da cepa PHM005.

[125] A sequência de genoma completa desta bactéria revelada pelo aglomerado de gene biossintético responsável pela síntese da pederina e onnamide. A análise bioinformática foi usada para prever a função dos genes no

aglomerado.

[126] Este aglomerado de gene, denominado aglomerado de gene **Lab**, é um aglomerado de gene policetídeo sintase Trans-AT híbrido / sintetase não ribossomal (PKS / NRPS) com 69 Kb. Ele foi deduzido a partir da mineração do genoma a partir do sequenciamento completo do genoma da cepa PHM005 composto por 20 ORF homólogos ao descrito para o aglomerado de gene da pederina. Ele contém genes que codificam enzimas para a biossíntese de compostos tipo pederina e tipo onnamide.

[127] Em uma modalidade preferida, o ácido nucleico isolado preferencialmente compreende fragmentos de ácido nucleico que formam unidades individuais e / ou módulos do aglomerado de gene biossintético Lab tal como ele é mostrado em mais detalhes na Figura 3. Tal como mostrado na Figura 3, o aglomerado de gene Lab contém as unidades *lab706* a *lab726*.

[128] Em uma modalidade particularmente preferida, o ácido nucleico isolado de acordo com o oitavo aspecto da presente invenção compreende:

- uma sequência de nucleotídeos tal como mostrada na SEQ ID NO: 2; ou
- uma sequência de nucleotídeos a qual é o complemento da SEQ ID NO: 2; ou
- uma sequência de nucleotídeos que hibridiza sob condições altamente rigorosas para a SEQ ID NO: 2; ou para o complemento da mesma; ou
- uma sequência de nucleotídeos apresentando pelo menos 80 % de identidade de sequência com SEQ ID NO: 2 ou com o complemento da mesma.

[129] Fragmentos de ácido nucleico particularmente preferidos de acordo com o nono aspecto da presente invenção são fragmentos de ácido nucleico compreendendo essencialmente pelo menos um dos genes *lab708*, *lab709*, *lab710*, *lab721*, *lab722*, *lab723*, *lab724* e *lab725*. Ainda preferidos são os fragmentos de ácido nucleico compreendendo uma ou mais sequências de nucleotídeos que codifica a sequência de proteínas tal como mostrada na SEQ ID NOs: 3 a 23. São também preferidas as partes que são partes correspondentes da sequência de nucleotídeos SEQ ID NO: 2.

[130] Em outra modalidade preferida, fragmentos particularmente preferidos são aqueles que consistem essencialmente de *lab719* e / ou *lab720*. Ainda preferido é o fragmento de ácido nucleico compreendendo a sequência de nucleotídeos que codifica a sequência de proteína tal como mostrada na SEQ ID NO: 16 e / ou SEQ ID NO: 17. Também preferida são as partes correspondentes da sequência de nucleotídeos SEQ ID NO: 2.

[131] A anotação do genoma completo de PHM005 revela um cromossomo circular com um comprimento de 6167 bp, 5651 que codificam sequências (CDS), 53 tRNA e 10 rRNA. 55 % G+C.

[132] Explorando o genoma completo em um único contig usando o software para predição / identificação de metabolismos secundários como antiSMASH V 3.0 (Weber e colaboradores, Pesquisa do ácido nucleico, 2015 *doi: 10.1093/nar/gkv437*), 102 Kb de um grande aglomerado de genes PKS / NRPS híbrido é detectado. Dentre os 317 ORFs analisados, 20 genes (69 Kb) mostraram homologias às

sequências de pederina (*ped*) e de onnamide (*onn*) baseadas em BLASTp contra o simbiote bacteriano de *Paedeus fascipens* (GenBank AH013687.2) e o simbiote bacteriano de *Theonella swinhoei* (GenBank AY688304.1) tal como mostrado em maiores detalhes na **Tabela 1**.

[133] **Tabela 1.** Homologias dos genes ***lab*** em relação aos genes ***ped*** (pederina) e ***onn*** (onnamide).

Gene <i>lab</i>	Tamanho da proteína (aas)	Função putativa na PHM005 da <i>Labrenzia</i> sp.	Simbionte bacteriano <i>Paedeus fuscipens</i> (AH013687.2)		Simbionte bacteriano <i>Theonella swinhoei</i> (AY688304.1)	
			Gene	% H / Q*	Gene	% H / Q
<b>706</b>	80	Proteína carreadora da acil biossíntese de policetídeos (ACP)	<b><i>pedN</i></b>	47/87	-	Sem homologia
<b>707</b>	425	Sintase ACP 3-hidroxi-3 metilglutaril da biossíntese de policetídeos (HMGS)	<b><i>pedP</i></b>	61/99	<b><i>onnA</i></b>	60/99
<b>708</b>	1165	Policetídeo sintase (GNAT-ACP-KS-DHt)	<b><i>pedI</i></b>	42/93	<b><i>onnB</i></b>	39/98
<b>709</b>	3219	TransAT PKS (KR-cMT-ACP-KS-TransAT-ECH-ACPb- ACPb-KS-KR)	<b><i>pedI</i></b>	49/94	<b><i>onnB</i></b> <b><i>onnI</i></b>	41/73 45/73
<b>710</b>	97	Sítio ligado à fosfopanteteína (ACP)	<b><i>pedI</i></b>	46/90	<b><i>onnI</i></b>	34/73
<b>711</b>	373	Monooxigenase (OX)	<b><i>pedJ</i></b>	60/98	<b><i>onnC</i></b>	58/98
<b>712</b>	318	Metiltransferase (oMT)	<b><i>pedA</i></b>	47/97	<b><i>onnG</i></b> <b><i>onnD</i></b>	51/99 46/97

Gene lab	Tamanho da proteína (aas)	Função putativa na PHM005 da <i>Labrenzia</i> sp.	Simbionte bacteriano <i>Paedeus fuscipens</i> (AH013687.2)		Simbionte bacteriano <i>Theonella swinhoei</i> (AY688304.1)	
			Gene	% H / Q*	Gene	% H / Q
<b>713</b>	414	Citocromo P450		Sem homologia		Sem homologia
<b>714</b>	447	Transacilase malonil CoA-ACP (ou oxidoreductase)	<b>pedB</b>	56/98		Sem homologia
<b>715</b>	337	Transacilase malonil CoA-ACP	<b>pedC</b>	38/94		Sem homologia
<b>716</b>	375	Transacilase malonil CoA-ACP	<b>pedD</b>	51/95		Sem homologia
<b>717</b>	253	Enoil transferase	<b>pedL</b>	43/91		Sem homologia
<b>718</b>	411	Beta-cetoacil-sintase	<b>pedM</b>	30/81		Sem homologia
<b>719</b>	2254	TransAT PKS / NRPS misturado (ACP-KS-TransAT-DH-KR-ACP-KS-DH-DH- ACP-KS-TransAT-KR-ACP-KS-TransAT-C- A-PCP-TE)	<b>pedH</b>	42/99	<b>onnI</b>	35/84
<b>720</b>	437	Oxidoreductase (Ox)	<b>pedG</b>	73/94		Sem homologia
<b>721</b>	1986	TransAT-PKS	<b>pedF</b>	40/99	<b>onnI</b>	30/82

Gene <i>lab</i>	Tamanho da proteína (aas)	Função putativa na PHM005 da <i>Labrenzia</i> sp.	Simbionte bacteriano <i>Paedeus fuscipens</i> (AH013687.2)		Simbionte bacteriano <i>Theonella swinhoei</i> (AY688304.1)	
			Gene	% H / Q*	Gene	% H / Q
<b>722</b>	1949	(PS-KR-ACP-KS-TransAT-KR-KS-TransAT) Policetídeo sintase TransAT (TransAT-KR-cMT-ACPb-KS-TransAT-DH)	<b><i>pedF</i></b>	44/97	<b><i>onnI</i></b>	36/86
<b>723</b>	875	Policetídeo sintase (KR-ACP-KS)	<b><i>pedF</i></b>	49/93	<b><i>onnB</i></b>	52/96
<b>724</b>	1986	PKS / NRPS misturado (DHt-ACP-C-A(gly)-PCP-KS-TransAT)	<b><i>pedF</i></b>	42/99	<b><i>onnI</i></b>	38/96
<b>725</b>	377	Policetídeo sintase (KS)	<b><i>pedF</i></b>	48/99	<b><i>onnI</i></b>	46/92
<b>726</b>	278	Metiltransferase (MT)	<b><i>pedE</i></b>	51/98	<b><i>onnH</i></b>	43/99

(\*): H: Homologia em %. Q: Dúvida coberta em %

[134] O aglomerado de gene Lab putativo compreende fragmentos de ácido nucleico de 69 Kb que formam unidades individuais e / ou módulos similares àqueles descritos para o aglomerado de gene biossintético da pederina tal como ele é mostrado em mais detalhes na Figura 3.

[135] O aglomerado de gene Lab PKS/NRPS TransAT híbrido é composto principalmente por um PKS (composto por ORF *lab708*, *lab709* e *lab710*) e dois sistemas PKS / NRPS misturados (*lab721*, *lab722*, *lab723*, *lab724*, *lab725* e *lab719*) flanqueados por oxigenases, oxidoredutases e metilases em arquitetura fechada similar àquela descrita por J. Piel para os genes *ped*. As funções previstas e a composição de aminoácidos de cada ORF são detalhadas na Tabela 1.

[136] A TransAT-PKS *lab708*, *lab709*, *lab710* (4.481 aminoácidos) é composta pelos módulos GNAT-ACP-KS-DHt-KR-cMT-ACP-KS-TransAT-ECH-ACP-ACP-KS-KR-ACP similar àquele descrito para *pedI* com homologias de 42 - 49 %. Este aglomerado de gene biossintético pode ser responsável pela biossíntese dos anéis de seis membros que carregam o grupo exometileno da estrutura da pederina. Em que os domínios são GNAT: N-acetiltransferase relacionada ao Gcn5; ACP: proteína carreadora de acil; KS: cetosintase; DHt: desidratase; KR: cetoredutase; cMT: metiltransferase; ECH Enoil-CoA-hidratase o crotonase; TransAT: trans acil transferase).

[137] O híbrido Trans-AT PKS / NRPS formado por *lab721*, *lab722*, *lab723*, *lab724*, *lab725* (5.385 aa) é composto por 6 cetosintases e 1 NRPS com uma adenilação clara para a glicina. (PS-KR-ACP-KS-TransAT-KR-KS-TransAT-

transAT-KR-cMT-ACP-KS-TransAT-DH-KR-ACP-KS-DHt-ACP-C-A (gly)-PCP-KS-TransAT-KS). Com 40 - 49 % de homologia para *pedF*, porém essencialmente as mesmas funções e arquitetura de módulos. Em que os domínios são C: condensação do peptídeo não ribossomal; A: adenilação do peptídeo não ribossomal; PCP: tiolação e proteína carreadora de peptídeo.

[138] De acordo com uma modalidade preferida do nono aspecto da invenção, nós identificamos o sistema *lab719* PKS / NRPS relacionado a biossíntese de qualquer composto tipo onnamide a partir do aglomerado de gene *Lab*. Este novo composto putativo ainda não foi identificado no caldo de fermentação da PHM005. É possível que o produto do gene *lab720*, uma oxidoreductase, irá evitar a formação de compostos tipo onnamide pela clivagem da estrutura da pederina antes de adicionar o primeiro domínio ACP no *lab719* ou uma quebra oxidativa final é produzida após sua biossíntese. A mesma dúvida foi discutida por J. Piel no WO 03/044186 A2. A modificação genética do gene *lab719* (homologia a *pedG*) irá resolver essa incerteza.

[139] Este gene transAT PKS / NRPS híbrido "silenciado", representado por *lab719* (2.254 aa) é composto por 4 KS e 1 NRPS com domínio de adenilação incerto, talvez para a incorporação de Arg (tal como no caso da onnamide), porém Asp, Asn, Glu e Gln poderiam ser outras possíveis alternativas tal como proposto pelo algoritmo NRSPredictor2 SVM. A composição deste ORF é (ACP-KS-TransAT-DH-KR-ACP-KS-DH-DH-ACP-KS-TransAT-KR-ACP-KS-TransAT-C-A -PCP-TE). Em que TE: domínio Tioesterase.

[140] O único ORF na região *lab* sem homologia com

a sequência das ilhas ped, onn ou nsp (nosperina) é *lab713*, putativo para um citocromo P450, talvez atuando em um papel na oxigenação de policetídeos, tal como descrito por J. Piel no caso das ilhas ped. (J. Bacteriol. 2004. 186(5), 1280 - 1286) com genes com função atribuída similares.

[141] Particularmente o sistema enzimático modular preferido de acordo com o décimo aspecto da presente invenção compreende uma sequência de proteína de acordo com qualquer uma das sequências SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 23 ou uma sequência de proteína apresentando pelo menos 80 % de identidade de sequência com estas sequências.

[142] Particularmente células hospedeiras preferidas de acordo com o décimo segundo aspecto da presente invenção são células bacterianas. Mais particularmente células hospedeiras preferidas são *Pseudomonas, Acinetobacter, Bacillus, Streptomyces e. coli*.

[143] A modificação inventiva no aglomerado de gene biossintético Lab pode ser usada no preparo de um aglomerado de gene biossintético Lab modificado ou no preparo de compostos tipo pederina ou tipo onnamide.

[144] Em uma modalidade preferida de acordo com o décimo terceiro aspecto da presente invenção, o produto do *lab719* é expresso.

#### **EXEMPLOS**

[145] **Procedimento de Elucidação da Estrutura Geral.** Rotações ópticas foram determinadas usando um polarímetro Jasco P-1020. Os espectros de NMR foram obtidos em um espectrômetro Varian "Unity 500" a 500 / 125 MHz (1H / 13C) e em espectrômetro Varian "Unity 400" a 400 / 100 MHz (1H / 13C). Trocas químicas foram reportadas em ppm

usando o pico para solvente residual para o CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$  7.26 ppm para 1H e 77.0 ppm para 13C) como uma referência interna. (+)ESIMS foram registrados usando um espectrômetro Agilent 1100 Series LC / MSD. A espectroscopia de massa de alta resolução (HRMS) foi realizada usando um sistema Agilent 6230 TOF LC / MS e a técnica ESI - MS.

**Exemplo 1:** Isolamento da bactéria

[146] A bactéria produtora tipo pederina, *Labrenzia* sp., PHM005 foi isolada de uma amostra de sedimento coletada de uma profundidade de 18 m de um habitat de esponja de coral altamente epífita e não identificada na costa do Quênia em 2005. Aproximadamente 5 gramas de material de cascalho do mar foram coletados em um tubo Falcon de 50 ml contendo água do mar artificial estéril (ASW) e mantidos a 5 °C por 5 dias antes de ser processado. Uma vez no laboratório, a amostra foi homogeneizada e 100  $\mu$ l de uma diluição de 1:100 com ASW espalhada diretamente em placas de Petri com um meio de sal marinho composto por 27 g / L de sais marinhos (Tropic Marin® PRO-REEF), 16 g / L de ágar e 0,2 mg / mL de cicloheximida. Após incubação por três semanas a 28 °C, uma colônia levemente marrom foi colhida e transferida para o mesmo meio de sal marinho para confirmar a pureza e gerar biomassa para caracterização molecular, com uma colônia sendo inoculada em caldo marinho líquido para posterior conservação em glicerol a 20 % a - 80 °C como banco de células.

**Exemplo 2:** Microscopia eletrônica.

[147] As células na fase de crescimento exponencial intermediário foram adsorvidas em grades

revestidas com colódio de carbono de 400 mesh por 2 min, negativamente coradas com 2 % de uranil acetato, imageadas com um microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1011 operado a 100 kV e fotografado com uma câmera CCD Gatan Erlangshen ES1000W.

**Exemplo 3:** Caracterização do rRNA 16S.

[148] Para a extração do DNA, a cepa foi crescida em caldo marinho (DIFCO 1196) por 72 horas. As células foram recuperadas e lisadas por fervura com 4 % de NP40 por 10 minutos. Os restos celulares foram descartados por centrifugação. O gene rDNA 16S foi amplificado por reação em cadeia de polimerase usando os iniciadores bacterianos F1 e R5. A árvore filogenética (Figura 2) foi gerada pelo coeficiente de similaridade baseado no alinhamento pareado e UPGMA para análise de aglomerados utilizando o BioNumerics V7.5 (matemática aplicada). Os vizinhos filogenéticos foram identificados e as semelhanças de sequência do gene rDNA 16S foram calculadas por comparação com o banco de dados SILVA LTPs123.

**Exemplo 4:** Cultivo e extração.

[149] A cepa claramente necessita de sal marinho para crescer. Após a cultura, os caldos inteiros foram liofilizados e extraídos com uma mistura de solventes orgânicos e uma amostra de 0,5 mL do extrato bruto foi seca e avaliada quanto à atividade citotóxica. A melhor atividade citotóxica foi alcançada no meio 16B / d às 120 h. Este meio consistia em 17,5 g / L de levedura de cerveja (Sensient, G2025), 76 g / L de manitol, 7 g / L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 13 g / L de CaCO<sub>3</sub>, 0.09 g / L de FeCl<sub>3</sub> e 36 g / L de sais marinhos (Tropic Marin® PRO-REEF). Um

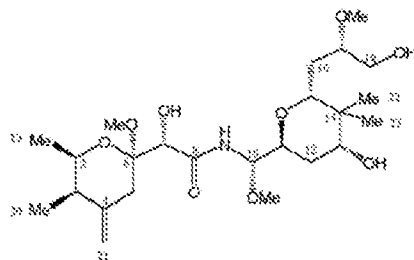
escalonamento para 50 L desta bactéria em meio 16B / d foi preparado em frascos Erlenmeyer de 200 x 2 L, cada um com um volume de trabalho de 250 mL. Os frascos de produção foram inoculados com 2 % das bactérias cultivadas durante 72 h em caldo marinho (DIFCO 1196) a partir de outro pré-inóculo altamente cultivado. O escalonamento foi incubado durante 120 h a 28 °C em um agitador rotatório a 220 rpm com excentricidade de 5 cm. A cultura foi, então, centrifugada a 6000 rpm durante 20 minutos para fornecer 45 L de sobrenadante aquoso que foi extraído duas vezes com EtOAc e a fase orgânica seca para fornecer um extrato bruto (1,8 g).

**Exemplo 5:** Isolamento do Composto 1.

[150] O extrato foi aplicado a um sistema VFC de sílica gel (cromatografia flash a vácuo), usando um gradiente de eluição gradual com misturas de *n*-hexano - EtOAc e EtOAc - MeOH para fornecer onze frações. As frações ativas foram eluídas com EtOAc e EtOAc - MeOH 9:1 (550.0 mg) e foram submetidas a HPLC preparativo de fase reversa usando uma coluna de simetria C18 (19 x 150 mm, 7 µm) e um gradiente linear de H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN de 5 % a 35 % de CH<sub>3</sub>CN por 30 min a uma taxa de fluxo de 13.5 mL / min, para fornecer uma fração de pico muito ativo (77.0 mg) com um tempo de retenção de 24.5 min contendo **1** com base no cromatograma do HPLC - MS. Esta fração foi ainda purificada por HPLC semipreparativo em uma coluna XBridge C18 (10 x 250 mm, 5 µm) e eluição isocrática com H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN (78:22) em um fluxo de 4 mL / min, para render 24.5 mg do composto **1** puro com um tempo de retenção de 25.0 min nestas condições do HPLC.

[151] **(1)**: óleo incolor;  $[\alpha]_{D20} + 82.4$  ( $c=0.49$ ; CHCl<sub>3</sub>) e  $[\alpha]_{D20} + 81.3$  ( $c=0.36$ ; MeOH); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.99 (1H, dq,  $J=6.6, 2.7$  Hz, H-2), 2.25 (1H, dq,  $J=7.1, 2.7$  Hz, H-3), 2.43 (1H, d,  $J=14.1$  Hz, H-5a), 2.36 (1H, dt,  $J = 14.1, 2.3$  Hz, H-5b), 4.31 (1H, s, H-7), 7.18 (1H, d,  $J=9.8$  Hz, NH), 5.37 (1H, dd,  $J=9.8, 7.8$  Hz, H-10), 3.83 (1H, dt,  $J=7.8, 2.7$  Hz, H-11), 2.04 (1H, dt,  $J=13.5, 3.6$  Hz, H-12a), 1.75 (1H, m, H-12b), 3.64 (1H, m, H-13), 3.31 (1H, m, H-15), 1.75 (1H, m, H-16a), 1.57 (1H, dd,  $J=14.3, 9.7$  Hz, H-16b), 3.36 (1H, m, H-17), 3.65 (1H, m, H-18a), 3.48 (1H, m, H-18b), 1.19 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-19), 1.01 (3H, d,  $J=7.1$  Hz, H-20), 4.85 (1H, t,  $J = 2.3$  Hz, H-21a), 4.73 (1H, t,  $J = 2.3$  Hz, H-21b), 0.95 (3H, s, C-22), 0.88 (3H, s, C-23), 3.32 (3H, s, MeO-6), 3.38 (3H, s, MeO-10), 3.32 (3H, s, MeO-17); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  69.6 (d, C-2), 41.3 (d, C-3), 145.7 (s, C-4), 34.1 (t, C-5), 99.7 (s, C-6), 73.1 (d, C-7), 171.9 (s, C-8), 79.4 (d, C-10), 72.6 (d, C-11), 29.6 (t, C-12), 71.8 (d, C-13), 38.4 (s, C-14), 75.4 (d, C-15), 29.2 (t, C-16), 79.0 (d, C-17), 63.8 (t, C-18), 17.9 (q, C-19), 12.0 (q, C-20), 110.5 (t, C-21), 23.1 (s, C-22), 13.5 (s, C-23), 49.1 (q, MeO-6), 56.4 (q, MeO-10), 56.6 (q, MeO-17); (+)-ESIMS  $m/z$  512.3 [M + Na]<sup>+</sup>; (+)-HRES-TOFMS  $m/z$  512.2873 [M + Na]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>24</sub>H<sub>43</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>Na, 512.2830).

[152] A estereoquímica relativa do composto **1** foi estabelecida como



com base nos dados ROESY e análise de constantes de

acoplamento. A rotação óptica do composto **1** ( $[\alpha]_{D20} + 82.4$ ,  $c = 0.49$ ;  $\text{CHCl}_3$  e  $[\alpha]_{D20} + 81.3$ ,  $c = 0.36$ ;  $\text{MeOH}$ ) mostrou o mesmo sinal que a pederina ( $[\alpha]_{D20} + 86.8$ ,  $c = 1.00$ ;  $\text{CHCl}_3$ ). A estereoquímica absoluta da pederina foi estabelecida por estudo cristalográfico de raios X (Simpson, J. S. et. al. *J. Nat. Prod.* 2000, 63, 704 - 706) e síntese estereosseletiva (Matsuda, F., et. al. *Tetrahedron* 1988, 44, 7063 - 7080). Sendo assim, propomos provisoriamente que a configuração absoluta do composto **1** seja igual à pederina e outros compostos análogos relatados (Wan, S. et. al. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 16668 - 16679).

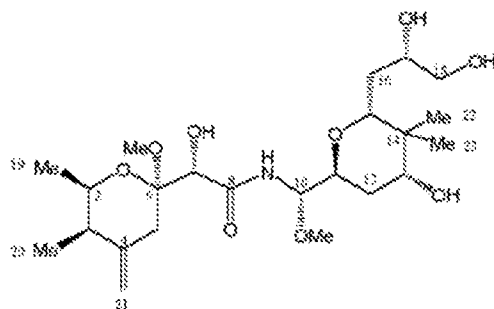
**Exemplo 6.** Isolamento do composto **2**.

[153] O composto **2** foi isolado a partir extrato bruto do caldo inteiro (9.5 g) do caldo de fermentação (15 L) da cepa PHM005 derivada do mar. O extrato foi aplicado a um sistema VFC de sílica gel (cromatografia flash a vácuo), usando um gradiente de eluição gradual com misturas de *n*-hexano - EtOAc e EtOAc - MeOH para fornecer sete frações. A fração ativa contendo o composto **2** foi eluída com EtOAc - MeOH 4:1 (659.0 mg) e foi submetida ao HPLC semipreparativo de fase reversa equipado com uma coluna de simetria C18 (7.8 x 150 mm, 5 $\mu$ m) usando um gradiente linear de H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN de 5 % a 60 % de CH<sub>3</sub>CN em 25 min em uma taxa de fluxo de 3.0 mL / min, para fornecer uma fração de tempo muito ativa entre 25 - 30 minutos (28,0 mg) contendo o composto **2** com base no cromatograma HPLC-MS. Esta fração foi novamente purificada por HPLC semipreparativo em uma coluna de simetria C18 (7.8 x 150 mm, 5  $\mu$ m), usando um gradiente linear de H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN a partir de 20 % a 30 % de CH<sub>3</sub>CN em

20 min em uma taxa de fluxo de 2.5 mL / min, para render 2.6 mg do composto **2** puro com um tempo de retenção de 11.5 min nestas condições do HPLC.

[154] **2**: óleo incolor;  $[\alpha]_{D20} + 64.5$  ( $c=0.16$ ; CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.97 (1H, dq,  $J=6.6$ , 2.6 Hz, H-2), 2.25 (1H, dq,  $J=7.1$ , 2.6 Hz, H-3), ), 2.50 (1H, dt,  $J=14.2$ , 1.45 Hz, H-5a), 2.45 (1H, d,  $J=14.1$  Hz, H-5b), 4.32 (1H, s, H-7), 7.17 (1H, d,  $J=9.9$  Hz, NH), 5.44 (1H, dd,  $J=9.9$ , 7.5 Hz, H-10), 3.95 (1H, m, H-11), 2.05 (1H, dt,  $J=13.5$ , 4.0 Hz, H-12a), 1.75 (1H, m, H-12b), 3.66 (1H, m, H-13), 3.58 (1H, m, H-15), 1.80 (1H, m, H-16a), 1.55 (1H, m, H-16b), 3.80 (1H, m, H-17), 3.57 (1H, m, H-18), 3.44 (1H, dd,  $J=11.5$ , 6.5 Hz, H-18), 1.19 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-19), 1.01 (3H, d,  $J=7.1$  Hz, H-20), 4.85 (1H, t,  $J=1.45$  Hz, H-21a), 4.75 (1H, t,  $J=1.45$  Hz, H-21b), 0.96 (3H, s, C-22), 0.89 (3H, s, C-23), 3.34 (3H, s, MeO-6), 3.41 (3H, s, MeO-10); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  69.6 (d, C-2), 41.3 (d, C-3), 146.1 (s, C-4), 34.2 (t, C-5), 99.6 (s, C-6), 74.5 (d, C-7), 171.9 (s, C-8), 79.3 (d, C-10), 72.2 (d, C-11), 29.8 (t, C-12), 71.6 (d, C-13), 38.4 (s, C-14), 80.9 (d, C-15), 31.4 (t, C-16), 72.8 (d, C-17), 66.6 (t, C-18), 17.8 (q, C-19), 11.9 (q, C-20), 110.2 (t, C-21), 23.4 (s, C-22), 14.3 (s, C-23), 49.6 (q, MeO-6), 56.3 (q, MeO-10); (+)-ESIMS  $m/z$  498.4 [M + Na]<sup>+</sup>; (+)-HRES-TOFMS  $m/z$  498.2713 [M + Na]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>23</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>9</sub>Na, 498.2674).

[155] A estereoquímica relativa do composto **2** foi indicada como



com base em uma análise de constantes de acoplamento. A rotação óptica do composto **2** ( $[\alpha]_{D20} + 64.5$ ,  $c=0.16$ ;  $\text{CHCl}_3$ ) mostrou o mesmo sinal que a pederina ( $[\alpha]_{D20} + 86.8$ ,  $c = 1.00$ ;  $\text{CHCl}_3$ ). Sendo assim, propomos provisoriamente que a configuração absoluta do composto **2** seja igual à pederina e outros compostos análogos relatados (Wan, S. et. al. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 16668 - 16679).

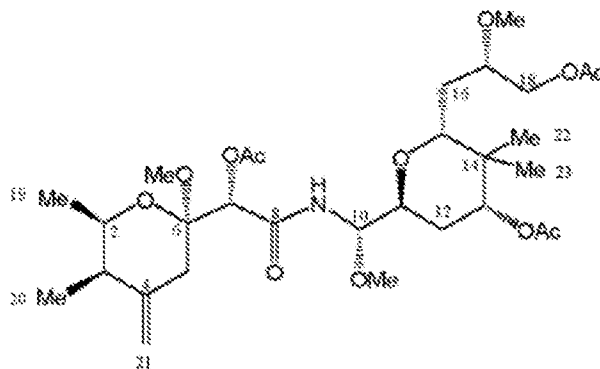
#### **Exemplo 7.** Síntese do composto **3**

[156] Para uma solução de **1** (2.5 mg, 5.1  $\mu\text{mol}$ ) em DCM seco (2 mL) sob uma atmosfera de nitrogênio, foi adicionado piridina (10  $\mu\text{L}$ , 124  $\mu\text{mol}$ ), DMAP (quantidade catalítica) e  $\text{Ac}_2\text{O}$  (2.9  $\mu\text{L}$ , 31 mmol). A reação foi permitida permanecer em temperatura ambiente ao longo da noite. A mistura foi concentrada sob vácuo e purificada por meio de cromatografia de coluna flash em sílica gel (*n*-hexano / EtOAc 1:1) para fornecer **3** (3 mg, 95 %) como um sólido branco.

[157] **3**:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.96 (1H, dq,  $J=6.6$ , 2.6 Hz, H-2), 2.24 (1H, dq,  $J=7.0$ , 2.6 Hz, H-3), 2.62 (1H, dt,  $J=14.5$ , 2.2 Hz, H-5a), 2.37 (1H, d,  $J=14.5$  Hz, H-5b), 5.25 (1H, s, H-7), 6.62 (1H, d,  $J=9.6$  Hz, NH), 5.27 (1H, dd,  $J=9.6$ , 4.1Hz, H-10), 3.91 (1H, dt,  $J=6.3$ , 4.6, Hz, H-11), 2.02 (1H, m, H-12a), 1.66 (1H, m, H-12b), 4.91 (1H, dd,  $J=4.7$ , 4.1Hz, H-13), 3.55 (1H, m, H-15), 2.02 (1H, m, H-16a), 1.67 (1H, m, H-16b), 3.60 (1H, dd,  $J=11.3$ , 2.2 Hz, H-

17), 4.32 (1H, dd,  $J=12.1, 2.6$  Hz, H-18a), 4.12 (1H, m, H-18b), 1.15 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-19), 0.97 (3H, d,  $J=7.0$  Hz, H-20), 4.86 (1H, t,  $J=2.0$  Hz, H-2a), 4.76 (1H, t,  $J=2.0$  Hz, H-21b), 0.97 (3H, s, C22), 0.89 (3H, s, C-23), 3.21 (3H, s, MeO-6), 3.39 (3H, s, MeO-10), 3.38 (3H, s, MeO-17), 2.20 (3H, s, OCOMe-7), 2.08 (3H, s, OCOMe-13), 2.10 (3H, s, OCOMe-18) ;  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  69.6 (d, C-2), 41.3 (d, C-3), 145.5 (s, C-4), 33.8 (t, C-5), 99.1 (s, C-6), 72.1 (d, C-7), 167.4 (s, C-8), 81.8 (d, C-10), 70.0 (d, C-11), 26.7 (t, C-12), 74.2 (d, C-13), 36.7 (s, C-14), 76.5 (d, C-15), 29.3 (t, C-16), 76.4 (d, C-17), 64.0 (t, C-18), 17.9 (q, C-19), 12.0 (q, C-20), 110.4 (t, C-21), 24.7 (s, C-22), 17.2 (s, C-23), 48.4 (q, MeO-6), 56.3 (q, MeO-10), 57.0 (q, MeO-17), 20.7 (q, OCOMe-7), 169.8 (s, OCOMe-7), 21.2 (q, OCOMe-13), 170.3 (s, OCOMe-13), 20.9 (q, OCOMe-18), 170.0 (s, OCOMe-18), ; (+)-ESIMS  $m/z$  638.3  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

[158] A estereoquímica relativa do composto **3** foi estabelecida como



por analogia com seu precursor, o composto **1**.

**Exemplo 8.** Bioensaios *in vitro* para a detecção de atividade antitumoral

[159] O objetivo deste ensaio é avaliar a atividade citostática *in vitro* (capacidade de retardar ou interromper o crescimento de células tumorais) ou atividade

citotóxica (capacidade de matar células tumorais) das amostras sendo testadas.

#### **LINHAGENS CELULARES**

<b>Nome</b>	<b>N° do ATCC</b>	<b>Espécie</b>	<b>Tecido</b>	<b>Características</b>
A549	CCL-185	Humano	Pulmão	Carcinoma de pulmão (NSCLC)
HT29	HTB-38	Humano	Cólon	Adenocarcinoma colorretal
MDA-MB-231	HTB-26	Humano	Mama	Adenocarcinoma de mama
PSN1	CRM-CRL-3211	Humano	Pâncreas	Adenocarcinoma de pâncreas

#### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA USANDO O ENSAIO COLORIMÉTRICO SBR**

[160] Um ensaio colorimétrico, usando a reação sulforhodamina B (SRB), foi adaptado para fornecer uma medida quantitativa do crescimento e viabilidade celular (segundo a técnica descrita por Skehan et al. J. Natl. Cancer Inst. 1990, 82, 1107 - 1112).

[161] Esta forma de ensaio emprega microplacas de cultura de células de 96 poços, seguindo os padrões do Instituto de Padrões Nacionais Americano (em inglês, *American National Standards Institute*) e da Sociedade para Automação e Avaliação Laboratorial (em inglês, *Society for Laboratory Automation and Screening*) (ANSI SLAS 1-2004 (R2012) de 10/12/2011). Todas as linhagens celulares utilizadas neste estudo foram obtidas a partir da Coleção de Culturas Tipo Americana (em inglês, *American Type Culture Collection* - ATCC) e derivam de diferentes tipos de câncer humano.

[162] As células foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com soro fetal bovino a 10 % (FBS), L-glutamina 2mM, penicilina 100 U / mL e estreptomicina 100 U / mL a 37 °C, CO<sub>2</sub> a 5 % e umidade de 98 %. Para os experimentos, as células foram colhidas de culturas subconfluentes usando tripsinização e ressuspensas em meio fresco antes da contagem e plaqueamento.

[163] As células foram semeadas em placas de microtitulação de 96 poços, a 5000 células por poço, em alíquotas de 150 µL e permitidas ligar-se na superfície da placa por 18 horas (ao longo da noite) em meio isento de fármacos. Depois disso, uma placa controle (não tratada) de cada linhagem celular foi fixada (tal como descrito abaixo) e usada como valor de referência no tempo zero. As placas de cultura foram, então, tratadas com os compostos teste (alíquotas de 50 µL de soluções de estoque 4X em meio de cultura completo mais 4 % de DMSO) usando dez diluições seriadas 2/5 (concentrações que variam de 10 a 0,003 µg / mL) e culturas em triplicata (1 % de concentração final em DMSO). Após 72 horas de tratamento, o efeito antitumoral foi medido pelo uso da metodologia SRB: Resumidamente, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas por 15 min em solução de glutaraldeído a 1 % em temperatura ambiente, lavadas duas vezes em PBS e coradas em solução SRB a 0,4 % por 30 min em temperatura ambiente. As células foram lavadas várias vezes com solução de ácido acético a 1 % e secas ao ar em temperatura ambiente. O SRB foi, então, extraído em solução base de trizma 10 mM e a absorbância medida em um leitor de placas espectrofotométrico automatizado a 490 nm. Os efeitos sobre o crescimento e

sobrevivência celular foram estimados pela aplicação do algoritmo NCI (Boyd MR e Paull KD. Drug Dev. Res. 1995, 34, 91 - 104).

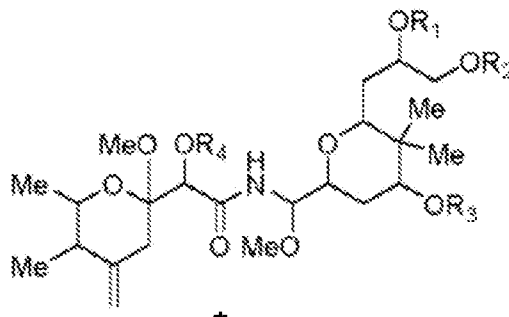
[164] Os valores obtidos em culturas em triplicata foram ajustados a uma curva logística de quatro parâmetros por análise de regressão não linear. Três parâmetros de referência foram calculados (de acordo com o algoritmo NCI) por interpolação automática das curvas obtidas a partir desse ajuste: GI50 = concentração do composto que produz 50 % de inibição do crescimento celular, em comparação com as culturas controle; TGI = inibição total do crescimento celular (efeito citostático), quando comparado com as culturas controle e LC50 = concentração do composto que produz 50 % de efeito citotóxico de morte celular líquido).

[165] A **Tabela 2** ilustra os dados acerca da atividade biológica dos compostos da presente invenção.

		<b>Atividade biológica (M)</b>			
Composto		Linhagem celular			
		A549	HT29	MDA-MB-231	PSN-1
<b>1</b>	GI50	2.04E-09	2.86E-09	2.66E-09	2.66E-09
	TGI	7.97E-09	8.99E-09	5.31E-09	5.72E-09
	LC50	3.68E-08	>2.04E-07	1.08E-08	1.94E-08
<b>2</b>	GI50	7.15E-09	8.83E-09	8.20E-09	8.62E-09
	TGI	2.52E-08	4.42E-08	1.56E-08	1.91E-08
	LC50	1.22E-07	>2.10E-06	3.15E-08	7.78E-08
<b>3</b>	GI50	1.15E-07	1.62E-07	3.09E-07	1.62E-07
	TGI	8.77E-07	9.26E-07	2.44E-06	6.66E-07
	LC50	8.61E-06	>1.62E-05	>1.62E-05	3.90E-06

**REIVINDICAÇÕES**

1. Composto de fórmula geral **I** ou um sal, tautômero ou estereoisômero farmacologicamente aceitável do mesmo



**CARACTERIZADO** pelo fato de:

R1, R2 e R3 serem, cada, independentemente selecionados dentre hidrogênio, alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, -C(=O)Ra, -C(=O)ORb e -(C=O)NRcRd;

R4 ser selecionado dentre hidrogênio, -C(=O)Ra, -C(=O)ORb e -C(=O)NRcRd;

Ra ser selecionado dentre hidrogênio, alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, aril e heterociclil;

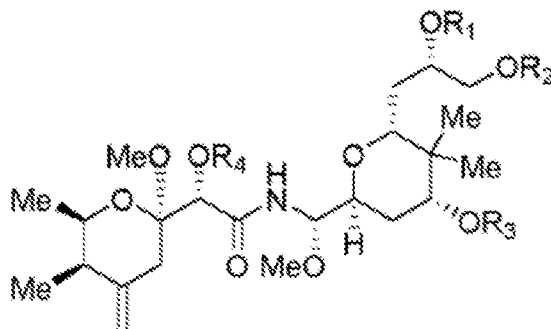
Rb ser selecionado dentre alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, aril e heterociclil;

Rc e Rd serem, independentemente, selecionados dentre hidrogênio, alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, aril e heterociclil;

com a condição de que R1 e R2 não são,

simultaneamente, metil.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, também apresentando a fórmula geral **III** ou um sal, tautômero ou estereoisômero farmacologicamente aceitável do mesmo



**III**

**CARACTERIZADO** pelo fato de R1, R2, R3 e R4 serem tal como definidos pela fórmula **I** na reivindicação 1.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de R1 ser selecionado dentre hidrogênio e alquil C1-C6 substituído ou não substituído.

4. Composto, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de R1 ser selecionado dentre hidrogênio e metil.

5. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **CARACTERIZADO** pelo fato de R2 ser selecionado dentre hidrogênio e -C(=O)Ra, em que Ra é selecionado dentre alquil C1-C6 substituído ou não substituído.

6. Composto, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de R2 ser selecionado dentre hidrogênio e acetil.

7. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **CARACTERIZADO** pelo fato de R3 e R4 serem, independentemente, selecionados dentre hidrogênio



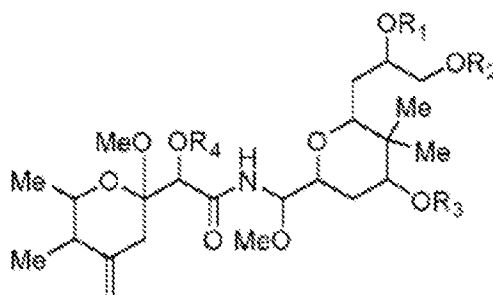
reivindicações 1 a 10, ou um sal, tautômero ou estereoisômero farmacologicamente aceitável do mesmo, ou uma composição, tal como definida na reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser para uso como um medicamento.

13. Composto ou composição, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser para uso como um medicamento para o tratamento de câncer.

14. Uso de um composto, tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, ou sais, tautômeros ou estereoisômeros farmacologicamente aceitáveis do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser no preparo de um medicamento para o tratamento de câncer.

15. Método de tratamento de um paciente, notavelmente um humano, afetado por câncer, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender a administração ao indivíduo afetado em necessidade do mesmo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto, tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, ou um sal, tautômero ou estereoisômero farmacologicamente aceitável do mesmo.

16. Processo para a obtenção de um composto de fórmula **II** ou um sal, tautômero ou estereoisômero farmacologicamente aceitável do mesmo

**II**

em que

- R1, R2 e R3 são, cada, independentemente selecionados dentre hidrogênio, alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, -C(=O)Ra, -C(=O)ORb e -(C=O)NRcRd;

- R4 é selecionado dentre hidrogênio, -C(=O)Ra, -C(=O)ORb e -C(=O)NRcRd;

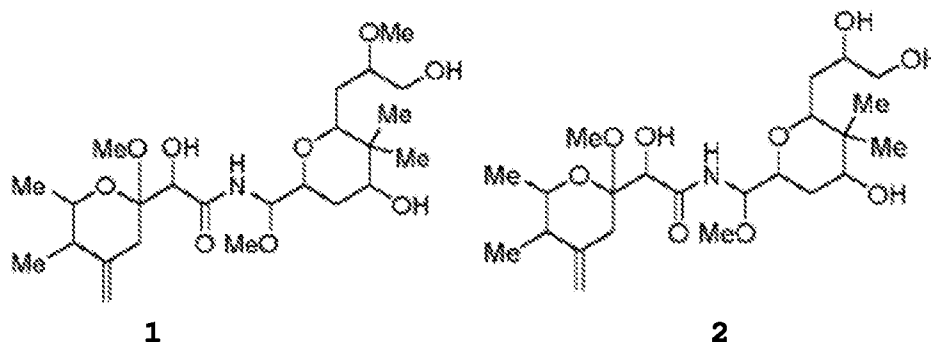
- Ra é selecionado dentre hidrogênio, alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, aril e heterociclil;

- Rb é selecionado dentre alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, aril e heterociclil;

- Rc e Rd são, independentemente, selecionados dentre hidrogênio, alquil C1-C12 substituído ou não substituído, alquenil C2-C12 substituído ou não substituído, alquinil C2-C12 substituído ou não substituído, aril e heterociclil;

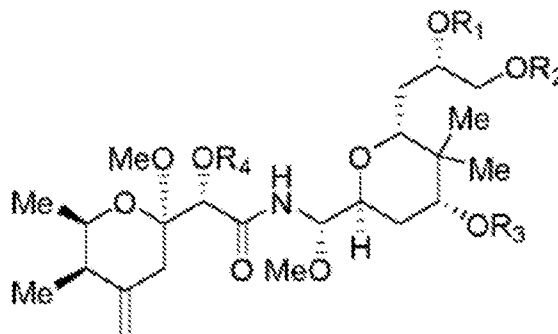
o processo **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender as etapas de:

- cultura da cepa bacteriana marinha do tipo selvagem PHM005 ou seus mutantes sob condições adequadas para produzir compostos **1** e / ou **2** de fórmula:



- isolamento dos compostos **1** ou **2**; e, se necessário,
- derivatização dos compostos **1** ou **2**.

17. Processo, de acordo com a reivindicação 16, em que o composto de fórmula **II** também apresenta a fórmula **IV**



**IV**

ou um sal, tautômero ou estereoisômero farmacologicamente aceitável do mesmo;

**CARACTERIZADO** pelo fato de R1, R2, R3 e R4 serem tal como definido pela fórmula **II** na reivindicação 16.

18. Cepa biologicamente pura PHM005, **CARACTERIZADA** pelo fato de estar depositada sob o número de acesso CECT-9225 na Coleção Espanhola de Cultivos Tipo na Universidade de Valência, Espanha.

19. Ácido nucleico isolado **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender o aglomerado de gene biossintético Lab ou sendo complementar a uma sequência compreendendo o aglomerado de gene biossintético Lab o qual é derivado de *Labrenzia* sp. e, em particular, da cepa PHM005.

20. Sequência de nucleotídeos isolada, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender:

uma sequência de nucleotídeos tal como mostrada na SEQ ID NO: 2; ou

uma sequência de nucleotídeos a qual é o complemento da SEQ ID NO: 2; ou

uma sequência de nucleotídeos que hibridiza sob condições altamente rigorosas para a SEQ ID NO: 2 ou para um complemento da mesma; ou

uma sequência de nucleotídeos apresentando pelo menos 80 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2 ou com o complemento da mesma.

21. Ácido nucleico isolado **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender fragmentos de ácido nucleico que formam unidades individuais e / ou módulos do aglomerado de gene biossintético Lab, tal como mostrado na Figura 3.

22. Sistema enzimático modular **CARACTERIZADO** pelo fato de ser codificado por uma sequência de ácido nucleico, tal como definida em qualquer uma das reivindicações 19 a 21.

23. Sistema enzimático modular, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender uma ou mais de uma sequência de proteína selecionada do grupo formado pelas sequências SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 23 ou uma sequência de proteína apresentando pelo menos 80 % de identidade de sequência com estas sequências.

24. Sistema enzimático modular, de acordo com a reivindicação 22 ou 23, **CARACTERIZADO** pelo fato de apresentar atividade funcional na síntese de compostos tipo pederina ou tipo onnamide e / ou uma porção policetídica e / ou uma porção de peptídeo não ribossomal.

25. Vetor **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender um ácido nucleico consistindo essencialmente do aglomerado de gene biossintético Lab derivado de *Labrenzia* sp. e, em particular, da cepa PHM005.

26. Vetor **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender uma

seqüência de ácido nucleico conforme definida em qualquer uma das reivindicações 19 a 21.

27. Célula hospedeira recombinante ou organismo transgênico **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender um ácido nucleico conforme definido em qualquer uma das reivindicações 19 a 21 ou contendo um vetor conforme definido na reivindicação 25 ou 26.

28. Célula hospedeira recombinante, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser uma célula bacteriana e, em particular, ser uma célula de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces* ou *E. coli*.

29. Método para a produção de compostos tipo pederina ou tipo onnamide **CARACTERIZADO** pelo fato de usar um mutante de PHM005 ou uma célula hospedeira recombinante, conforme definida na reivindicação 27, ou um organismo transgênico, conforme definido na reivindicação 28, compreendendo as etapas de:

cultura do mutante de PHM005 ou a célula hospedeira recombinante ou o organismo transgênico sob condições para expressar o aglomerado de gene biossintético Lab; e

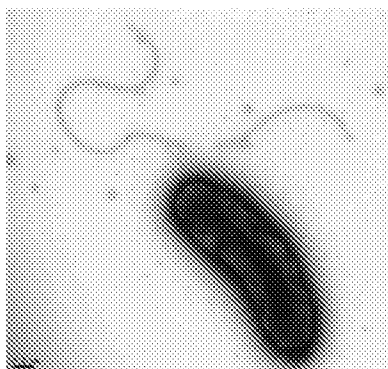
isolamento dos compostos tipo pederina ou tipo onnamide produzidos.

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, **CARACTERIZADO** pelo fato de o produto de *lab719* ser expresso para fornecer um composto tipo onnamide.

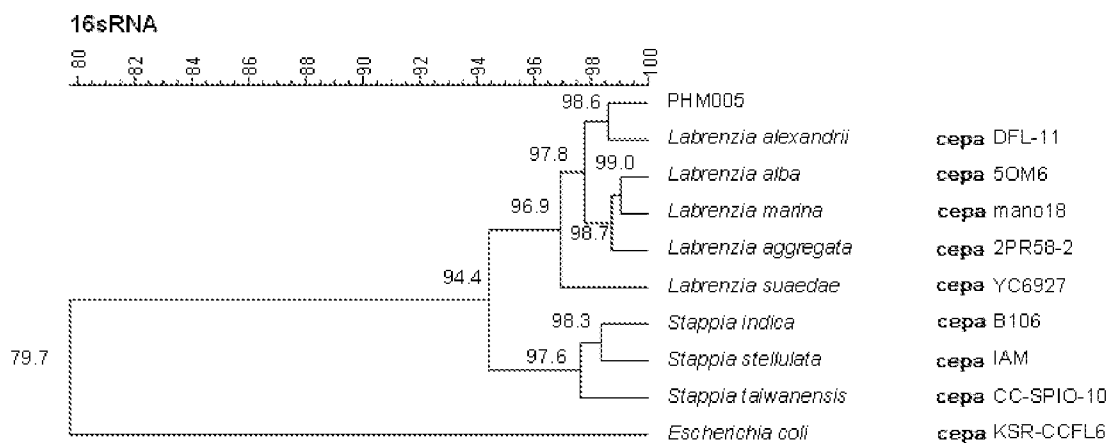
31. Uso de um ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 21, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser no preparo de um aglomerado de gene biossintético Lab modificado.

32. Uso de um ácido nucleico, de acordo com qualquer

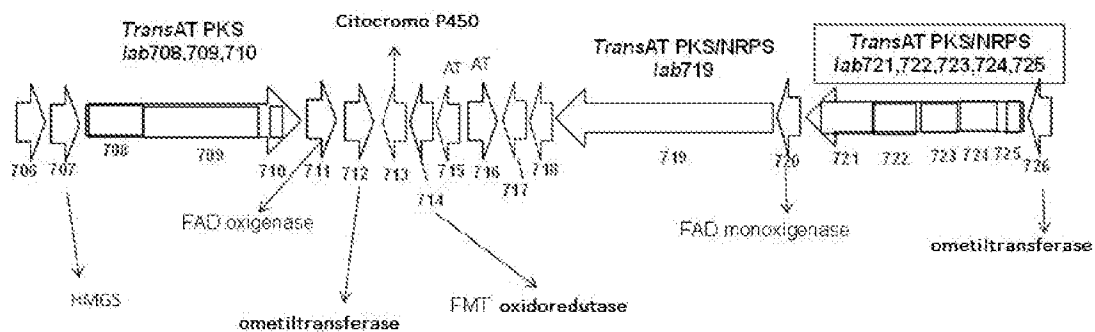
uma das reivindicações 19 a 21, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser no preparo de um composto tipo pederina.



**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**

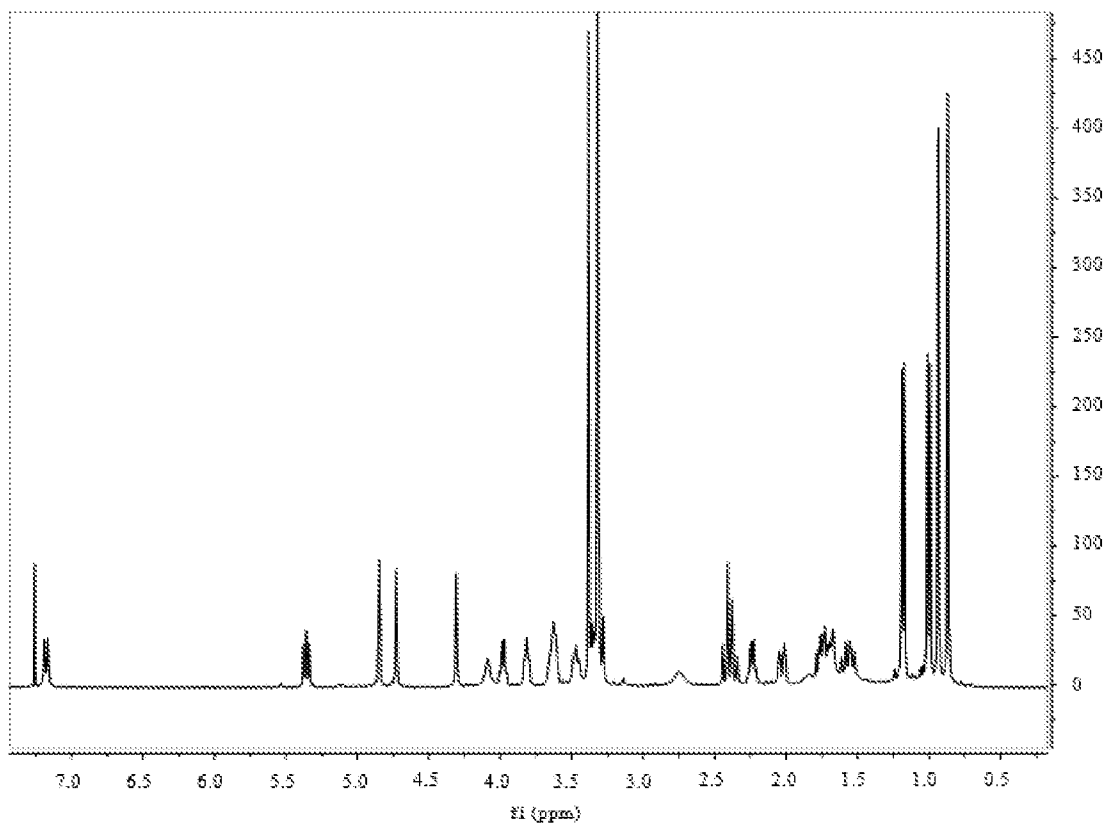


FIGURA 4

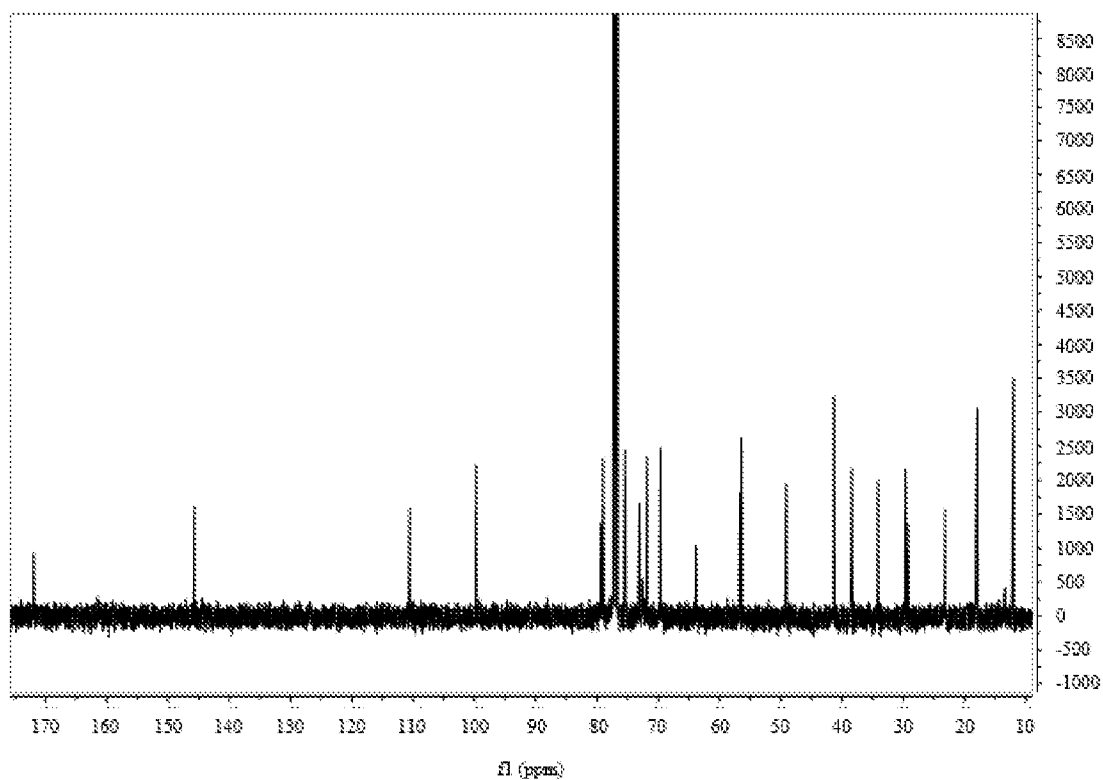


FIGURA 5

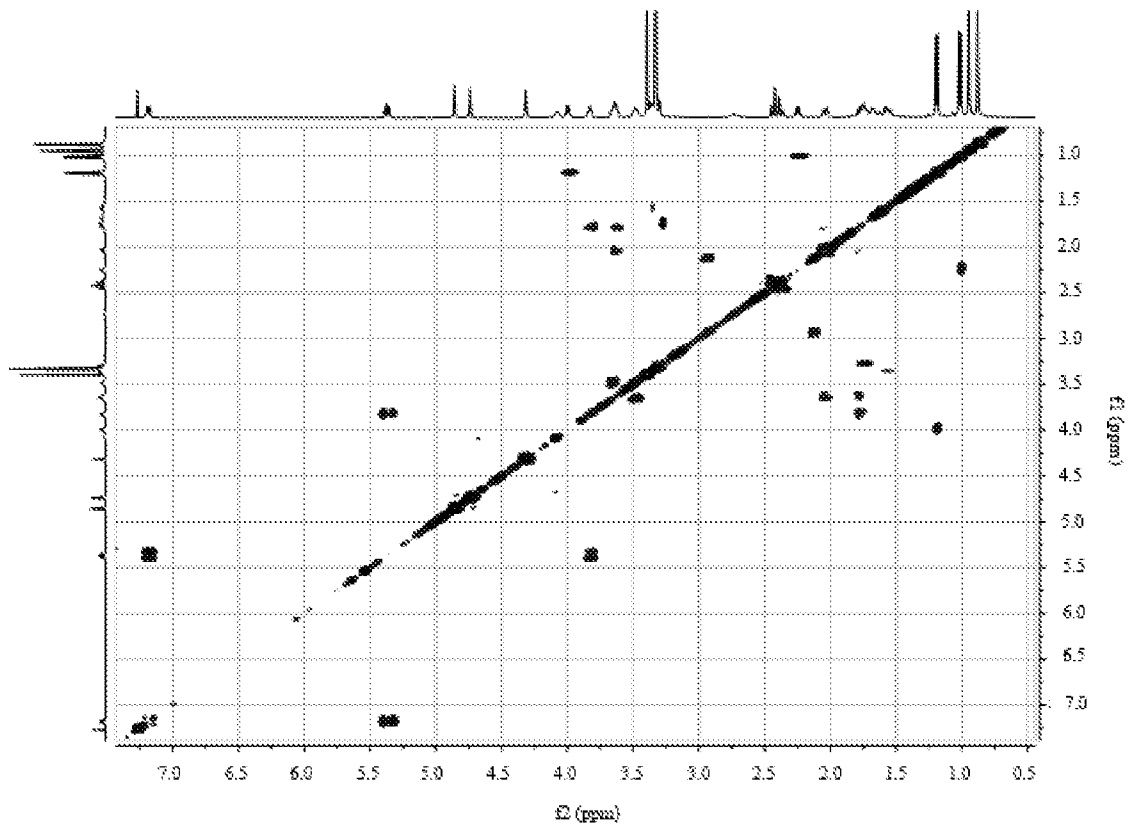


FIGURA 6

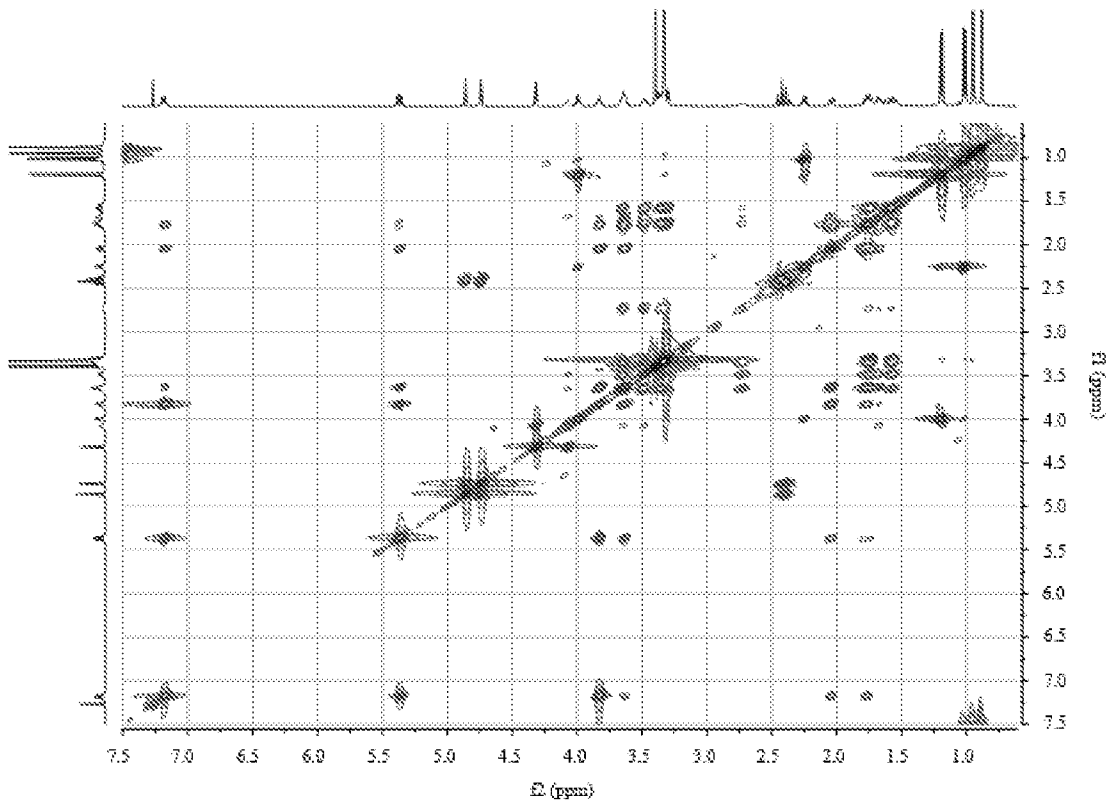


FIGURA 7

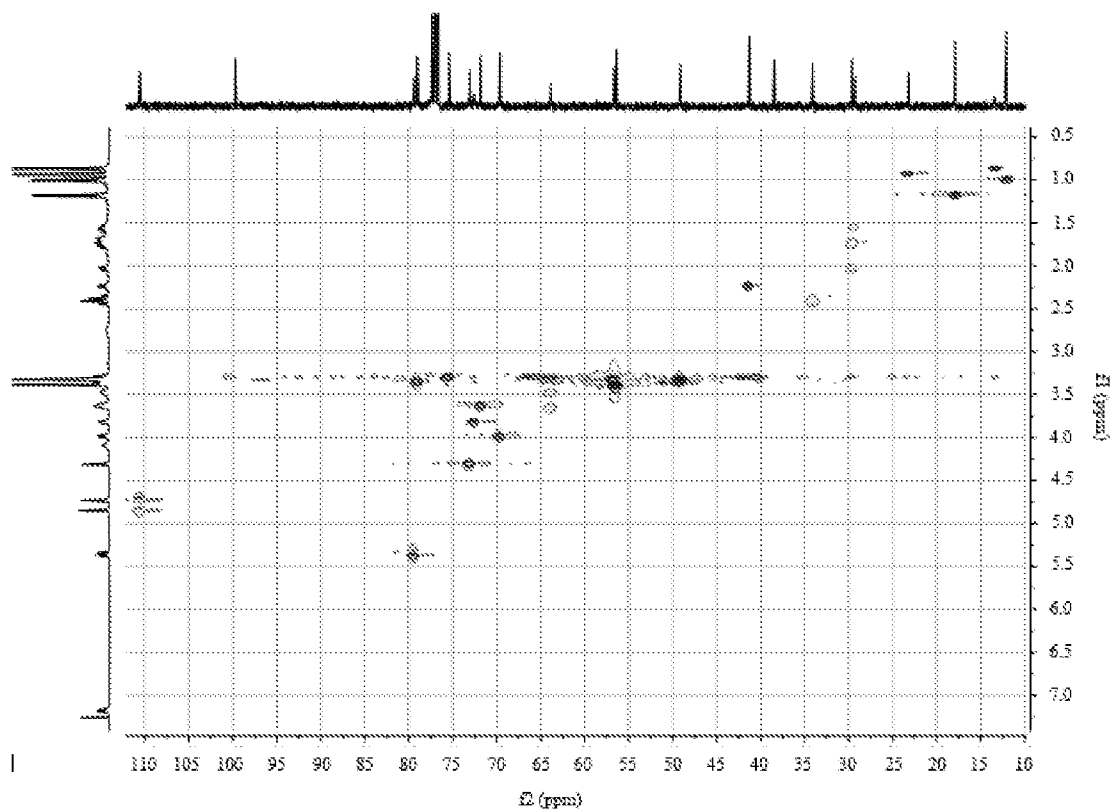


FIGURA 8

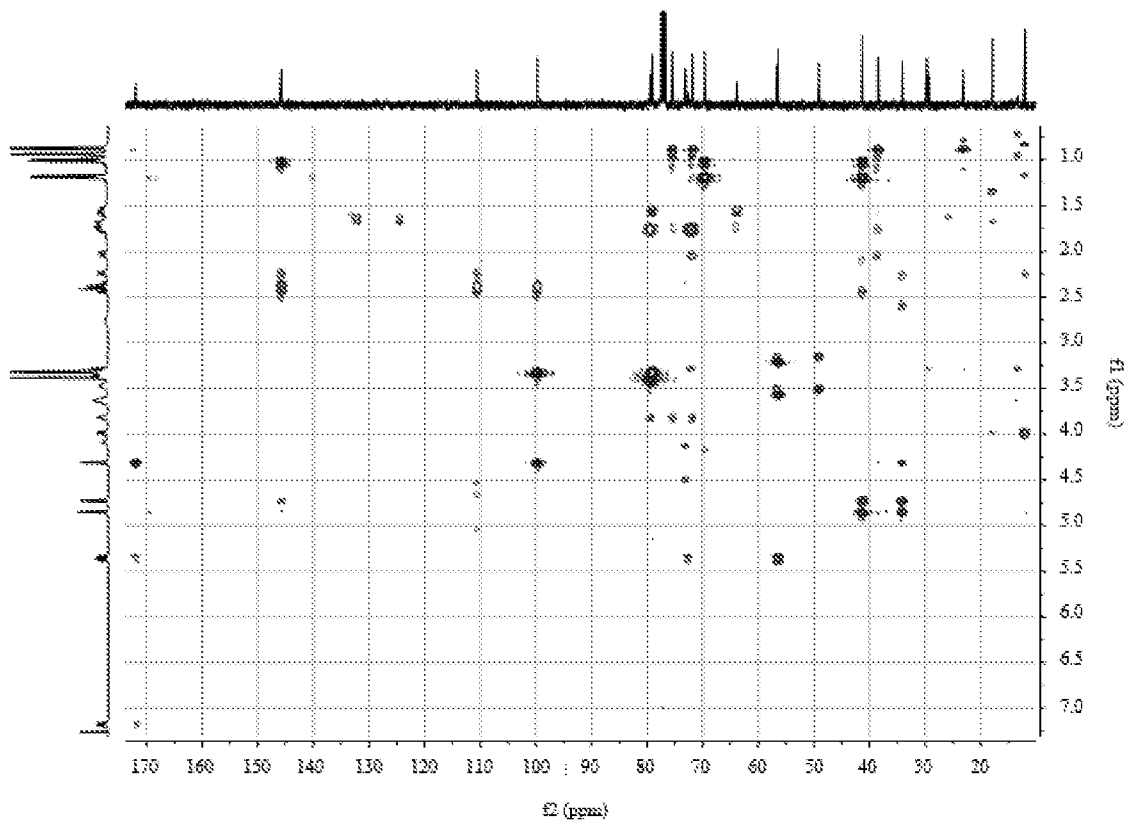
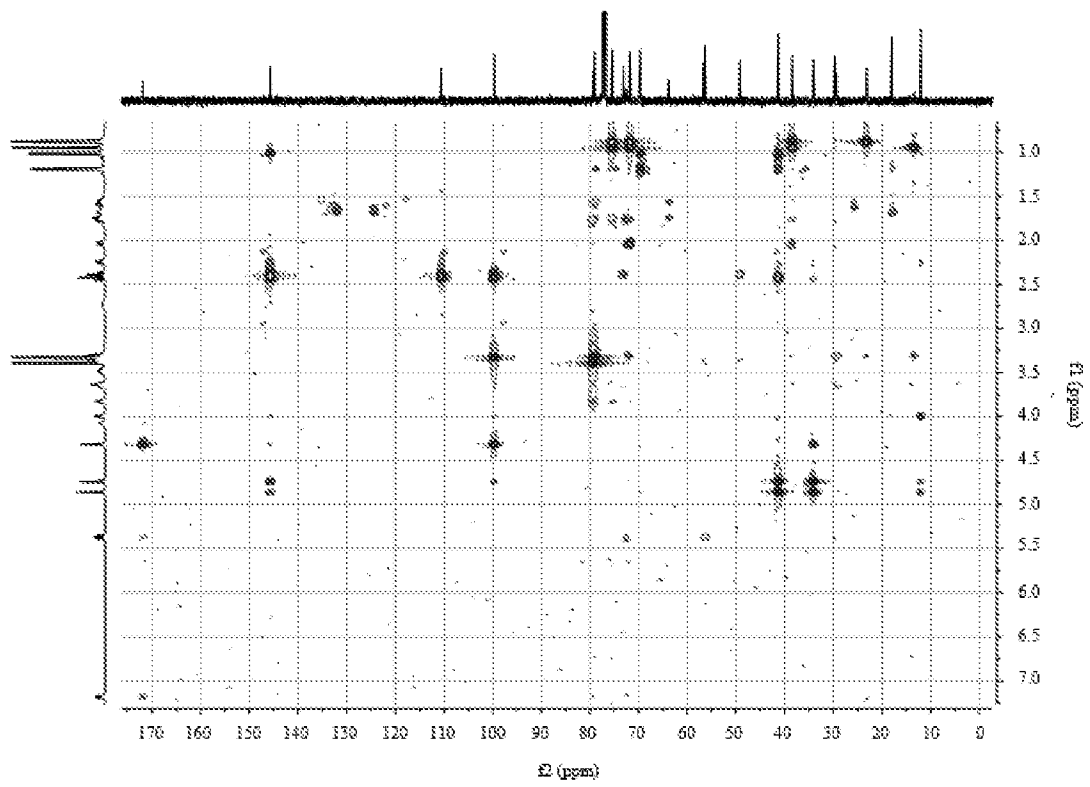
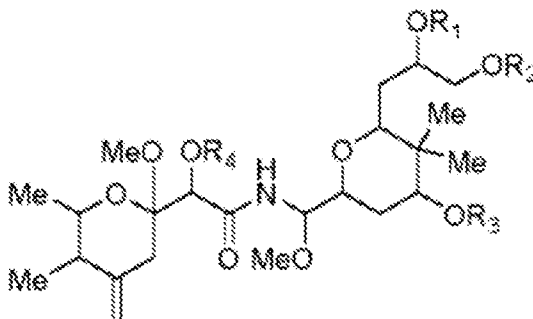


FIGURA 9

**FIGURA 10**

**RESUMO****COMPOSTOS ANTICÂNCER**

Compostos anticâncer de fórmula geral **I**



**I**

em que R1 a R4 assumem diversos significados, para uso no tratamento de câncer. Uma nova cepa *Labrenzia* sp. denominada PHM005 com Número do Depósito de Acesso CECT-9225, um método para a produção dos compostos da invenção e análogos dos mesmos pelo uso da cepa PHM005 e o aglomerado de genes Lab que codificam a biossíntese de compostos tipo pederina e tipo onnamide são também fornecidos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequências - 843.51.txt
- Data de Geração do Código: 17/09/2019
- Hora de Geração do Código: 12:33:14
- Código de Controle:
  - Campo 1: 86587E073185B35A
  - Campo 2: 0B85466DC8E52EA5