



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1107312-8 A2

(22) Data do Depósito: 25/11/2011

(43) Data da Publicação: 20/09/2016



(54) Título: ACIL-HIDRAZONAS COMO PROTÓTIPO DE NOVOS FÁRMACOS PARA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA)

(51) Int. Cl.: C07D 271/06; C07C 251/86; A61P 35/02

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

(72) Inventor(es): RICARDO JOSÉ NUNES, ALESSANDRA MASCARELLO, TAISA REGINA STUMPF, PAULO CÉSAR LEAL, JOSÉ ANDRES YUNES, CAROLINA PEREIRA DE SOUZA MELO, RAFAEL RENATINO CANEVAROLO, LOUISE DOMENEGHINI CHIARADIA, ÂNGELO BRUNELI ALBERTONI LARANJEIRA, ROSENDO A. YUNES

(57) Resumo: ACIL-HIDRAZONAS COMO PROTÓTIPO DE NOVOS FÁRMACOS PARA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA) A presente invenção refere-se a uma classe de acil-hidrazonas, especialmente as derivadas da 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazida, bem como a seus análogos oxadiazóis e outros compostos semelhantes, e aplicação farmacêutica de todos estes compostos no tratamento de diferentes doenças associadas à proliferação celular, como leucemias, incluindo leucemia linfóide aguda (LLA), tumores e inflamação. Esta invenção também descreve os processos utilizados para a determinação da atividade biológica de todos estes compostos. Foram obtidas acil-hidrazonas com atividade semelhante ao composto utilizado como padrão nos experimentos (colchicina). A maior seletividade dos compostos apresentados nesta invenção é uma característica importante relacionada com menores efeitos colaterais que os fármacos atualmente empregados na clínica. As acil-hidrazonas sintetizadas, mais especificamente os compostos 02 e 07, apresentaram importante atividade antileucêmica, o que indica 02 e 07 como candidatos a protótipos de fármacos, ou fármacos, para o tratamento de leucemias, especialm(...)

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

ACIL-HIDRAZONAS COMO PROTÓTIPO DE NOVOS FÁRMACOS PARA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA)

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se a um conjunto de acil-hidrazonas derivadas da 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazida, para o tratamento de doenças associadas à proliferação celular (como leucemias, tumores, inflamação e outras doenças proliferativas), dentre as quais, duas estruturas são consideradas possíveis protótipos de fármacos ou fármacos (compostos **02** e

10 **07**). Mais especificamente, a invenção se refere a compostos que tem atividade inibitória de proteínas quinase dependente de ciclina (CDKs) e da topoisomerase I, que podem ser consequentemente úteis no tratamento de leucemia linfóide aguda (LLA). A invenção refere-se ainda à obtenção de acil-hidrazonas e oxadiazóis inéditos, a partir da 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazida.

Antecedentes da Invenção

 O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação e propagação descontrolada pelo corpo de formas anormais das próprias células humanas. As células neoplásicas diferenciam-se das células normais pelo alto poder de invasão que possuem, pela perda de função, perda de diferenciação e pela

20 capacidade de metástase, por possuírem menor adesão entre si (Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. *Farmacologia*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, **2004**. 703 p). A estimativa do Instituto Nacional do Câncer é do surgimento de 49 mil novos casos de câncer de mama, 47 mil de próstata, 27 mil de pulmão, 25 mil de cólon e reto, 23 mil de estômago e 19 mil de colo do

25 útero em 2009 no Brasil (INCA, Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=mapa.asp&ID=8>> Acesso em: 23 fevereiro **2011**), sendo a segunda maior causa de mortes no país.

 As leucemias são um dos vários tipos de câncer, e ocorrem pela

30 proliferação neoplásica de células hematopoiéticas linfóides ou mielóides, resultante da mutação de uma única célula-tronco, cuja prole forma um clone

de células leucêmicas. Geralmente, ocorrem várias alterações genéticas para a transformação maligna, incluindo expressão inadequada de oncogenes e perda de função de genes supressores de tumor (Bain, B. J. *Diagnóstico em leucemias*. Rio de Janeiro: Elsevier, **2003**, Cap. 1, 01-56), que podem estar associadas a fatores genéticos ou de risco (como tabagismo, exposição à radiação ou a produtos químicos como o benzeno) (INCA, Instituto Nacional do Câncer. *Leucemia – prevenção, genética, outros fatores de risco*. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/prevencao_genetica_outros_fatores_de_risco>. Acesso em: 23 fevereiro **2011**; e IARC (International Agency for Research on Cancer). *World Cancer Report 2008*. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/index.php>> e <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr_2008.pdf>. Acesso em: 23 fevereiro **2011**). As leucemias são subdivididas com base em quão rapidamente a doença evolui e torna-se grave, podendo ser crônicas ou agudas. As leucemias agudas caracterizam-se por um defeito na maturação celular, o que ocasiona um desequilíbrio entre a proliferação e a maturação; uma vez que as células do clone leucêmico continuam a proliferar-se, sem chegar aos estágios de maturação e morte, ocorre uma expansão contínua do clone leucêmico e predomínio das células imaturas (INCA 2009b, Bain, B. J. *Diagnóstico em leucemias*. Rio de Janeiro: Elsevier, **2003**, Cap. 1, 01-56).

A leucemia linfóide aguda (LLA) é decorrente da proliferação descontrolada de células progenitoras linfóides imaturas na medula óssea, que resulta em um acúmulo muito rápido de células neoplásicas (Plasschaert, S.; Van Der Kolk, D.; De Bont, E.; Vellenga, E.; Kamps, W.; De Vries, E. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) in Acute Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, **2004**, 45, 649-654). É responsável por 80% dos casos de leucemia aguda na infância (Laks, D.; Longhi, F.; Bernardes, W. M.; Ramos, G. P. C. *J Pediatr*, **2003**, 79, 149-158) e 50% de todas as malignidades hematopoiéticas (Downing, James R.; Shannon, Kevin M. Acute leukemia: A pediatric perspective. *Cancer Cell*, **2002**, 2, 437-445). Em adultos a LLA é relativamente

rara, contabilizando 2-3% das malignidades hematopoiéticas (Downing, James R.; Shannon, Kevin M. Acute leukemia: A pediatric perspective. *Cancer Cell*, **2002**, 2, 437-445); porém, o prognóstico é muito pior que para as crianças, pois acomete células-tronco multipotentes, originando uma leucemia muito mais agressiva (Greaves, M. F. Stem cell origins of leukaemia and curability. *British Journal of Cancer*, **1993**, 67, 413-423).

As pesquisas do uso de compostos de fontes naturais como quimioterápicos é ampla. Um exemplo disso é o antineoplásico paclitaxel (TaxolTM), um dos mais importantes produtos naturais antitumorais já descobertos, reportado pela primeira vez em 1971 (Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, **1971**, 93, 2325-2327), que somente depois de um longo período foi aprovado pelo FDA para o uso clínico (em 1992). Outro exemplo é a vincristina, um alcalóide utilizado na terapia de leucemia aguda e outros tipos de tumores, que atua da mesma forma que o paclitaxel, através da ligação à tubulina, interferindo na formação (polimerização) ou reorganização (despolimerização) dos microtúbulos (Goodman e Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 10ª Ed., editora Mc Graw Hill. **2006**).

Os quimioterápicos mais usados na terapia atual das leucemias incluem daunorrubicina, doxorrubicina, dexametasona, vincristina, metotrexato e mercaptopurina (Plasschaert, S.; Van Der Kolk, D.; De Bont, E.; Vellenga, E.; Kamps, W.; De Vries, E. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) in Acute Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, **2004**, 45, 649-654). Estes fármacos conferem benefício terapêutico, mas também significativa toxicidade ao organismo e às células normais, devido a sua atuação na indução da apoptose e inibição da proliferação celular (Herr, I.; Debatin, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* **2001**, 98, 2603-2614; e Leszczyniecka, M.; Roberts, T.; Dent, P.; Grant, S.; Fisher, P. B. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacology*

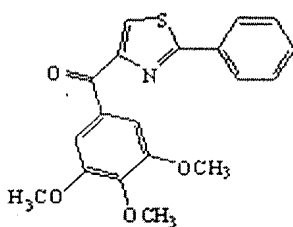
& *Therapeutics*, **2001**, 90, 105-156). Os agentes antineoplásicos interferem também nos tecidos normais que possuem células de divisão rápida, podendo provocar muitos efeitos indesejáveis, como a redução da produção das células de defesa do organismo, a cicatrização deficiente de feridas, alopecia, lesão do epitélio gastrointestinal, esterilidade e teratogenicidade (Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. *Farmacologia*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, **2004**. 703 p).

Apesar dos recentes avanços na pesquisa contra o câncer, em 2008 foram registradas 5.686 mortes decorrentes de leucemia no Brasil, e para 2010 foram estimados 9.580 novos casos desta doença (INCA, Instituto Nacional do Câncer. Disponível em:

<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=mapa.asp&ID=8>>

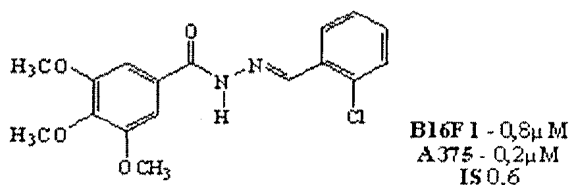
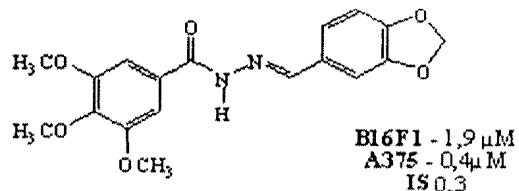
Acesso em: 23 fevereiro **2011**), o que motiva incessantemente a busca por novos fármacos para o tratamento de leucemias e outros tumores.

Em um recente estudo, Wang e colaboradores (Wang, Z.; Lu, Y.; Seibel, W.; Miller, D. D.; Li, W. Identifying Novel Molecular Structures for Advanced Melanoma by Ligand-Based Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2009**, 49, 1420-1427) avaliaram novos compostos antitumorais baseados na estrutura do composto LY-1-100, que tem comprovado mecanismo de ação e afinidade aos microtúbulos (sítio de ligação da colchicina), porém baixa seletividade.



LY-1-100
B16F1 - 55nM
A375 - 28nM
IS 0,9

Estruturas foram selecionadas através de *screening* virtual baseado no ligante (*ligand-based*), resultando em 14 novas moléculas com grande similaridade estrutural ao composto de partida (LY-1-100). Os resultados teóricos obtidos pelos pesquisadores revelaram que o anel trimetoxilado do composto LY-1-100 precisa ser mantido para proporcionar a atividade antitumoral, mas o anel triazol parece não ser importante, podendo ser substituído pela estrutura da *N*-metileno-hidrazina, o que gera a estrutura das acil-hidrazonas. Apesar dos resultados em células murinas B16F1 e A375 (*in vitro*) destes compostos não terem apresentado melhoria da potência e da seletividade do composto de partida, estes resultados foram muito promissores e identificaram alguns componentes estruturais importantes para a atividade anti-melanoma (Wang, Z.; Lu, Y.; Seibel, W.; Miller, D. D.; Li, W. Identifying Novel Molecular Structures for Advanced Melanoma by Ligand-Based Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2009**, 49, 1420-1427).



Neste sentido, as acil-hidrazonas surgem como uma classe interessante de compostos com atividade antitumoral. Assim, a presente invenção se refere à obtenção de acil-hidrazonas, especialmente derivadas da 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazida, para o tratamento de doenças associadas à proliferação celular (como leucemias, tumores, inflamação e outras doenças proliferativas).

A patente PI0112674-1/2001 (Inibidores n-[5-[[[5-alkyl-2-oxazolil]metil]tio]-2-tiazolil]carboxamida de quinases dependentes de ciclina) descreve compostos e seus enantiomorfos, diastereoisômeros, solvatos e sais farmaceuticamente aceitáveis, como inibidores de proteína quinase, úteis no
5 tratamento de doenças proliferativas, como por exemplo, câncer, inflamação e artrite. Os compostos sintetizados também podem ser de utilidade para o tratamento da doença de Alzheimer, alopecia induzida por quimioterapia e doença cardiovascular. Os compostos descritos na PI0112674-1 representam estruturas mais complexas que as apresentadas no decorrer da presente
10 invenção.

Os compostos referenciados na patente US20040138272/2004 (1,4-Substituted cyclohexane derivatives) podem ser úteis na prevenção da proliferação celular em doenças malignas, por inibir Rho quinases, úteis na
reparação do sistema nervoso central e periférico por indução do crescimento e
15 regeneração dos axônios. O mecanismo de ação dos compostos da US20040138272/2004 difere do proposto para as estruturas da presente invenção.

Inibidores de quinases dependentes de ciclina (cdks) úteis na modulação da progressão do ciclo celular são propostos na patente PI0418095-0/2004
20 (Inibidores de quinases dependentes de ciclina, composições e usos relacionados aos mesmos). Tais compostos seriam úteis para o tratamento de pacientes que apresentam distúrbios associados à proliferação celular excessiva. Os compostos descritos na PI0418095-0 são acil-hidrazonas diferentes das propostas no decorrer da presente invenção, com processo de
25 síntese mais complexo.

Na patente PI0508364-8/2005 (Derivados de 4-benzimidazol-2-il-piridazin-3-ona) são descritos compostos e seus sais fisiologicamente tolerados, que apresentam ação como inibidores de quinases, em particular da quinase CDK2 (quinase 2 dependente de ciclina). Os compostos da PI0508364-8 são
30 diferentes dos propostos no decorrer da presente invenção, com síntese mais complexa.

O documento US20070066610/2007 (Acylhydrazones as kinase modulators) descreve acil-hidrazonas como inibidores de tirosinas quinases, incluindo c-Met, um receptor tirosina quinase que regula a proliferação celular, morfogênese e motilidade. As acil-hidrazonas da US20070066610 são diferentes das propostas no decorrer deste invento, com síntese mais complexa. Além disso, o alvo de ação dos compostos da US20070066610 diferencia-se do proposto nesta invenção.

A patente US20080194562/2008 (Pyrazole Derivatives for The Inhibition Of Cdk's And Gsk's) refere-se à síntese de pirazóis, compostos que inibem ou modulam a atividade de quinases dependentes de ciclina (CDK) e quinases glicogênio sintase (GSK), e ao seu uso no tratamento ou profilaxia de doença ou condição mediada por quinases. Também são descritas composições farmacêuticas contendo os compostos e intermediários químicos. Os compostos da US20080194562 são diferentes dos propostos no decorrer do presente invento.

As acilidrazonas ainda são descritas na literatura por suas pronunciadas atividades inseticidas e estimulantes de crescimento de plantas (Robinson, B. Fischer indole synthesis. *Chem. Rev.*, **1963**, 4, 373-401); no tratamento da tuberculose (Vigorita, M. G.; Ottana, R.; Zappala, C.; Maccari, R.; Pizzimenti, F. C.; Gabbrielli, G. Halogenated isoniazid derivatives as possible antimycobacterial and anti-HIV agents - III. *Farmaco*, **1994**, 49, 775-781); e como agentes bacteriológicos e bacteriostáticos (Samus, N. M.; Tsapkov, V. I.; Kuracheva, S. A.; Burdenko, T. A. Synthesis and antimicrobial activity of coordination compounds of 3d-elements with some hydrazones derived by using 5-nitro-2-furaldehyde. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, **1994**, 28, 41-44).

Desta forma, na presente invenção, realizamos um estudo com acil-hidrazonas e seus derivados oxadiazóis obtidos pela estratégia de bioisosterismo não clássico, de fechamento de anel. Os oxadiazóis são uma importante classe de compostos heterocíclicos com uma ampla gama de atividades biológicas, tais como antiviral, antimicrobiana, antineoplásica,

fungicida, inibição de tirosinase e catepsina K (Kumar, D.; Sundaree, S.; Johnson, E. O.; Shah, K. An efficient synthesis and biological study of novel indolyl-1,3,4- oxadiazoles as potent anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, *19*, 4492-4494). Além disso, são ótimos bioisómeros de amidas e ésteres, que podem contribuir substancialmente no aumento da atividade farmacológica, participando em ligações de hidrogênio como receptores (Guimaraes, C. R. W.; Boger, D. L.; Jorgensen, W. L. Elucidation of Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibition by Potent α -Ketoheterocycle Derivatives from Monte Carlo Simulations. *Journal of the American Chemical Society*, **2005**, *127*, 17377-17384).

Assim, as acil-hidrazonas específicas e seus análogos, provenientes dos processos descritos detalhadamente neste invento a seguir, bem como seu uso no tratamento de leucemias, tumores e outras doenças proliferativas, como inflamação, é de grande interesse social e econômico.

Objetivos da Invenção

O objetivo da presente invenção são os compostos sintéticos derivados da 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazida (hidrazonas e oxadiazóis) e todos os seus compostos análogos e semelhantes, por meio de síntese simples, bem como, o emprego destes compostos para o tratamento de doenças associadas à proliferação celular (como leucemias, especialmente leucemia linfóide aguda – LLA - tumores, inflamação e outras doenças proliferativas). Esta invenção também descreve os processos utilizados para a determinação da atividade biológica destes compostos.

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a uma classe de acil-hidrazonas, especialmente as derivadas da 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazida, bem como a seus compostos análogos oxadiazóis e outros compostos análogos e semelhantes, e a aplicação farmacêutica de todos estes no tratamento de diferentes doenças associadas à proliferação celular, como leucemias, incluindo leucemia linfóide aguda (LLA), tumores e inflamação. Esta invenção também descreve os

processos utilizados para a determinação da atividade biológica de todos estes compostos.

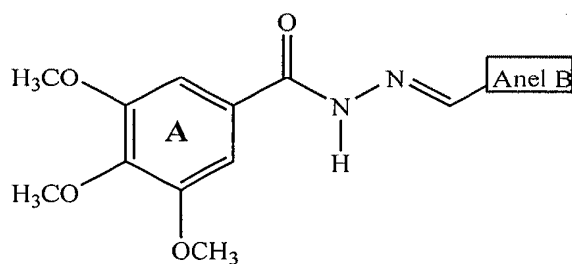
Foram obtidas acil-hidrazonas com atividade semelhante ao composto utilizado como padrão nos experimentos (colchicina). A maior seletividade dos compostos apresentados nesta invenção é uma característica importante relacionada com menores efeitos colaterais que os fármacos atualmente empregados na clínica. As acil-hidrazonas sintetizadas, mais especificamente os compostos **02** e **07**, apresentaram importante atividade antileucêmica, o que indica **02** e **07** como candidatos a protótipos de fármacos, ou fármacos, para o tratamento de leucemias, especialmente leucemia linfóide aguda (LLA), tumores e outras doenças proliferativas, como inflamação.

A determinação do mecanismo de ação dos compostos mais ativos foi realizada pela utilização de microarranjos de DNA e testes subsequentes indicados através do *chip*, além dos estudos de seletividade em linfócitos humanos saudáveis.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção inclui a obtenção e mecanismo de ação de acil-hidrazonas sintéticas e seus compostos análogos e semelhantes, que podem ser úteis no tratamento de leucemias, especialmente leucemia linfóide aguda (LLA), tumores e outras doenças proliferativas, como inflamação.

De acordo com um dos aspectos da presente invenção, é descrito um composto de estrutura (I):



em que o anel B representa:

01 - fenil

02 - 4-Br-fenil

03 - 4-NO₂-fenil04 - 3-OCH₃-4-OH-5-Br-fenil05 - 3-OCH₃-4-OH-5-I-fenil06 - 3-OCH₃-4-OH-fenil

07 - 1-naftil

08 - 2-naftil

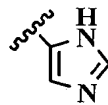
09 - 4-Cl-fenil

10 - 3,4-OCH₂O-fenil

11 - 2-Cl-fenil

12 - 2,5-diOCH₃-fenil13 - 3,4,5-triOCH₃-fenil14 - 2,4,5-triOCH₃-fenil15 - 4-O(CH₂)₃CH₃-fenil16 - 4-CH₃-fenil

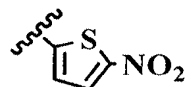
17 -

18 - 3-NO₂-fenil19 - 4-N(CH₃)₂-fenil

20 - 3-Cl-fenil

21 - 2,6-diOCH₃-fenil

22 -



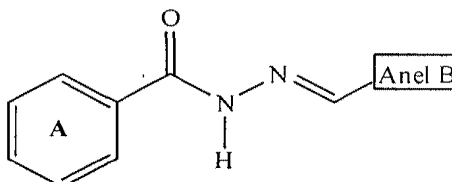
23 - 2-COOH-fenil

24 - 3-OCH₂CH₃-4-OH-fenil25 - 3-OCH₃-fenil

26 - 2-OH-4-Br-fenil

27 - (3-OCH₃-4-OCH₂fenil)-fenil28 - 4-CF₃-fenil29 - 3-CF₃-4-Cl-fenil

Um grupo complementar de compostos, de acordo com a presente invenção, inclui compostos com a estrutura (II):



em que o anel B representa:

5 30 - fenil

31 - 3,4-OCH₂O-fenil

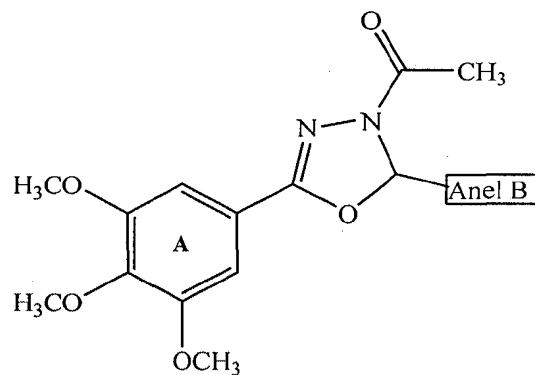
32 - 4-Br-fenil

33 - 4-CH₃-fenil

34 - 1-naftil

10 35 - 2-naftil

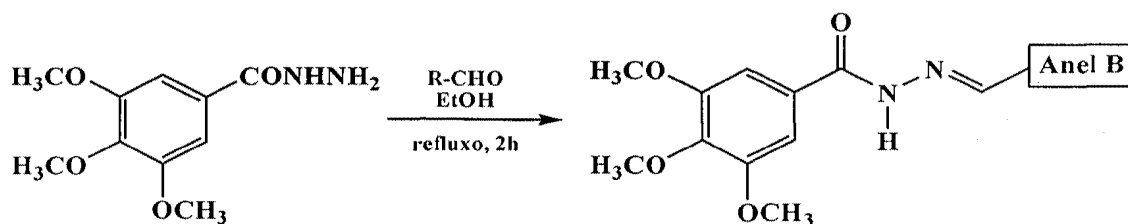
Adicionalmente, são também descritos os análogos sintéticos oxadiazóis, de acordo com a estrutura (III):



em que o anel B representa:

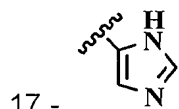
- 5 36 - 3-OCH₃-4-OH-5-Br-fenil
 37 - 3-OCH₃-4-OH-fenil
 38 - 1-naftil

10 As acil-hidrazonas inéditas da presente invenção foram obtidas a partir da reação de condensação entre a 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazida e diferentes aldeídos, usando etanol como solvente, em refluxo, conforme a reação:



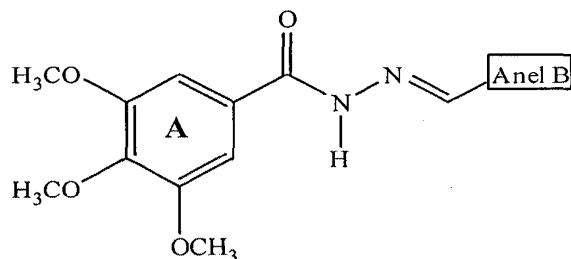
em que o anel B representa:

- | | |
|---|------------------------------------|
| 02 - 4-Br-fenil* | 21 - 2,6-diOCH ₃ -fenil |
| 05 - 3-OCH ₃ -4-OH-5-I-fenil | 26 - 2-OH-4-Br-fenil |
| 07 - 1-naftil* | 29 - 3-CF ₃ -4-Cl-fenil |



A Tabela 1 apresenta os rendimentos obtidos nas sínteses e os pontos de fusão experimental das 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazonas inéditas.

Tabela 1. Rendimentos e pontos de fusão das 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazonas inéditas sintetizadas.



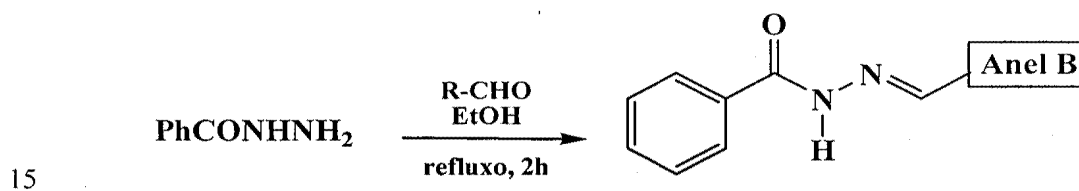
Composto	Anel B	Rendimento (%)	Ponto de Fusão (°C) Experimental
02*	4-Br-fenil	82	208-209
05	3-OCH ₃ -4-OH-5-I-fenil	69	247-248
07*	1-naftil	82	229-230
17		75	230-231
21	2,6-diOCH ₃ -fenil	93	245-246
26	2-OH-4-Br-fenil	65	206-208
29	3-CF ₃ -4-Cl-fenil	83	203-204

5 ***Os compostos 02 e 07 não são inéditos, mas também são protegidos nesta invenção devido à sua pronunciada atividade antileucêmica, que será descrita no decorrer do presente invento.**

A estrutura do composto **02** foi previamente publicada como intermediário de reação para obtenção de oxadiazóis (Mazzone, G.; Bonina, F.;
 10 Formica, F. Some aroylhydrazones of halobenzaldehydes and halo-substituted 2,5-diaryl-1,3,4-oxadiazoles. *Farmaco, Edizione Scientifica*, **1978**, 33(12), 963-71) e o composto **07** foi previamente avaliado como inibidor da MAO (monoamino oxidase) (Mazzone, G.; Arrigo Reina, R. 3,4,5-Trimethoxybenzoyl hydrazides and their anti-MAO [monoamine oxidase] activity. *Bollettino delle*
 15 *Sedute della Accademia Gioenia di Scienze Naturali in Catania*, **1971**, 10(8),

689-702). A caracterização química de ambos compostos (**02** e **07**) também foi previamente publicada por nosso grupo de pesquisas, em um trabalho que avaliou a atividade destes e de outros compostos como inibidores da cruzaina de *Trypanosoma cruzi*, entretanto, os compostos **02** e **07** não apresentaram
 5 atividade inibitória desta proteína (Borchhardt, Deise M.; Mascarello, Alessandra; Chiaradia, Louise Domeneghini; Nunes, Ricardo J.; Oliva, Glaucius; Yunes, Rosendo A.; Andricopulo, Adriano D. Biochemical evaluation of a series of synthetic chalcone and hydrazide derivatives as novel inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*,
 10 **2010**, 21(1), 142-150).

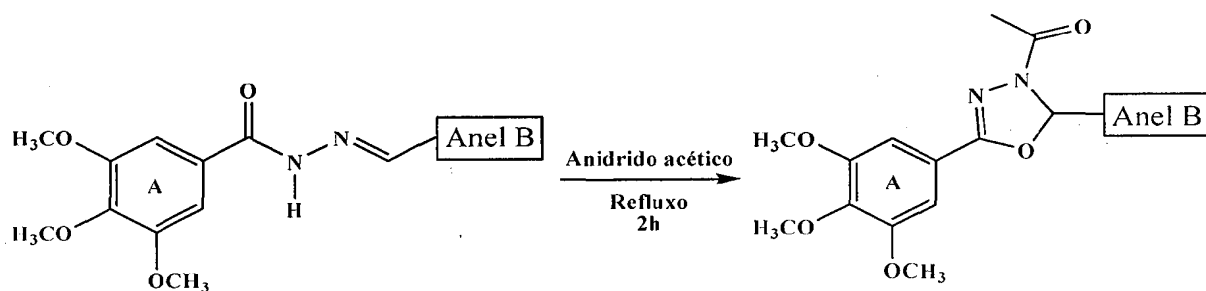
As acil-hidrazonas complementares (preparadas para auxiliar na discussão dos testes biológicos) foram sintetizadas a partir da reação entre a fenil-hidrazida e diferentes aldeídos, pelo mesmo procedimento de preparação das hidrazonas descritas anteriormente, de acordo com a reação:



em que o anel B representa:

- 30 - fenil
 31 - 3,4-OCH₂O-fenil
 32 - 4-Br-fenil
 20 33 - 4-CH₃-fenil
 34 - 1-naftil
 35 - 2-naftil

Foram ainda preparados os análogos oxadiazóis sintéticos inéditos das 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazonas, a partir da reação destas com anidrido acético,
 25 conforme a reação:



em que o anel B representa:

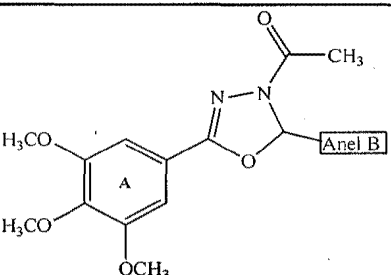
36 - 3-OCH₃-4-OH-5-Br-fenil

37 - 3-OCH₃-4-OH-fenil

5 38 - 1-naftil

A Tabela 2 apresenta os rendimentos obtidos nas sínteses e o ponto de fusão experimental dos oxadiazóis.

Tabela 2. Rendimentos e ponto de fusão dos oxadiazóis inéditos sintetizados.



Composto	Anel B	Rend. (%)	p.f. (°C) Exp.
36	3-OCH ₃ -4-OH-5-Br-fenil	30	177-179
37	3-OCH ₃ -4-OH-fenil	25	170-172
38	1-naftil	35	189-192

10 A presente invenção descreve também a determinação do mecanismo de ação das acil-hidrazonas sintetizadas, seus compostos análogos e semelhantes, incluindo os oxadiazóis. Inclui ainda o uso de todos estes compostos como protótipos de fármacos, ou fármacos, para o tratamento de leucemias, especialmente leucemia linfóide aguda (LLA), tumores e outras

15 doenças associadas à proliferação celular, como inflamação.

As acil-hidrazonas descritas na presente invenção atuam de maneira seletiva sobre células leucêmicas, com atividade na ordem de nanomolar, quando comparadas à sua atividade em linfócitos humanos saudáveis, conforme será descrito a seguir na forma de exemplo. Fica evidenciada aqui a relevância dos resultados biológicos, inéditos para os compostos testados.

A presente invenção será agora descrita por meio de exemplos ilustrativos.

Exemplo 1. Procedimento geral para a preparação das 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazonas 01-29

Para a síntese das 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazonas **01-29**, utilizou-se a metodologia descrita por Troeberg e col. (Troeberg, L.; Chen, X.; Flaherty, T. M.; Morty, R. E.; Cheng, M.; Hua, H.; Springer, C.; McKerrow, J. H.; Kenyon, G. L.; Lonsdale-Eccles, J. D.; Coetzer, T. H. T.; Cohen, F. E. Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured *Trypanosoma brucei brucei*. *Molecular Medicine*, **2000**, 6, 660-669). Em um balão de reação de 100 mL e 1 boca, colocou-se a 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazida (2 mmol), preparada conforme descrito no exemplo 2, em um solvente orgânico: acetona, acetato de etila, éter etílico, etanol, metanol (20mL) e o aldeído apropriado (2 mmol). A mistura foi refluxada por 1 a 10 horas. Depois, a solução foi filtrada e o sólido recristalizado em um solvente orgânico.

Exemplo 2. Procedimento geral para obtenção da 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazida, utilizada para obter as 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazonas 01-29

Para a síntese da 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazida, usada na preparação das acil-hidrazonas **01-29**, utilizou-se metodologia já descrita (Chida, A. S.; Vani, P. V. S. N.; Chandrasekharam, M.; Srinivasan, R.; Singh, A. K. Synthesis of 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone: a key fragment in coenzyme-Q series. *Synthetic communications*, 31, 657-660, **2001**), realizada em duas etapas:

Obtenção do éster. Em um balão de reação de 1000 mL e 1 boca, colocou-se o ácido gálico (50g, 0,294mol), sulfato de dimetila (178,1g, 1,413mol), carbonato de potássio anidro (175,5g, 1,293mol) e TBAI (iodeto de

tetra-n-butilamonio) (1g) em um solvente orgânico que pode ser etanol, éter etílico, acetato de etila, acetona, éter de petróleo (375mL) e foi refluxado por 1 a 12h. O sólido obtido foi filtrado e lavado com o mesmo solvente orgânico (3 x 50mL). O éster foi obtido em forma de sólido amorfo de cor creme, com rendimento de 78%; p.f.: 84 °C (lit. p.f.: 82-83 °C). RMN ¹H (CDCl₃): 1,60 (s, 3H, CH₃), 3,92 (s, 9H, OCH₃), 7,33 (s, 2H, Ar).

Obtenção da hidrazida: Em um balão de reação de 1000 mL e 1 boca, colocou-se o éster obtido na primeira etapa (48g, 0,212mol), uma solução de hidrazina hidratada 99% (N₂H₄.H₂O) (77,6g, 1,54mol) e um solvente orgânico que pode ser etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona, metanol (200mL). A mistura foi refluxada por 1 a 5h e mantida apenas sob agitação magnética *overnight* à temperatura entre 0 e 50°C. O sólido obtido foi filtrado e recristalizado em metanol, obtendo a 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazida na forma de cristais brancos, com rendimento de 85%; p.f.: 162-163 °C (lit. p.f.: 168 °C). RMN ¹H (CDCl₃): 3,80 (s, 3H, OCH₃), 3,90 (s, 6H, OCH₃), 7,18 (s, 2H, Ar), 9,55 (NH).

Exemplo 3. Procedimento geral para a preparação das fenil-hidrazonas 30-35

Para a síntese das fenil-hidrazonas **30-35**, utilizou-se a metodologia descrita por Troeberg e col. (Troeberg, L.; Chen, X.; Flaherty, T. M.; Morty, R. E.; Cheng, M.; Hua, H.; Springer, C.; McKerrow, J. H.; Kenyon, G. L.; Lonsdale-Eccles, J. D.; Coetzer, T. H. T.; Cohen, F. E. Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured *Trypanosoma brucei brucei*. *Molecular Medicine*, **2000**, 6, 660-669), da mesma forma como descrito para a obtenção das 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazonas.

Exemplo 4. Procedimento geral para a preparação dos oxadiazóis 36-38

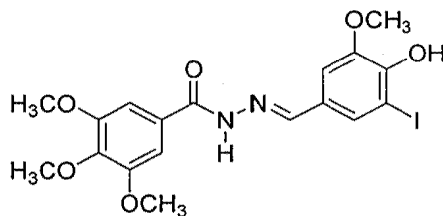
Para a síntese dos oxadiazóis **36-38**, utilizou-se a metodologia descrita por Jin e col. (Jin, L.; Chen, J.; Song, B.; Chen, Z.; Yang, S.; Li, Q.; Hu, D.; Xu, R. *Bioorg Med Chem*, **2006**, 16, 5036-5040). Em um balão de reação de 100 mL e 1 boca, misturou-se a 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazona correspondente (1 mmol) e anidrido acético (10mL). A mistura foi refluxada por 1 a 10 horas e

após foi resfriada com adição de gelo picado e deixada a temperatura entre 0 e 60°C *overnight* para precipitação do produto. O sólido obtido foi filtrado, lavado com água e recristalizado com solvente orgânico/água.

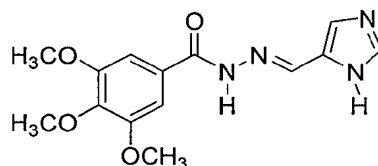
DADOS ESPECTRAIS DE INFRAVERMELHO (IV) E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE ^1H E DE ^{13}C DOS COMPOSTOS INÉDITOS

* δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente CDCl_3 .

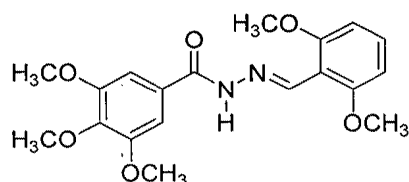
05 – ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 3.73 (s, 3H, *p*- OCH_3), 3.86 (s, 6H, *m*- OCH_3), 3.89 (s, 3H, *m*- OCH_3), 7.22 (s, 2H, H2, H6), 7.34 (s, 1H, H6'), 7.60 (s, 1H, H2'), 8.31 (s, 1H, HC=N), 10.08 (1H, OH), 11.66 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 56.78 (*m*- OCH_3), 60.81 (*p*- OCH_3), 85.17 (C3'), 105.84 (C2, C6), 109.72 (C6'), 128.28 (C1), 129.31 (C1'), 130.75 (C2'), 141.03 (C4), 147.35 (C=N), 147.97 (C5'), 149.00 (C4'), 153.36 (C3, C5), 163.16 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3382 (N-H), 1636, 1228 (C=O), 1565 (C=N), 1290, 1045 (C-O), 2999, 2839, 1585, 1490, 1334, 1137, 997 (Ar) (KBr).



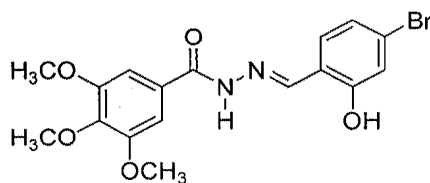
17 – ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 3.74 (s, 3H, *p*- OCH_3), 3.88 (s, 6H, *m*- OCH_3), 7.23 (s, 2H, H2, H6), 7.53 (s, 1H, H2'), 7.66 (m, 1H, H4'), 8.02 (s, 1H, NH5'), 8.43 (s, 1H, HC=N), 11.37 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 56.76 (*m*- OCH_3), 60.81 (*p*- OCH_3), 105.71 (C2, C6), 129.51 (C1), 131.94 (C1'), 132.16 (C2'), 135.37 (C4'), 145.45 (C=N), 153.35 (C3, C5), 162.29 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3212 (N-H), 1623, 1234 (C=O), 1580 (C=N), 1280, 1054 (C-O), 2994, 2941, 2838, 1503, 1456, 1411, 1344, 1125, 1006, 844 (Ar) (KBr).



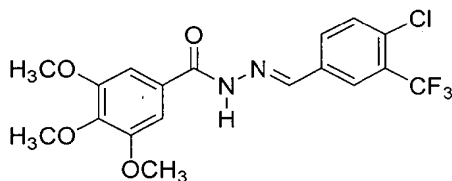
21 – ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 3.71 (s, 3H, *p*- OCH_3), 3.79 (s, 6H, *o*- OCH_3), 3.85 (s, 6H, *m*- OCH_3), 6.72 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H3', H5'), 7.23 (s, 2H, H2, H6), 7.34 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H4'), 8.60 (s, 1H, HC=N), 11.52 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 56.72 (*m*- OCH_3), 56.78 (*o*- OCH_3), 60.76 (*p*- OCH_3), 105.08 (C3', C5'), 105.76 (C2, C6), 111.75 (C1'), 129.37 (C1), 131.87 (C4'), 140.88 (C4), 143.92 (C=N), 153.31 (C3, C5), 159.38 (C2', C6'), 162.81 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3186 (N-H), 1644, 1240 (C=O), 1586 (C=N), 1258, 1068 (C-O), 3002, 2928, 2838, 1502, 1473, 1417, 1378, 1342, 1121, 1007, 783 (Ar) (KBr).



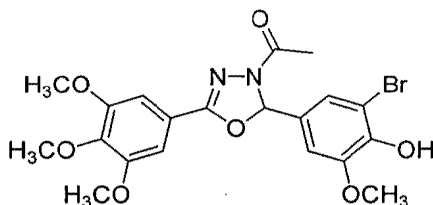
26 – ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 3.42 (s, 3H, *p*- OCH_3), 3.85 (s, 6H, *m*- OCH_3), 6.89 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H5'), 7.25 (s, 2H, H2, H6), 7.42 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H6'), 7.78 (s, 1H, H3'), 8.61 (s, 1H, HC=N), 11.26 (s, 1H, NH), 12.01 (1H, OH). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3220 (N-H), 1653, 1228 (C=O), 1588 (C=N), 1275, 1099 (C-O), 3004, 2941, 2834, 1550, 1503, 1479, 1463, 1416, 1352, 1335, 1189, 1011, 992, 951, 839, 760 (Ar) (KBr).



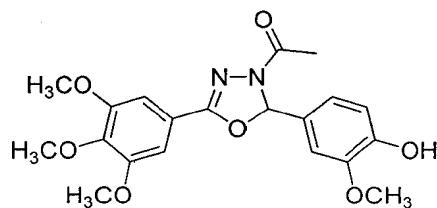
29 – ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 3.72 (s, 3H, *p*- OCH_3), 3.85 (s, 6H, *m*- OCH_3), 7.22 (s, 2H, H2, H6), 7.82 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H5'), 8.02 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H6'), 8.15 (s, 1H, H2'), 8.51 (s, 1H, HC=N), 11.96 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 56.65 (*m*- OCH_3), 60.73 (*p*- OCH_3), 105.96 (C2, C6), 126.29 (C2'), 127.98 (C1'), 128.88 (C1), 132.31 (CF₃), 132.91 (C4'), 133.01 (C5'), 134.82 (C6'), 141.27 (C4), 145.61 (C=N), 153.40 (C3, C5), 163.50 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3182 (N-H), 1655, 1242 (C=O), 1587 (C=N), 1269, 1039 (C-O), 3008, 2938, 2838, 1506, 1480, 1417, 1336, 1316, 1173, 1121, 1006, 958, 666 (Ar) (KBr).



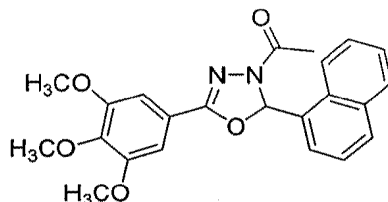
36 – ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.36 (s, 3H, CH_3), 3.85 (s, 3H, $p\text{-OCH}_3$), 3.91 (s, 3H, $m\text{-OCH}_3$), 3.92 (s, 6H, $m\text{-OCH}_3$), 6.00 (s, 1H, OH), 6.99 (s, 1H, H_2'), 7.06 (s, 1H, H_6'), 7.11 (s, 2H, H_2 , H_6), 7.26 (s, 1H, HC-N). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 21.75 (CH₃), 56.56 ($m\text{-OCH}_3$), 61.25 ($p\text{-OCH}_3$), 91.52 (C-N), 104.44 (C2, C6), 117.93 (C5'), 119.37 (C2'), 122.52 (C6'), 136.02 (C1', C1), 139.24 (C4'), 141.49 (C4), 152.90 (C3'), 153.64 (C3, C5), 155.84 (C=N), 168.32 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1766, 1238 (C=O), 1667, 1582 (C=N), 1254, 1047 (C-O), 1177 (C-N), 3445 (OH), 1130, 621 (C-Br), 3004, 2941, 2838, 1466, 1416, 1366, 1306, 1190, 998, 858 (Ar) (KBr).



37 – ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.35 (s, 3H, CH_3), 3.82 (s, 3H, $p\text{-OCH}_3$), 3.90 (s, 3H, $m\text{-OCH}_3$), 3.92 (s, 6H, $m\text{-OCH}_3$), 6.97 (s, 1H, H_2'), 7.06 (m, 1H, H_5'), 7.10 (s, 2H, H_2 , H_6), 7.25 (s, 1H, HC-N), 7.44 (m, 1H, H_6''); o sinal correspondente ao grupo OH não é observado. ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 21.54 (CH₃), 56.27 ($m\text{-OCH}_3$), 56.33 ($m\text{-OCH}_3$), 61.02 ($p\text{-OCH}_3$), 91.14 (C-N), 104.22 (C2, C6), 109.77 (C2'), 119.16 (C5'), 128.09 (C6'), 136.402 (C1', C1), 141.24 (C4'), 141.96 (C4), 151.78 (C3'), 153.42 (C3, C5), 155.60 (C=N), 168.10 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1767, 1243 (C=O), 1665, 1581 (C=N), 1250, 1043 (C-O), 1177 (C-N), 3445 (OH), 1129, 644 (C-Br), 2967, 2945, 2838, 1507, 1466, 1417, 1365, 1036, 1287, 1197, 1083, 997, 958, 861, 699 (Ar) (KBr).



38 – ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.47 (s, 3H, CH_3), 3.87 (s, 9H, OCH_3), 7.08 (s, 2H, H2, H6), 7.26 (s, 1H, HC-N), 7.26 (m, 1H, H2'), 7.48 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H3'), 7.55 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H7', H8'), 7.62 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H7'), 7.76 (m, 1H, H4'), 7.92 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6'), 8.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H9'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 21.57 (CH_3), 56.28 ($m\text{-OCH}_3$), 60.98 ($p\text{-OCH}_3$), 91.17 (C-N), 104.27 (C2, C6), 119.61 (C1), 123.04 (C2'), 125.07 (C9'), 125.20 (C3'), 126.05 (C7'), 126.95 (C8'), 128.95 (C4'), 130.51 (C6'), 130.61 (C10'), 130.79 (C5'), 134.04 (C1'), 141.11 (C4), 153.29 (C3, C5), 155.83 (C=N), 168.26 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1731, 1243 (C=O), 1669, 1587 (C=N), 1254, 1039 (C-O), 1124 (C-N), 2997, 2941, 2827, 1509, 1465, 1416, 1369, 1332, 1191, 1006, 980, 847, 784, 699 (Ar) (KBr).



Exemplo 5. Efeito dos compostos em linhagens celulares de leucemia linfóide aguda (LLA):

a) Diluição e armazenamento dos compostos: Todos os compostos foram ressuspensos em DMSO na concentração estoque de 20 mM e armazenados a -20°C . Para os testes de citotoxicidade, as diluições a partir das soluções estoque foram feitas em meio de cultura (RPMI-1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino, 100 UI/mL penicilina e 100 pg/mL estreptomicina), imediatamente antes de serem lançadas às células.

b) Ensaio *in vitro* da sensibilidade/resistência das células aos compostos pelo método do MTT: As linhagens celulares REH e Jurkat foram mantidas em meio RPMI-1640 com 10% de SFB (soro fetal bovino), 100 UI/mL penicilina,

100 pg/mL estreptomicina e incubadas a 37°C e 5% CO₂. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados de acordo com método descrito na literatura (Pieters, R.; *et al.* In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. *Blood*, **1990**, 76, 2327-2336; Pieters, R.; *et al.* Relation of cellular drug resistance to long-term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, **1991**, 338, 399-403 e Kaspers, G. J.; *et al.* In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **1997**, 90, 2723). As células foram ressuspensas na concentração de 3,75 10⁵ células/mL em meio de cultura, como descrito. Oitenta microlitros desta suspensão foram semeados em placas de 96 poços de fundo arredondado, contendo 20 microlitros de diferentes concentrações do composto ou apenas veículo. Cada tratamento foi feito em triplicata. Após 48 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂, foram adicionados 20 µL de solução MTT (5 mg/mL de PBS 1x), seguindo-se nova incubação por 4h e 30min a 37°C e 5% CO₂. Durante estas 4h e 30min, o MTT (de coloração amarelada) é metabolizado a sal de formazan (de coloração azulada) pelas células vivas. A seguir, foram acrescentados 100 µL de dodecil sulfato de sódio (DSS) 10% + 0,1M de HCl, para a dissolução dos cristais de formazan. Após nova incubação *overnight*, procedeu-se à leitura de absorbância a 570 nm. Os percentuais de células sobreviventes aos tratamentos foram calculados em relação ao número de células sobreviventes no meio sem adição dos compostos em questão ("controle negativo").

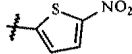
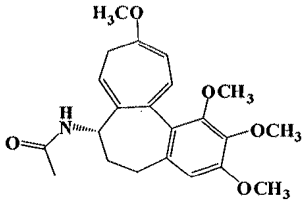
c) Determinação da IC₅₀: A IC₅₀ é definida como a concentração de um composto na qual é obtida 50% da inibição máxima. Após a leitura da absorbância, foram construídas curvas de sobrevivência e obtidos os valores de IC₅₀ com o auxílio do software GraphPad Prism.

RESULTADOS: AÇÃO DAS ACIL-HIDRAZONAS E OXADIAZÓIS SOBRE CÉLULAS LEUCÊMICAS DE LINHAGEM B E T (REH E JURKAT, RESPECTIVAMENTE)

Foi estudado o efeito citotóxico dos compostos sintetizados em células leucêmicas humanas Jurkat e REH, por meio de ensaio de viabilidade celular (MTT), de acordo com os métodos descritos por Pieters e colaboradores (Pieters, R.; *et al.* In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. *Blood*, **1990**, 76, 2327-2336; e Pieters, R.; *et al.* Relation of cellular drug resistance to long-term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, **1991**, 338, 399-403) e Kaspers e colaboradores (Kaspers, G. J.; *et al.* In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **1997** 90, 2723). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. *Screening* dos compostos **01-29** na concentração de 0,1µM em células leucêmicas humanas Jurkat e REH (com destaque para os compostos mais ativos).

Composto	Anel B	Porcentagem de sobrevivência de células leucêmicas (48h de tratamento)	
		B-derivada (REH)	T-derivada (Jurkat)
		0,1µM	0,1µM
01	Fenil	92%	88%
02	4-Br-fenil	45%	30%
03	4-NO ₂ -fenil	98%	96%
04	3-OCH ₃ -4-OH-5-Br-fenil	99%	102%
05	3-OCH ₃ -4-OH-5-I-fenil	103%	103%
06	3-OCH ₃ -4-OH-fenil	99%	101%
07	1-naftil	39%	30%

08	2-naftil	94%	104%
09	4-Cl-fenil	68%	33%
10	3,4-OCH ₂ O-fenil	43%	30%
11	2-Cl-fenil	68%	34%
12	2,5-diOCH ₃ -fenil	106%	122%
13	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	101%	121%
14	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	94%	83%
15	4-O(CH ₂) ₃ CH ₃ -fenil	88%	100%
16	4-CH ₃ -fenil	37%	17%
17		88%	115%
18	3-NO ₂ -fenil	97%	119%
19	4-N(CH ₃) ₂ -fenil	94%	121%
20	3-Cl-fenil	100%	86%
21	2,6-diOCH ₃ -fenil	102%	90%
22		97%	94%
23	2-COOH-fenil	96%	81%
24	3-OCH ₂ CH ₃ -4-OH-fenil	95%	86%
25	3-OCH ₃ -fenil	89%	78%
26	2-OH-4-Br-fenil	90%	79%
27	(3-OCH ₃ -4-OCH ₂ Bz)-fenil	91%	91%
28	4-CF ₃ -fenil	94%	63%
29	3-CF ₃ -4-Cl-fenil	98%	98%
Colchicina		41%	18%

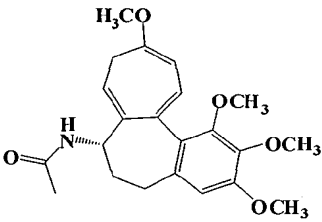
Para analisarmos a influência das metoxilas no anel A das acil-hidrazonas **01-29**, foi testada a série de acil-hidrazonas complementares (**30-35**). Nenhum dos compostos desta série apresentou atividade frente às células

no *screening* realizado, provando assim, a necessidade do anel A trimetoxilado para a atividade antileucêmica.

Em uma terceira tentativa, na busca por compostos correlatos aos ativos, foram testados os 1,3,4-oxadiazóis (**36-38**) derivados cíclicos das 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazonas. Do mesmo modo que para as acil-hidrazonas complementares (**30-35**), nenhum dos 1,3,4-oxadiazóis (**36-38**) apresentou-se ativo. A explicação destes resultados pode ser devido à rigidez dos anéis promovida pela ciclização, impedindo a interação da molécula com o alvo.

Assim, os compostos **02**, **07**, **09**, **10**, **11** e **16** foram selecionados para determinação da IC_{50} ; os valores estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. IC_{50} dos compostos mais ativos em células leucêmicas Jurkat e REH.

		IC_{50} (nM) - 48h de tratamento	
Composto	Anel B	B (REH)	T (Jurkat)
02	4-Br-fenil	33,7	31,4
07	1-naftil	25,4	15,7
09	4-Cl-fenil	328,3	202,9
10	3,4-OCH ₂ O-fenil	206,2	154,5
11	2-Cl-fenil	458,7	189,4
16	4-CH ₃ -fenil	70,6	71,5
Colchicina		9,5	7,7

As acil-hidrazonas **02** e **07** apresentaram excelentes resultados, com IC₅₀ de 33,7nM e 25,4nM para linhagem leucêmica REH e 31,4nM e 15,7nM para Jurkat.

5 **Exemplo 6. Experimentos de determinação do mecanismo de ação dos compostos com microarranjos de DNA:**

A linhagem celular Jurkat foi tratada ou não com a dose IC₅₀ do composto **07**, durante 6h, em meio RPMI-1640, como descrito anteriormente. Ao final deste período, as células foram recuperadas por breve centrifugação e
10 lisadas em solução de guanidina do kit RNeasy (Qiagen).

a) Purificação do RNA e preparo da sonda biotinilada: o RNA total foi extraído das células usando-se o kit RNeasy (Qiagen) seguindo instruções do fabricante. Um total de 5µg de RNA foi utilizado para preparar a sonda de RNA complementar biotinilado (Bio-cRNA), através de síntese de cDNA seguida de
15 amplificação por transcrição *in vitro*, segundo recomendações da Affymetrix (www.affymetrix.com/products/small_sample_prep_tn.html). Resumidamente, a síntese da primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando-se 500ng de T7-(dT)24 “primer” e 200U de SuperScript II por reação. A segunda fita foi sintetizada segundo recomendações *SuperScript Choice System* (Life
20 Technologies). O cDNA sintetizado foi purificado através de precipitação por etanol, e então amplificado através de transcrição *in vitro* usando o kit Enzo BioArray HighYield RNA. O RNA biotinilado foi purificado através de mini coluna Rneasy. Vinte microgramas de cRNA biotinilado foram fragmentadas em MgCl₂ a 95°C e guardadas a -80°C até o momento da hibridização.

b) Microarranjos de oligonucleotídeos e “arrays” de hibridização: um quarto do volume de sonda preparado ou 15µg foi hibridizado em microarranjos de oligonucleotídeos do genoma humano HG-U133A 2.0 (Affymetrix). As lavagens, revelação e *scanning* foram feitas seguindo recomendações do fabricante.

c) Análise dos dados: as imagens foram analisadas pelo Microarray Suite (MAS) 5.0 software (Affymetrix) e o DNA-Chip Analyzer (dCHIP) software (Li C,

2001). Os novos algorítmicos estatísticos no MAS 5.0 permitem valores adicionais de significância estatística (*p value*) e limites de confiança, que ajudam a elucidar a significância dos resultados. Uma limitação do MAS 5.0 é que ele não permite a comparação simultânea de mais de duas amostras.

5 Comparações entre o grupo amostral foram feitas utilizando-se o software dCHIP. Imagens escaneadas foram normalizadas e foram calculados valores para um modelo de expressão basal. Os genes foram considerados diferentemente expressos quando: *i*) o *Fold change* entre a média do nível de expressão entre os dois grupos excedeu 2; *ii*) a diferença absoluta (*absolute*
10 *difference*) entre a média do nível de expressão entre os dois grupos excedeu 50 (que corresponde a mais de 1000 no MAS software); e *iii*) o *p value* para o teste grupo A = grupo B foi $<0,05$. Os dados resultantes da análise de microarranjos foram interpretados com o CMap para identificação de possíveis mecanismos de ação correlatos à ação de compostos conhecidos (Lamb, J.;
15 Crawford E. D. The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes and Disease. *Science*, **2006**, 313,1929-1935).

RESULTADOS: MECANISMO DE AÇÃO PROPOSTO ATRAVÉS DE ESTUDOS COM MICROARRANJOS DE DNA

No intuito de determinarmos o mecanismo de ação destes compostos,
20 selecionamos o composto **07** para análise da expressão gênica, através de biochip de DNA. Estes ensaios geraram um conjunto de dados (algoritmos) que posteriormente foram interpretados através de Mapas de Conectividade (CMap) (www.broadinstitute.org/cnmap).

Os resultados obtidos na análise de microarranjo de expressão gênica,
25 das células tratadas com o composto teste **07**, foram analisados no CMap. Genes diferencialmente expressos nas células sob ação do composto **07** foram cruzados com uma série de listas de genes responsivos às mais diferentes drogas. Estas listas fazem parte do banco de dados do CMap. Foram identificados 13 compostos que apresentaram uma forte correlação positiva
30 com a lista de genes obtida a partir das células tratadas com o composto **07** (*p*

$\leq 0,01$). Os resultados da análise do composto **07** no CMap são apresentados na figura abaixo:

rank	cmap name	mean	n	enrichment	p	specificity	% non-null
1	H-7	0.776	4	0.988	0.00000	0.0111	100
2	camptothecin	0.687	3	0.966	0.00004	0.1429	100
3	GW-8510	0.713	4	0.924	0.00004	0.0774	100
4	alsterpauillone	0.710	3	0.954	0.00010	0.0465	100
5	0175029-0000	0.597	6	0.754	0.00054	0.1000	83
6	viomycin	-0.590	4	-0.853	0.00092	0.0576	100
7	5279552	-0.654	2	-0.976	0.00115	0.0000	100
8	dicycloverine	-0.274	5	-0.768	0.00124	0.0076	60
9	etiocholanolone	-0.472	6	-0.712	0.00129	0.0584	83
10	fludroxycortide	0.495	5	0.757	0.00198	0.0000	100
11	doxorubicin	0.680	3	0.893	0.00234	0.0838	100
12	ellipticine	0.615	4	0.788	0.00396	0.0884	100
13	meticrane	0.521	5	0.718	0.00409	0.0280	80
14	disopyramide	-0.394	4	-0.778	0.00503	0.0118	75
15	sulfametoxydiazine	0.456	4	0.758	0.00647	0.0094	100
16	guaifenesin	0.411	6	0.634	0.00735	0.0085	83
17	halofantrine	-0.445	3	-0.841	0.00803	0.0290	100
18	dehydrocholic acid	-0.372	5	-0.671	0.00893	0.0000	80
19	clindamycin	0.361	5	0.676	0.00927	0.0072	80
20	hydrocotarnine	0.504	4	0.724	0.01156	0.0231	100

Resultados obtidos para o composto **07** usando o CMap, com valores $p \leq 0,01$.

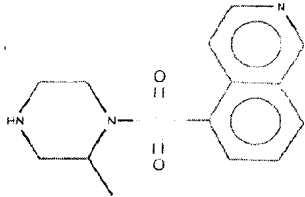
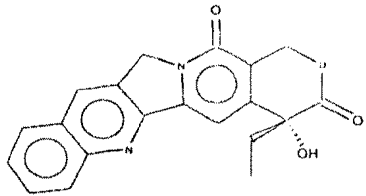
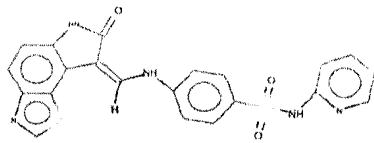
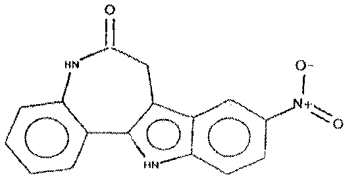
5

As quatro moléculas com maior correlação positiva com o composto **07** e menores valores p ($p \leq 0,0001$) são apresentados na Tabela 5, que apresenta também o alvo de ação já estudado para estas quatro estruturas. Os resultados obtidos indicam que o mecanismo de ação do composto **07** ocorre via inibição de proteínas quinase dependente de ciclina (CDKs) e da topoisomerase I.

10

15

Tabela 5: Compostos positivamente correlacionados com o composto 07.

Rank	Composto	Estrutura	Alvo/função
1	H-7		Inibidor de CDK2
2	Camptothecin		Inibidor de topoisomerase I
3	GW-8510		Inibidor de CDK2
4	Alsterpaullone		Inibidor de CDK2 e CDK5

*($p \leq 0,0001$)

Exemplo 7. Efeito do composto 07 sobre linfócitos humanos saudáveis e sobre a formação de colônias, avaliando sua seletividade:

a) Ensaio in vitro da sensibilidade/resistência das células ao composto 07 pelo método do MTT: Para o teste do composto 07 contra linfócitos normais, sangue de doadores humanos foi separado em gradiente de *ficoll* e as células mononucleares foram cultivadas a 200.000 células/poço, em 80 microlitros de meio RPMI-1640 (contendo 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina e 100 pg/mL de estreptomicina) e 20 microlitros de solução de fitohemaglutinina (Cultilab) em cada poço, para estímulo dos linfócitos T. O composto 07 foi adicionado em diluições seriadas (50%) de 300 a 1 nM. A citotoxicidade foi avaliada após 48h pelo método do MTT, como descrito anteriormente.

b) Experimentos de formação de colônias: A citotoxicidade do composto 07 também foi avaliada em ensaio de formação de colônias de células hematopoéticas. Utilizou-se kit “HSC-CFU complete with Epo” da Miltenyi (cat# 130-091-280), seguindo recomendações do fabricante. Células de medula óssea de doadores saudáveis foram cultivadas em meio semi-sólido de metilcelulose, acrescido de soro fetal bovino, soro albumina bovina, diferentes fatores de crescimento (GM-CSF, G-CSF, SCF, IL-3, IL-6, Epo) e do composto 07, cuja ação sobre a hematopoese foi avaliada. Após duas semanas de cultura a 37°C e 5% CO₂, procedeu-se à contagem do número de colônias de granulócitos (CFU-G), macrófagos (CFU-M), granulócitos/macrófagos (CFU-GM), eritróide (BFU-E e CFU-E) e colônias mistas (CFU-GEMM).

RESULTADOS: SELETIVIDADE DO COMPOSTO 07

O composto 07 foi testado em linfócitos T maduros e saudáveis, estimulados com fitohemaglutinina, para avaliar sua ação contra células normais. Como controle positivo usou-se a colchicina. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Porcentagem de sobrevivência de linfócitos saudáveis estimulados com fitohemaglutinina e tratados com diferentes concentrações do composto **07**.

Composto	Concentração (nM)							
	300	150	75	37,5	18,75	9,38	4,6	0
07	95%	107%	108%	101%	105%	105%	103%	100%
Colchicina	63%	69%	75%	84%	95%	110%	109%	100%

5 Em concentrações de 300 nM o composto **07** apresentou toxicidade de 5% em relação ao controle, enquanto a colchicina, na mesma concentração, causou inibição de 37% na viabilidade dos linfócitos T. É importante salientar que a IC₅₀ do composto **07** frente às células leucêmicas é de 15,7 nM para células da linhagem Jurkat e 25,4 nM para células da linhagem REH. Os
10 resultados obtidos mostram que concentrações até 10 vezes maiores que a IC₅₀ parecem não afetar os linfócitos normais induzidos por fitohemaglutinina. Isto indica que o composto **07** poderia atuar em células leucêmicas sem afetar a função imunológica normal dos pacientes.

Para averiguar o efeito do composto **07** na hematopoese, o mesmo foi
15 testado em ensaio de formação de colônias de células da medula óssea, cultivadas em meio semi-sólido de metilcelulose acrescido de fatores de crescimento. Como mostra a Tabela 7, o composto **07**, em concentração muito próxima a IC₅₀ (20 nM), apresenta atividade inibitória sobre a formação de eritrócitos comparável a um inibidor da via Pi3K, usado no ensaio como
20 controle positivo. O composto **07** também apresenta atividade inibitória contra granulócitos e macrófagos, porém em intensidade pequena quando comparada ao inibidor da Pi3K. Na concentração de 200 nM, correspondente a 10 vezes o IC₅₀ médio em linhagens de LLA, o composto **07** inibiu completamente a hematopoese.

Tabela 7. Formação de colônias de células de medula óssea (%) utilizando o composto **07**.

	BFU-E	CFU-E	CFU-G	CFU-M	CFU-GM	CFU-GEMM
Controle negativo	30,7±13,9	27,0±9,5	20,0±4,0	40,7±5,1	46,7±14,6	5,7±7,4
2 nM composto 07	39	23	11	17	52	1
20 nM composto 07	26	11	14	25	27	2
200 nM composto 07	0	0	0	0	0	0
Inibidor da Pi3K	18	12	8	9	20	1

* Para o controle são apresentados a média $\pm$ o desvio padrão de 3 repetições.

5 **Conclusões**

De acordo com a descrição da presente invenção, obtiveram-se cinco 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazonas inéditas e três 1,3,4-oxadiazóis inéditos. Todas as acil-hidrazonas e oxadiazóis sintetizados e relatados no escopo deste invento foram avaliados em células leucêmicas das linhagens Jurkat e REH, e os compostos **02** e **07** apresentaram excelente atividade antileucêmica, semelhante ao composto padrão (colchicina). O mecanismo de ação do composto **07** foi determinado com a utilização de microarranjos de DNA, mostrando sua atividade inibitória de proteínas quinase dependente de ciclina (CDKs) e da topoisomerase I. Testes subsequentes mostraram a seletividade do composto **07** para células leucêmicas na ordem de 10 vezes, quando comparado à sua ação em linfócitos humanos saudáveis.

As 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazonas, bem como seus compostos análogos e semelhantes, incluindo os oxadiazóis, presentes nesta invenção, apresentam, portanto, grande potencial como protótipos de fármacos, ou fármacos, para o tratamento de diferentes doenças associadas à proliferação celular, como leucemias, incluindo leucemia linfóide aguda (LLA), tumores e inflamação.

A descrição da presente invenção foi apresentada com o propósito de ilustração e detalhamento para futuras aplicações. Entretanto, a descrição não tenciona limitar a invenção à forma aqui revelada e exemplificada: variações e

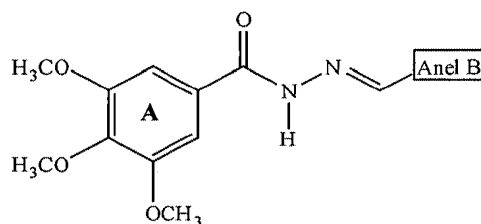
modificações compatíveis com os descritos acima, e a habilidade ou conhecimento da técnica relevante, estão dentro do escopo da presente invenção. É intenção legítima que a presente invenção inclua todas as modificações e variações da mesma, dentro do escopo descrito no relatório e nas reivindicações anexas.

5

Reivindicações

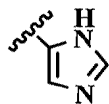
ACIL-HIDRAZONAS COMO PROTÓTIPO DE NOVOS FÁRMACOS PARA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA)

1. “Acil-hidrazonas como protótipo de novos fármacos para leucemia linfóide aguda (LLA)”, **caracterizado pelo** composto farmacêutico da classe das acil-hidrazonas, mais especificamente 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazonas, que possui a seguinte estrutura:



em que o anel B representa:

- 10 05 - 3-OCH₃-4-OH-5-I-fenil



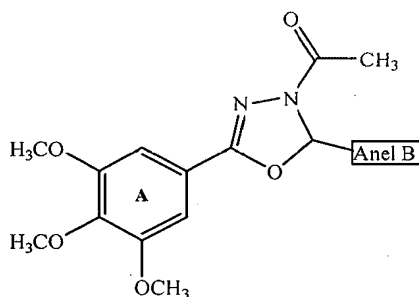
17 -

21 - 2,6-diOCH₃-fenil

26 - 2-OH-4-Br-fenil

29 - 3-CF₃-4-Cl-fenil

- 15 2. “Acil-hidrazonas como protótipo de novos fármacos para leucemia linfóide aguda (LLA)”, **caracterizado pelo** composto farmacêutico da classe dos oxadiazóis, mais especificamente 1,3,4-oxadiazóis, que possui a seguinte estrutura:



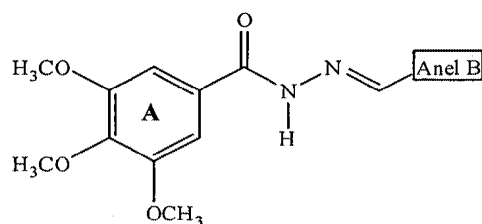
- 20 em que o anel B representa:

36 - 3-OCH₃-4-OH-5-Br-fenil

37 - 3-OCH₃-4-OH-fenil

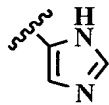
38 - 1-naftil

3. "Acil-hidrazonas como protótipo de novos fármacos para leucemia linfóide aguda (LLA)", composto farmacêutico da classe das acil-hidrazonas, mais especificamente 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazonas, que possui a seguinte estrutura:



em que o anel B representa:

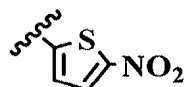
- 10 01 - fenil
 02 - 4-Br-fenil
 03 - 4-NO₂-fenil
 04 - 3-OCH₃-4-OH-5-Br-fenil
 05 - 3-OCH₃-4-OH-5-I-fenil
 15 06 - 3-OCH₃-4-OH-fenil
 07 - 1-naftil
 08 - 2-naftil
 09 - 4-Cl-fenil
 10 - 3,4-OCH₂O-fenil
 20 11 - 2-Cl-fenil
 12 - 2,5-diOCH₃-fenil
 13 - 3,4,5-triOCH₃-fenil
 14 - 2,4,5-triOCH₃-fenil
 15 - 4-O(CH₂)₃CH₃-fenil
 25 16 - 4-CH₃-fenil



17 -

18 - 3-NO₂-fenil19 - 4-N(CH₃)₂-fenil

20 - 3-Cl-fenil

5 21 - 2,6-diOCH₃-fenil

22 -

23 - 2-COOH-fenil

24 - 3-OCH₂CH₃-4-OH-fenil25 - 3-OCH₃-fenil

10 26 - 2-OH-4-Br-fenil

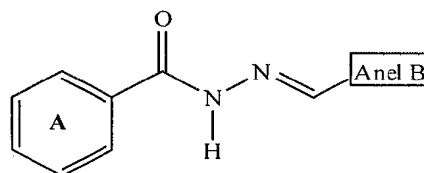
27 - (3-OCH₃-4-OCH₂fenil)-fenil28 - 4-CF₃-fenil29 - 3-CF₃-4-Cl-fenil

caracterizado pelo uso das 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazonas desta reivindicação

15 como protótipos de fármacos, ou fármacos, ou medicamentos, para o tratamento de diferentes doenças associadas à proliferação celular, como leucemias, incluindo leucemia linfóide aguda (LLA), tumores e inflamação.

4. "Acil-hidrazonas como protótipo de novos fármacos para leucemia linfóide aguda (LLA)", compreendendo composto farmacêutico da classe das acil-

20 hidrazonas, que possui a seguinte estrutura:



em que o anel B representa:

30 - fenil

31 - 3,4-OCH₂O-fenil

25 32 - 4-Br-fenil

33 - 4-CH₃-fenil

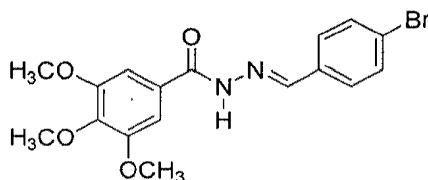
34 - 1-naftil

35 - 2-naftil

caracterizado pelo uso das acil-hidrazonas desta reivindicação como protótipos de fármacos, ou fármacos, ou medicamentos, para o tratamento de diferentes doenças associadas à proliferação celular, como leucemias, incluindo leucemia linfóide aguda (LLA), tumores e inflamação.

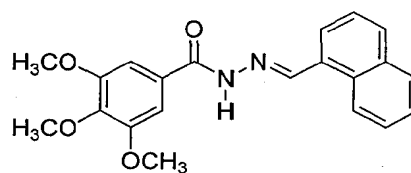
5. “Acil-hidrazonas como protótipo de novos fármacos para leucemia linfóide aguda (LLA)”, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** uso dos oxadiazóis como protótipos de fármacos, ou fármacos, ou medicamentos, para o tratamento de diferentes doenças associadas à proliferação celular, como leucemias, incluindo leucemia linfóide aguda (LLA), tumores e inflamação.

6. “Acil-hidrazonas como protótipo de novos fármacos para leucemia linfóide aguda (LLA)”, que compreende a (E)-N'-(4-bromobenzilideno)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida, denominada nesta invenção, composto **02**, que possui a seguinte estrutura:



caracterizado pelo uso como protótipo de fármaco, ou fármaco, ou medicamento, para o tratamento de diferentes doenças associadas à proliferação celular, como leucemias, incluindo leucemia linfóide aguda (LLA), tumores e inflamação.

7. “Acil-hidrazonas como protótipo de novos fármacos para leucemia linfóide aguda (LLA)”, que compreende a (E)-N'-(1-naftil-metileno)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida, denominada nesta invenção, composto **07**, que possui a seguinte estrutura:



- caracterizado pelo** uso como protótipo de fármaco, ou fármaco, ou medicamento, para o tratamento de diferentes doenças associadas à proliferação celular, como leucemias, incluindo leucemia linfóide aguda (LLA),
- 5 tumores e inflamação.

Resumo

ACIL-HIDRAZONAS COMO PROTÓTIPO DE NOVOS FÁRMACOS PARA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA)

A presente invenção refere-se a uma classe de acil-hidrazonas, especialmente as derivadas da 3,4,5-trimetoxifenil-hidrazida, bem como a seus análogos oxadiazóis e outros compostos semelhantes, e aplicação farmacêutica de todos estes compostos no tratamento de diferentes doenças associadas à proliferação celular, como leucemias, incluindo leucemia linfóide aguda (LLA), tumores e inflamação. Esta invenção também descreve os processos utilizados para a determinação da atividade biológica de todos estes compostos. Foram obtidas acil-hidrazonas com atividade semelhante ao composto utilizado como padrão nos experimentos (colchicina). A maior seletividade dos compostos apresentados nesta invenção é uma característica importante relacionada com menores efeitos colaterais que os fármacos atualmente empregados na clínica. As acil-hidrazonas sintetizadas, mais especificamente os compostos **02** e **07**, apresentaram importante atividade antileucêmica, o que indica **02** e **07** como candidatos a protótipos de fármacos, ou fármacos, para o tratamento de leucemias, especialmente leucemia linfóide aguda (LLA), tumores e outras doenças proliferativas, como inflamação. A determinação do mecanismo de ação dos compostos mais ativos foi realizada pela utilização de microarranjos de DNA e testes subseqüentes indicados através do *chip*, além dos estudos de seletividade em linfócitos humanos saudáveis.