



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

(21) **PI0806365-6 A2**



\* B R P I 0 8 0 6 3 6 5 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 06/02/2008  
(43) Data da Publicação: 06/09/2011  
(RPI 2122)

(51) *Int.Cl.:*  
A01N 43/00  
A01N 43/46  
A61K 31/55

(54) **Título:** COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM COMPOSTO, MÉTODO DE CONTROLE DE VEGETAÇÃO INDESEJADA, MÉTODO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE VEGETAL, USO DO COMPOSTO

(57) **Resumo:** COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM COMPOSTO, MÉTODO DE CONTROLE DE VEGETAÇÃO INDESEJADA, MÉTODO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE VEGETAL, USO DO COMPOSTO. A presente invenção fornece compostos que possuem a estrutura que pode ser utilizada para o tratamento de tumores.

(30) **Prioridade Unionista:** 06/02/2007 US 60/899,903,  
14/08/2007 US 60/964,904, 15/01/2008 US 61/011,323

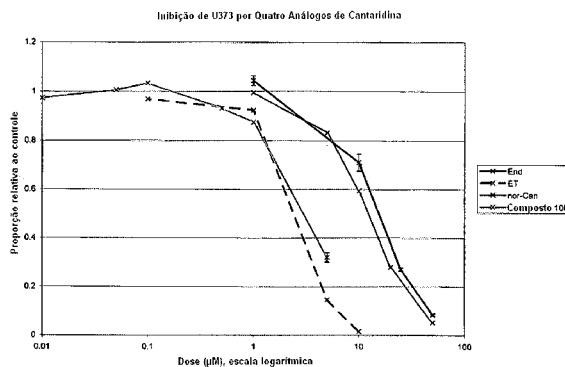
(73) **Titular(es):** LIXTE BIOTECHNOLOGY HOLDINGS, INC

(72) **Inventor(es):** JOHN S. KOVACH

(74) **Procurador(es):** David do Nascimento Advogados  
Associados

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2008001549 de  
06/02/2008

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/097561 de  
14/08/2008





COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE  
PREPARAÇÃO DE UM COMPOSTO, MÉTODO DE CONTROLE DE VEGETAÇÃO  
INDESEJADA, MÉTODO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE  
VEGETAL, MÉTODO DE PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DE UMA INFECÇÃO  
5 FÚNGICA EM UM PACIENTE E MÉTODO DE TRATAMENTO DE PACIENTES  
QUE SOFREM DE CÂNCER

Ao longo do presente pedido, são indicadas algumas  
publicações. As citações completas dessas publicações podem  
ser encontradas imediatamente antes das reivindicações. Os  
10 relatórios descritivos dessas publicações são integralmente  
incorporados ao presente por meio de referência ao presente  
pedido, a fim de descrever mais completamente o estado da  
técnica a que se refere a presente invenção.

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

15 Retinóides, metabólitos de vitamina A, foram  
examinados terapeuticamente contra uma série de tumores,  
incluindo gliomas (Yung et al (1996)). Co-repressor receptor  
nuclear (N-CoR) é intimamente associado ao receptor retinóide  
e liberado mediante união de ligantes ao receptor (Bastien et  
20 al (2004)). Evitando-se a ação de proteína fosfatase-1 e  
proteína fosfatase-2A, as antifosfatases aumentam a forma  
fosforilada de N-CoR e promovem a sua translocalização  
citoplasmática subsequente (Hermanson et al (2002)).

O inibidor de fosfatase, Cantaridina, possui  
25 atividade antitumor contra cânceres humanos do fígado  
(hepatomas) e do trato gastrointestinal superior, mas é  
tóxico para o trato urinário (Wang, 1989).

A publicação de um relatório dando conta que  
cantaridina age como um inibidor de fosfatase de proteínas  
30 despertou um interesse mais geral em compostos com este tipo  
de estrutura química (Li e Casida, 1992). Descobriu-se  
anteriormente que o congênere mais simples e o seu produto de  
hidrólise (disponível comercialmente como o herbicida

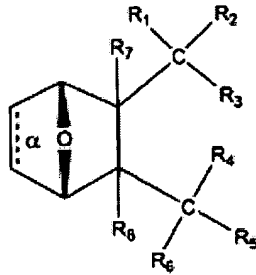
Endothal) são hepatotóxicos (Graziani e Casida, 1997). Estudos de união demonstraram que a ação de certos homólogos de cantaridina é direta sobre fosfatase-2A de proteína e indireta sobre fosfatase-1 de proteína (Honkanen et al, 1993; Li et al, 1993).

Dos congêneres conhecidos deste tipo de composto, apenas o original, cantaridina, e seu derivado bis(normetila), norcantaridina, observaram qualquer uso como substância de droga anticancerígena e apenas norcantaridina é utilizada como agente antineoplástico (Tsauer et al, 1997).

Apesar destes sucessos, poucos compostos deste tipo foram selecionados pela atividade antitumorosa ou citotóxica. Atualmente, existe uma necessidade significativa de desenvolvimento de inibidores de fosfatases de proteína que sejam mais ativas, menos tóxicas e apresentem ação mais específica que as substâncias conhecidas mencionadas acima.

#### RESUMO DA INVENÇÃO

Composto que possui a estrutura:

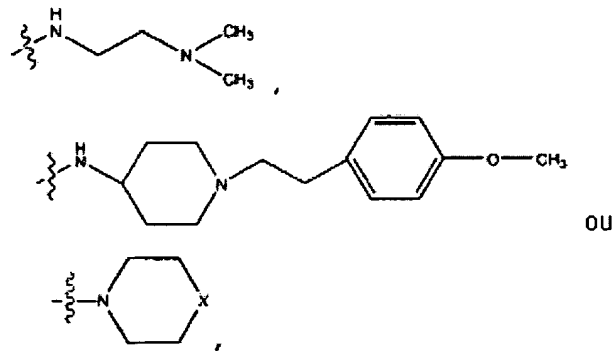


em que:

a união  $\alpha$  está presente ou ausente;

$R_1$  e  $R_2$  são, independentemente entre si, H,  $O^-$  ou  $OR_9$ , em que  $R_9$  é H, alquila, alquenila, alquinila ou arila; ou  $R_1$  e  $R_2$  juntos são =O;

$R_3$  e  $R_4$  são diferentes entre si e cada qual é OH,  $O^-$ ,  $OR_9$ , SH,  $S^-$  ou  $SR_9$ ;



em que X é O, S, NR<sub>10</sub> ou N<sup>+</sup>R<sub>10</sub>R<sub>10</sub>;

em que cada R<sub>10</sub> é independentemente alquila, alquila C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> substituído, alquenila, alquenila C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub> substituído, alquinila, alquinila substituído, arila, arila substituído em que o substituinte é diferente de cloro quando R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> forem =O;



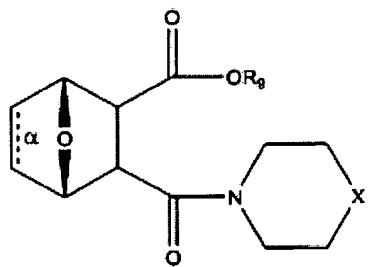
-CH<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>R<sub>11</sub>, -CH<sub>2</sub>COR<sub>11</sub>, -NHR<sub>11</sub> ou -NH<sup>+</sup>(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>, em que R<sub>11</sub> é alquila, alquenila ou alquinila, cada um dos quais substituído ou não substituído, ou H;

R<sub>5</sub> e R<sub>6</sub> são, independentemente entre si, H, OH; ou R<sub>5</sub> e R<sub>6</sub>, tomados em conjunto, são =O; e

R<sub>7</sub> e R<sub>8</sub> são, independentemente entre si, H, F, Cl, BR, SO<sub>2</sub>Ph, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> ou SR<sub>12</sub>, em que R<sub>12</sub> é H, arila ou alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído;

ou um sal, enantiômero ou zwitteríon do composto.

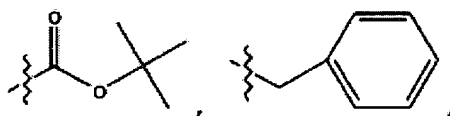
Composto que possui a estrutura:



a união  $\alpha$  está presente ou ausente;

$R_9$  está presente ou ausente e, quando presente, é H, alquila, alquenila, alquinila ou fenila; e

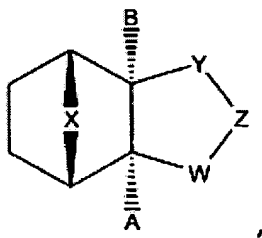
X é O,  $NR_{10}$  ou  $NH^+R_{10}$ , em que cada  $R_{10}$  é independentemente H, alquila, alquila  $C_2-C_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $C_4-C_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila ou arila substituído em que o substituinte é diferente de cloro;



10  $-CH_2CN$ ,  $-CH_2CO_2R_{12}$  ou  $-CH_2COR_{12}$ , em que  $R_{12}$  é H ou alquila;

ou um sal, zwitterion ou enantiômero do composto.

Composto que possui a estrutura:



15 em que:

A e B são, independentemente entre si, H, F, Cl, Br,  $SO_2Ph$ ,  $CO_2CH_3$ , CN,  $COR_{14}$  ou  $SR_{14}$ ;

em que  $R_{14}$  é H, arila ou um alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído;

20 X é O, NH ou S;

Z é O, S,  $SR_{15}$ , NH,  $NR_{15}$ ,  $CH_2OH$  ou  $CH_2OR_{15}$ , em que  $R_{15}$  é arila ou um alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído; e

25 Y e W são, independentemente entre si,  $CH_2$ , CHOH, C=O ou C=S;

ou um sal do composto.

A presente invenção contempla adicionalmente um método de controle de vegetação indesejada que compreende o contato da vegetação ou seu ambiente com uma quantidade eficaz como herbicida dos compostos conforme a presente invenção.

A presente invenção contempla ainda um método de inibição da atividade de fosfatase de plantas que compreende o contato da planta ou seu ambiente com uma quantidade eficaz como herbicida dos compostos conforme a presente invenção.

A presente invenção contempla ainda um método de prevenção ou tratamento de infecções fúngicas em pacientes, que compreende a administração ao paciente de uma quantidade eficaz dos compostos conforme a presente invenção.

A presente invenção contempla ainda um método de tratamento de câncer em pacientes, que compreende a administração ao paciente de uma quantidade eficaz dos compostos conforme a presente invenção.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: curva logarítmica de linhagem celular de glioma U373 tratada com Endothal (End), tioanidrido Endothal (ET), norcantaridina (nor-Can) ou Composto 100. O aumento das dosagens demonstra maior inibição do crescimento. Barras de erros indicam desvio padrão.

Figura 2: inibição da linhagem de células de glioma U373 tratadas com Endothal (End) ou Composto 100 ou cada qual com e sem ácido retinóico totalmente trans (ATRA) por sete dias. O tratamento individual com Endothal e Composto 100 exibe inibição modesta do crescimento. Combinação de End ou Composto 100 com ATRA exibe redução sinérgica do crescimento celular. Barras de erro indicam desvio padrão.

Figura 3: inibição do crescimento de linhagem de células de câncer renal, UMRC por tioanidrido de Endothal (ET), Endothal (End), ácido retinóico totalmente trans

(ATRA), Tricostatina A (TSA) e norcantaridina (nor-Can) por sete dias. As barras de erro indicam desvio padrão.

Figura 4: inibição do crescimento de linhagem de células de glioma U373 por tioanidrido Endothal (ET), Endothal (End), ácido retinóico totalmente trans (ATRA), tricostatina A (TSA) e norcantaridina (nor-Can) por sete dias. Tratamento individual com tioanidrido Endothal exibiu a maior inibição do crescimento. Barras de erro indicam desvio padrão.

Figura 5: inibição de crescimento de linhagem de células de câncer de mama, MCF-7 por meio de inibição de UMRC por tioanidrido Endothal (ET), Endothal (End), ácido retinóico totalmente trans (ATRA), tricostatina A (TSA) e norcantaridina (nor-Can) por sete dias. Tratamento com doses individuais de Endothal, ATRA e TSA exibiu inibição do crescimento. Barras de erro indicam desvio padrão.

Figura 6: curva logarítmica de linhagem de células de glioma U373 tratada com 1-(3-exocarbóxi-7-oxabicyclo [2.2.1]heptano-2-exocarbonil)-4-etilpiperazina (Composto 105) após três dias. O aumento das dosagens demonstra uma maior inibição do crescimento.

Figura 7: curva logarítmica de linhagem de células GBM humanas U373 tratada com 1-(3-exocarbóxi-7-oxabicyclo [2.2.1]heptano-2-exocarbonil)-4-etilpiperazina (Composto 105) após sete dias. O aumento das dosagens demonstra maior inibição do crescimento.

Figura 8: inibição do crescimento de linhagem de células GBM humanas U373 tratada com Composto 105 por sete dias. O gráfico exibe a inibição do crescimento ao longo de sete dias nas dosagens a seguir: 1, 2, 5, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  de composto 105, 10  $\mu\text{M}$  de composto 100 e uma dosagem controle.

Figura 9: inibição do crescimento da linhagem de células de glioma U373 pelo Composto 105 ao longo de sete dias.

Figura 10: inibição do crescimento da linhagem de células de glioma U373 pelo Composto 102 ao longo de sete dias.

Figura 11: inibição do crescimento da linhagem de células de glioma U373 pelo Composto 101 ao longo de sete dias.

Figura 12: inibição do crescimento da linhagem de células de glioma U373 pelo Composto 103 ao longo de sete dias.

Figura 13: inibição do crescimento da linhagem de células de glioma U373 pelo Composto 104 ao longo de sete dias.

Figura 14: inibição do crescimento da linhagem de células de glioma U373 pelo Composto 106 ao longo de sete dias.

Figura 15: inibição do crescimento da linhagem de células de glioma U373 pelo Composto 100 ao longo de sete dias.

Figura 16: inibição do crescimento da linhagem de células de meduloblastoma DAOY pelo Composto 100 ao longo de sete dias.

Figura 17: efeito do composto 100 sobre o volume de tumor de xenoenxerto U87 ao longo de 26 dias.

Figura 18: efeito do composto 100 e do Composto 102 sobre o volume de tumor de xenoenxerto DAOY ao longo de 23 dias.

Figura 19A: representação gráfica e adequação de curvas com valor  $IC_{50}$  (II) de dados obtidos após a exposição de células MDA-MB-231 ao Composto 100 e Composto 102 utilizando um teste CellTiter-Glo. Os efeitos de 10  $\mu$ M de

doxorubicina que foi utilizada como controle positivo também são exibidos em I. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de amostras pelo menos em três cópias.

Figura 19B: representação gráfica (I) e adequação de curvas com valor  $IC_{50}$  (II) de dados obtidos após a exposição de células HT-29 ao Composto 100 e ao Composto 102 utilizando o teste CellTiter-Glo. Os efeitos de 10  $\mu$ M de doxorubicina que foi utilizada como controle positivo também são exibidos em I. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de amostras pelo menos em três cópias.

Figura 19C: representação gráfica (I) e adequação de curvas com valor  $IC_{50}$  (II) de dados obtidos após a exposição de células NCI-H460 ao Composto 100 e ao Composto 102 utilizando o teste CellTiter-Glo. Os efeitos de 10  $\mu$ M de doxorubicina que foi utilizada como controle positivo também são exibidos em I. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de amostras pelo menos em três cópias.

Figura 19D: representação gráfica (I) e adequação de curvas com valor  $IC_{50}$  (II) de dados obtidos após a exposição de células NCI-H522 ao Composto 100 e ao Composto 102 utilizando o teste CellTiter-Glo. Os efeitos de 10  $\mu$ M de doxorubicina que foi utilizada como controle positivo também são exibidos em I. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de amostras pelo menos em três cópias.

Figura 19E: representação gráfica (I) e adequação de curvas com valor  $IC_{50}$  (II) de dados obtidos após a exposição de células NCI-H69 ao Composto 100 e ao Composto 102 utilizando o teste CellTiter-Glo. Os efeitos de 10  $\mu$ M de doxorubicina que foi utilizada como controle positivo também são exibidos em I. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de amostras pelo menos em três cópias.

Figura 19F: representação gráfica (I) e adequação de curvas com valor  $IC_{50}$  (II) de dados obtidos após a

exposição de células GXF-209 ao Composto 100 e ao Composto 102 utilizando o teste CellTiter-Glo. Os efeitos de 10  $\mu$ M de doxorubicina que foi utilizada como controle positivo também são exibidos em I. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de amostras pelo menos em três cópias.

Figura 19G: representação gráfica (I) e adequação de curvas com valor  $IC_{50}$  (II) de dados obtidos após a exposição de células HepG2 ao Composto 100 e ao Composto 102 utilizando o teste CellTiter-Glo. Os efeitos de 10  $\mu$ M de doxorubicina que foi utilizada como controle positivo também são exibidos em I. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de amostras pelo menos em três cópias.

Figura 19H: representação gráfica (I) e adequação de curvas com valor  $IC_{50}$  (II) de dados obtidos após a exposição de células OVCAR-3 ao composto 100 e ao composto 102 utilizando o teste CellTiter-Glo. Os efeitos de 10  $\mu$ M de doxorubicina que foi utilizada como controle positivo também são exibidos em I. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de amostras pelo menos em três cópias.

Figura 19I: representação gráfica (I) e adequação de curvas com valor  $IC_{50}$  (II) de dados obtidos após a exposição de células PANC-1 ao Composto 100 e ao Composto 102 utilizando o teste CellTiter-Glo. Os efeitos de 10  $\mu$ M de doxorubicina que foi utilizada como controle positivo também são exibidos em I. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de amostras pelo menos em três cópias.

Figura 19J: representação gráfica (I) e adequação de curvas com valor  $IC_{50}$  (II) de dados obtidos após a exposição de células DU-145 ao Composto 100 e ao Composto 102 utilizando o teste CellTiter-Glo. Os efeitos de 10  $\mu$ M de doxorubicina que foi utilizada como controle positivo também são exibidos em I. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de amostras pelo menos em três cópias.

Figura 19K: representação gráfica (I) e adequação de curvas com valor  $IC_{50}$  (II) de dados obtidos após a exposição de células LNCAP ao Composto 100 e ao Composto 102 utilizando o teste CellTiter-Glo. Os efeitos de 10  $\mu$ M de doxorubicina que foi utilizada como controle positivo também são exibidos em I. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de amostras pelo menos em três cópias.

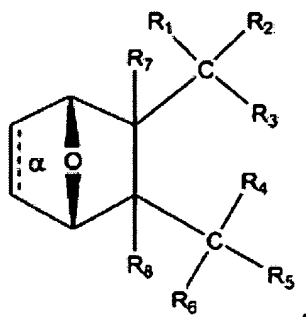
Figura 19L: representação gráfica (I) e adequação de curvas com valor  $IC_{50}$  (II) de dados obtidos após a exposição de células HL-60 ao Composto 100 e ao Composto 102 utilizando o teste CellTiter-Glo. Os efeitos de 10  $\mu$ M de doxorubicina que foi utilizada como controle positivo também são exibidos em I. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de amostras pelo menos em três cópias.

Figura 19M: representação gráfica (I) e adequação de curvas com valor  $IC_{50}$  (II) de dados obtidos após a exposição de células K-562 ao Composto 100 e ao Composto 102 utilizando o teste CellTiter-Glo. Os efeitos de 10  $\mu$ M de doxorubicina que foi utilizada como controle positivo também são exibidos em I. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de amostras pelo menos em três cópias.

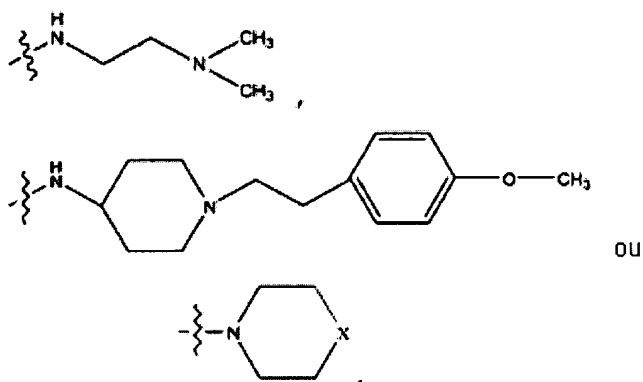
Figura 19N: representação gráfica (I) e adequação de curvas com valor  $IC_{50}$  (II) de dados obtidos após a exposição de células MOLT-4 ao Composto 100 e ao Composto 102 utilizando o teste CellTiter-Glo. Os efeitos de 10  $\mu$ M de doxorubicina que foi utilizada como controle positivo também são exibidas em I. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de amostras pelo menos em três cópias.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

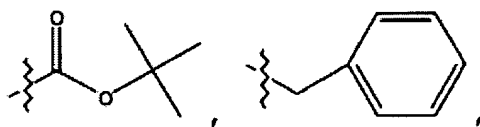
Composto que possui a estrutura:



em que a união  $\alpha$  está presente ou ausente;  $R_1$  e  $R_2$  são, independentemente entre si, H,  $O^-$  ou  $OR_9$ , em que  $R_9$  é H, 5 alquila, alquenila, alquinila ou arila; ou  $R_1$  e  $R_2$  juntos são  $=O$ ;  $R_3$  e  $R_4$  são diferentes entre si e cada qual é OH,  $O^-$ ,  $OR_9$ , SH,  $S^-$ ,  $SR_9$ ;



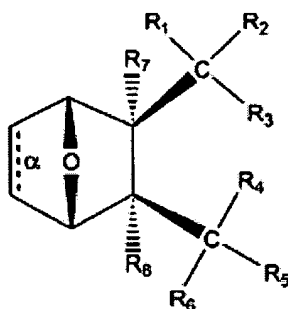
em que X é O, S,  $NR_{10}$  ou  $N^+R_{10}R_{10}$ , em que cada  $R_{10}$  é independentemente alquila, alquila  $C_2-C_{12}$  substituído, 10 alquenila, alquenila  $C_4-C_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila ou arila substituído, em que o substituinte é diferente de cloro quando  $R_1$  e  $R_2$  forem  $=O$ ;



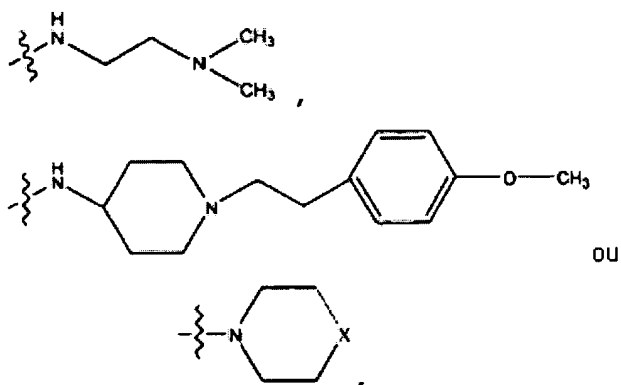
$-CH_2CN$ ,  $-CH_2CO_2R_{11}$ ,  $-CH_2COR_{11}$ ,  $-NHR_{11}$  ou  $-NH^+(R_{11})_2$ , em 15 que cada  $R_{11}$  é independentemente alquila, alquenila ou alquinila, cada um dos quais substituído ou não substituído, ou H;

$R_5$  e  $R_6$  são, independentemente entre si, H, OH ou  $R_5$  e  $R_6$ , tomados em conjunto, são =O; e  $R_7$  e  $R_8$  são, independentemente entre si, H, F, Cl, Br,  $SO_2Ph$ ,  $CO_2CH_3$ , CN,  $COR_{12}$  ou  $SR_{12}$ , em que  $R_{12}$  é H, arila ou alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído ou um sal, enantiômero ou zwitterion do composto.

Uma realização conforme a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura:

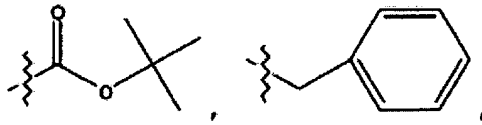


10 A presente invenção fornece ainda a composição do presente em que  $R_1$  e  $R_2$  juntos são =O;  $R_3$  é  $O^-$  ou  $OR_9$ , em que  $R_9$  é H, metila, etila ou fenila;  $R_4$  é:



em que X é O, S,  $NR_{10}$  ou  $N^+R_{10}R_{10}$ ;

15 em que cada  $R_{10}$  é independentemente H, alquila, alquila  $C_2-C_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $C_4-C_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila, arila substituído em que o substituinte é diferente de cloro quando  $R_1$  e  $R_2$  forem =O;

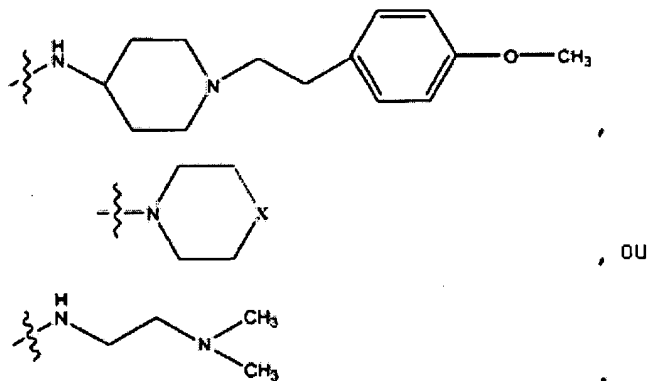


-CH<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>R<sub>11</sub>, -CH<sub>2</sub>COR<sub>11</sub>, -NHR<sub>11</sub>, -NH<sup>+</sup>(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub> em que R<sub>11</sub> é alquila, alquenila ou alquinila, cada um dos quais substituído ou não substituído, ou H;

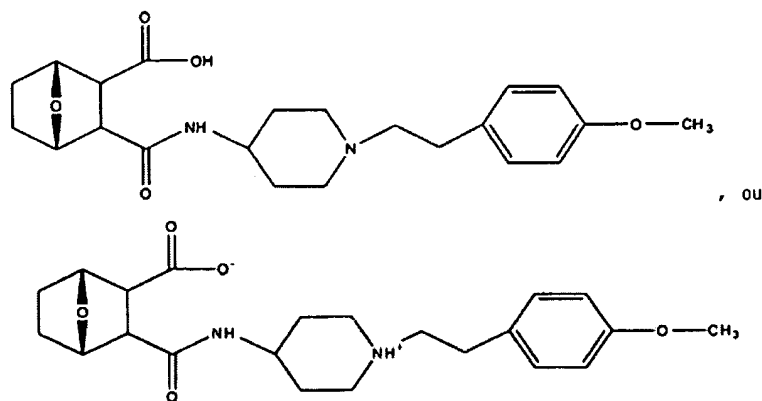
5 -R<sub>5</sub> e R<sub>6</sub>, tomados em conjunto, são =O; e R<sub>7</sub> e R<sub>8</sub> são, independentemente entre si, H, F, Cl, Br, SO<sub>2</sub>Ph, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CN, COR<sub>12</sub> ou SR<sub>12</sub>, em que R<sub>12</sub> é H ou um alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído.

10 A presente invenção fornece ainda a composição do presente, em que R<sub>3</sub> é O<sup>-</sup>.

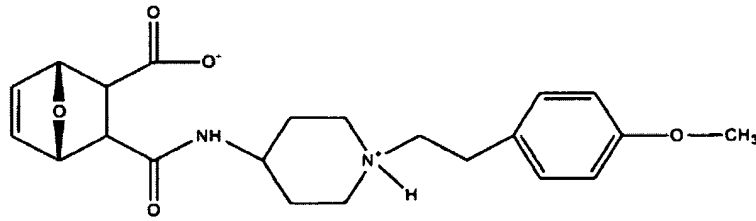
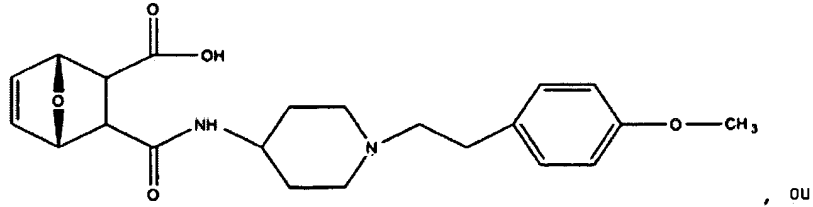
A presente invenção fornece ainda a composição do presente, em que R<sub>4</sub> é:



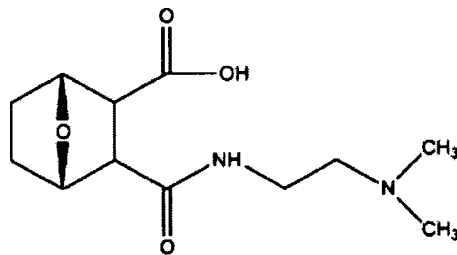
15 Em uma realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 104):



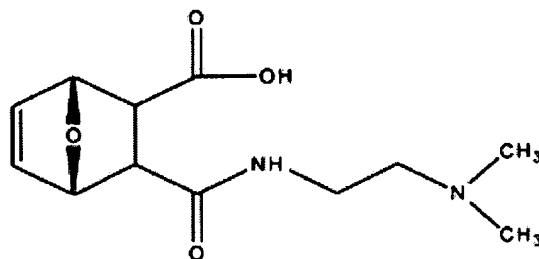
Em uma realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 104E):



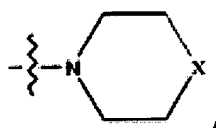
Em uma realização, a presente invenção fornece um  
5 composto que possui a estrutura (Composto 106):



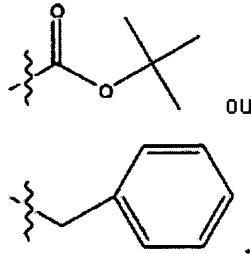
Em uma realização, a presente invenção fornece um  
composto que possui a estrutura (Composto 106E):



10 A presente invenção fornece adicionalmente a  
composição do presente, em que R<sub>4</sub> é:

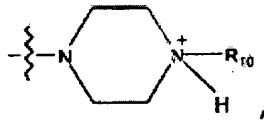


em que X é O, NR<sub>10</sub> ou N<sup>+</sup>R<sub>10</sub>R<sub>10</sub>, em que cada R<sub>10</sub> é independentemente H, alquila, alquila C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alquenila, alquenila C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub> substituído, alquinila, alquinila substituído;



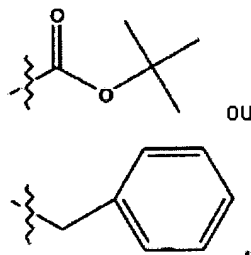
5

A presente invenção fornece adicionalmente a composição do presente, em que R<sup>4</sup> é:



em que R<sub>10</sub> é H, alquila, alquila C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> substituído, alquenila, alquenila C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub> substituído, alquinila, alquinila substituído, arila substituído em que o substituinte é diferente de cloro quando R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> forem =O;

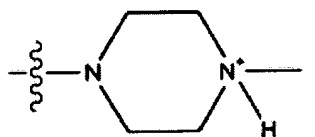
10



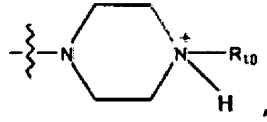
-CH<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>R<sub>11</sub>, -CH<sub>2</sub>COR<sub>11</sub>, -NHR<sub>11</sub> ou NH<sup>+</sup>(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>, em que R<sub>11</sub> é H ou alquila.

15

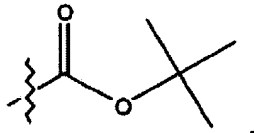
A presente invenção fornece ainda a composição do presente, em que R<sub>4</sub> é:



A presente invenção fornece ainda a composição do presente, em que  $R_4$  é:

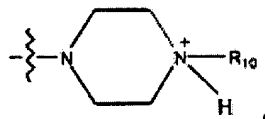


em que  $R_{10}$  é:

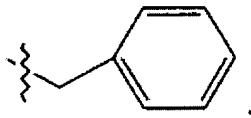


5

A presente invenção fornece ainda a composição do presente, em que  $R_4$  é:

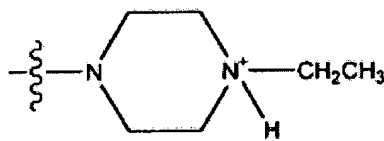


em que  $R_{10}$  é:

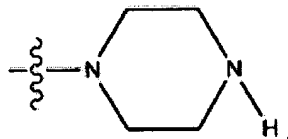


10

A presente invenção fornece ainda a composição do presente, em que  $R_4$  é:



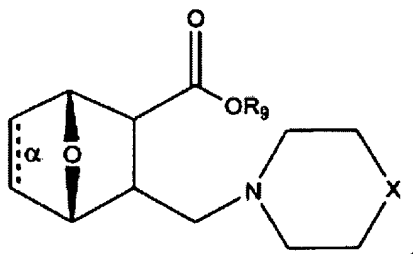
15 A presente invenção fornece ainda a composição do presente, em que  $R_4$  é:



A presente invenção fornece ainda a composição do presente, em que  $R_5$  e  $R_6$  juntos são =O.

A presente invenção fornece ainda a composição do presente, em que  $R_7$  e  $R_8$  são independentemente H.

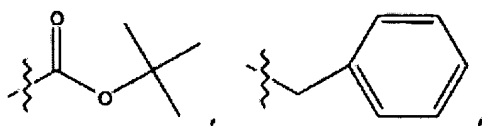
A presente invenção também fornece um composto que possui a estrutura:



5

em que a união  $\alpha$  está presente ou ausente;  $R_9$  está presente ou ausente e, quando presente, é H, alquila  $C_1-C_{10}$ , alquenila  $C_2-C_{10}$  ou fenila; e X é O, S,  $NR_{10}$  ou  $N^+R_{10}R_{10}$ , em que cada  $R_{10}$  é independentemente alquila, alquila  $C_2-C_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $C_4-C_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila e arila substituído, em que o substituinte é diferente de cloro;

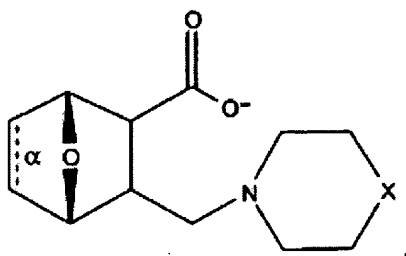
10



$-CH_2CO_2R_{11}$ ,  $-CH_2COR_{11}$ ,  $-CH_2CN$  ou  $-CH_2CH_2R_{16}$ , em que  $R_{11}$  é H ou alquila e em que  $R_{16}$  é qualquer substituinte que é um precursor de um intermediário aziridinila ou um sal, enantiômero ou zwitterion do composto.

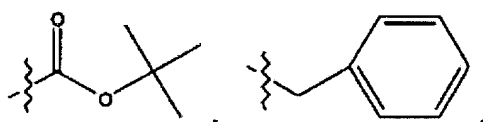
15

Em uma realização, a presente invenção fornece a estrutura:



20

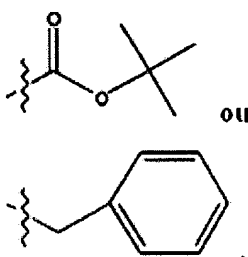
em que a união  $\alpha$  está presente ou ausente; X é O, S,  $\text{NR}_{10}$  ou  $\text{N}^+\text{R}_{10}\text{R}_{10}$ , em que cada  $\text{R}_{10}$  é independentemente H, alquila, alquila  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $\text{C}_4\text{-C}_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila e arila substituído, em que o substituinte é diferente de cloro;



$-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}_{11}$ ,  $-\text{CH}_2\text{COR}_{11}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CN}$  ou  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}_{16}$ , em que  $\text{R}_{11}$  é H ou alquila e em que  $\text{R}_{16}$  é qualquer substituinte que é um precursor de um intermediário aziridinila;

ou um sal, enantiômero ou zwitterion do composto.

A presente invenção fornece ainda uma realização em que X é O ou  $\text{NH}^+\text{R}_{10}$ , em que  $\text{R}_{10}$  é H, alquila, alquila  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $\text{C}_4\text{-C}_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila ou arila substituído, em que o substituinte é diferente de cloro;

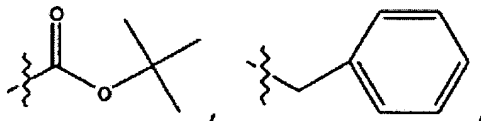


A presente invenção fornece ainda uma realização em que X é O.

A presente invenção fornece ainda uma realização em que X é  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}_{16}$ , em que  $\text{R}_{16}$  é qualquer substituinte que é um precursor de um intermediário de aziridinila.

A presente invenção fornece ainda uma realização em que X é  $\text{NH}^+\text{R}_{10}$ , em que  $\text{R}_{10}$  é H, alquila, alquila  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $\text{C}_4\text{-C}_{12}$  substituído,

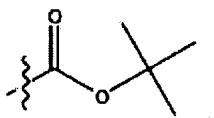
alquinila, alquinila substituído, arila, arila substituído em que o substituinte é diferente de cloro;



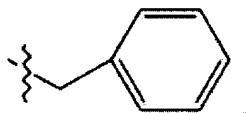
5 -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>R<sub>11</sub>, -CH<sub>2</sub>COR<sub>11</sub>, -CH<sub>2</sub>CN ou -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>R<sub>16</sub>, em que R<sub>11</sub> é H ou alquila e em que R<sub>16</sub> é qualquer substituinte que é um precursor de um intermediário aziridinila.

A presente invenção fornece ainda uma realização em que R<sub>10</sub> é metila.

10 A presente invenção fornece ainda uma realização em que R<sub>10</sub> é:



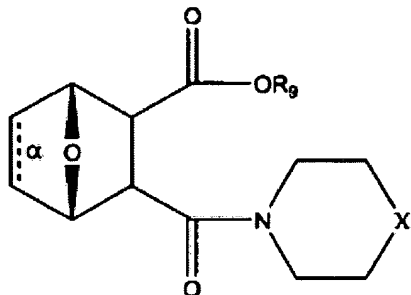
A presente invenção fornece ainda uma realização em que R<sub>10</sub> é:



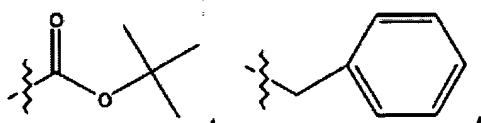
15 A presente invenção fornece ainda uma realização em que R<sub>10</sub> é etila.

A presente invenção fornece ainda uma realização em que R<sub>10</sub> é ausente.

20 Em uma outra realização, a presente invenção fornece a estrutura:



em que  $R_9$  é presente ou ausente e, quando presente, é H, alquila, alquênica, alquinila ou fenila; e X é O,  $NR_{10}$  ou  $N^+R_{10}R_{10}$ , em que cada  $R_{10}$  é independentemente alquila, alquila  $C_2-C_{12}$  substituído, alquênica, alquênica  $C_4-C_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila, arila substituído em que o substituinte é diferente de cloro;

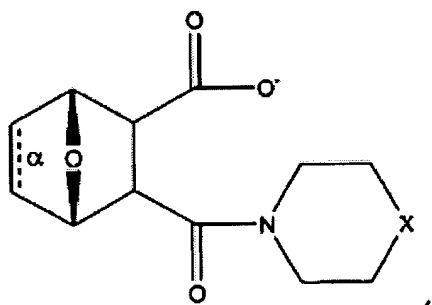


$-CH_2CO_2R_{11}$ ,  $-CH_2COR_{11}$  ou  $-CH_2CN$ , em que  $R_{11}$  é H ou alquila;

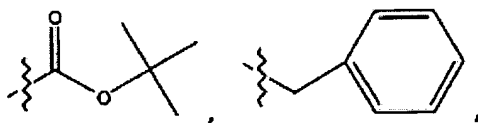
ou um sal, zwitterion ou enantiômero do composto.

Em uma outra realização da presente invenção,  $R_{10}$  é ciclopropila.

Em uma outra realização, a presente invenção fornece a estrutura:

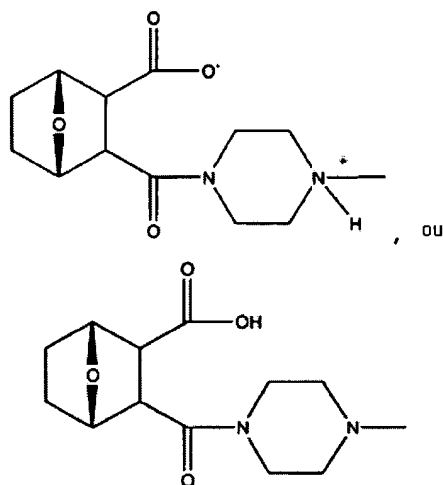


em que X é O ou  $NH^+R_{10}$ , em que  $R_{10}$  está presente ou ausente e, quando presente, é alquila, alquênica ou alquinila, cada um dos quais é substituído ou não substituído;

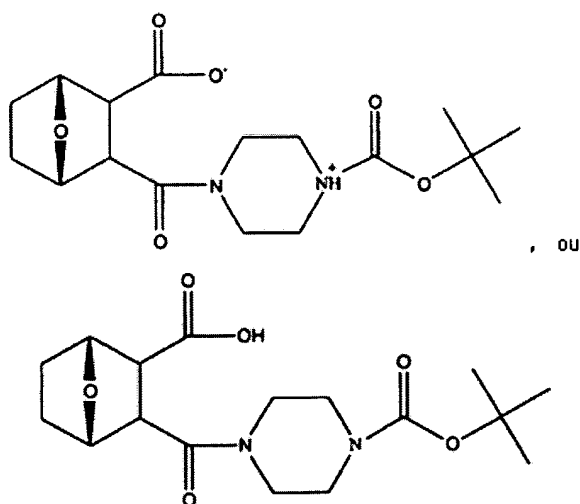


$-CH_2CO_2R_{11}$ ,  $-CH_2COR_{11}$  ou  $-CH_2CN$ , em que  $R_{11}$  é H ou alquila.

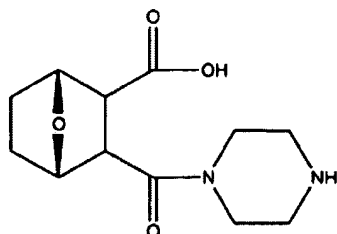
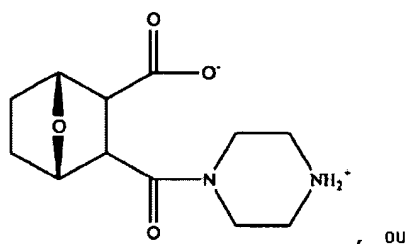
Em uma realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 100):



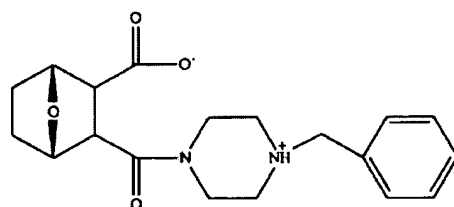
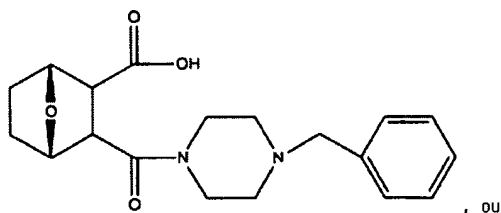
Em uma realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 102):



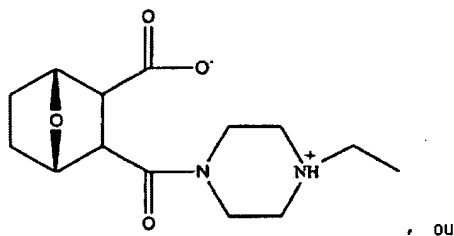
Em uma realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 101):

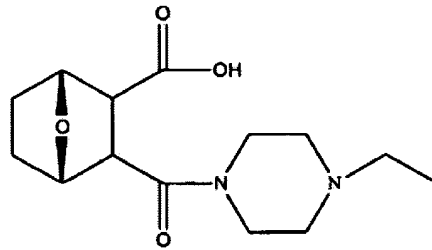


Em uma realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 103):

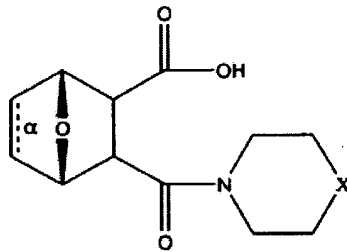


5 Em uma realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 105):





Em uma outra realização, a presente invenção fornece a estrutura:



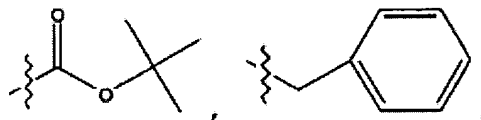
5

em que X é O, NR<sub>10</sub> ou NH<sup>+</sup>R<sub>10</sub>;

em que R<sub>9</sub> é alquila, alquenila, alquinila ou arila;

e

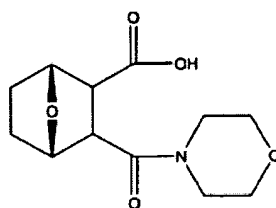
em que R<sub>10</sub> está presente ou ausente e, quando presente, é alquila, alquenila ou alquinila, cada um dos  
10 quais substituído ou não substituído;



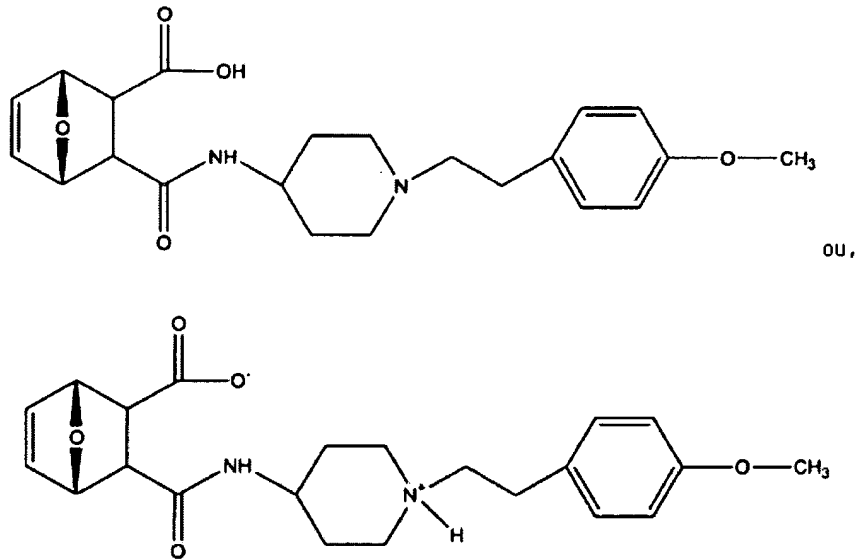
-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>R<sub>11</sub>, -CH<sub>2</sub>COR<sub>11</sub> ou -CH<sub>2</sub>CN, em que R<sub>11</sub> é H ou alquila.

Em uma outra realização da presente invenção, R<sub>10</sub> é  
15 ciclopropila.

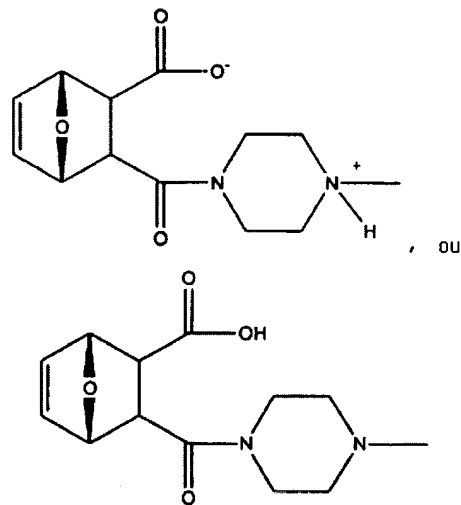
Em uma realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 111):



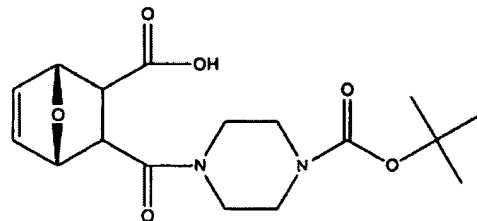
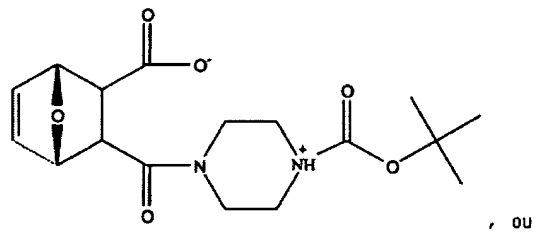
Em uma realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 104E):



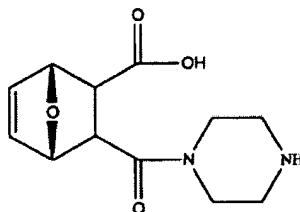
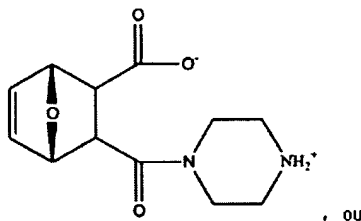
Em uma realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 100E):



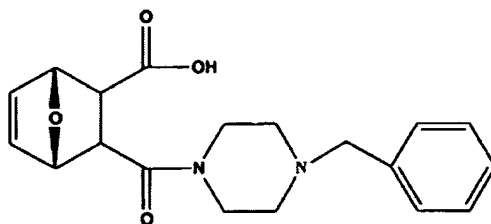
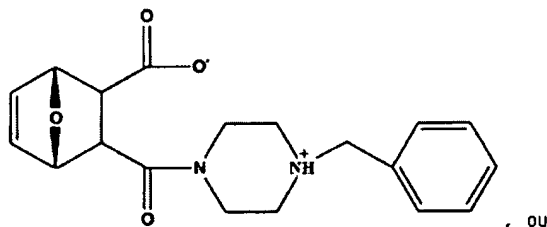
Em uma realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 102E):



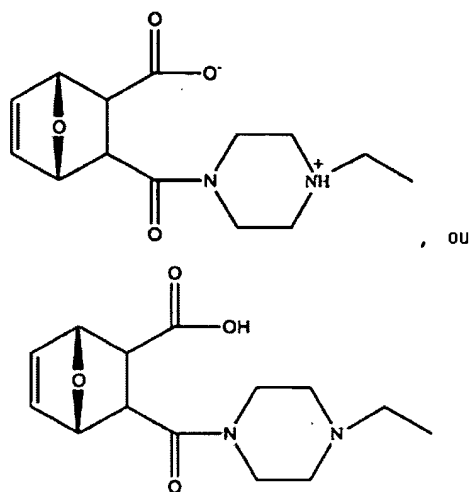
Em uma realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 101E):



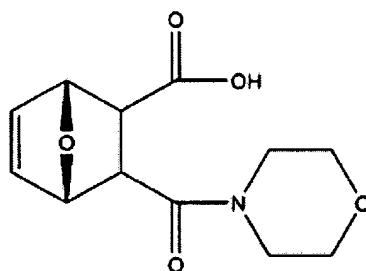
5 Em uma realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 103E):



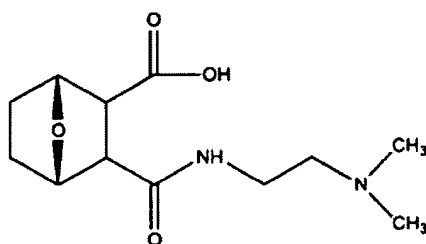
Em uma realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 105E):



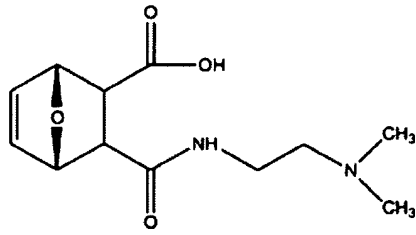
Em uma realização, a presente invenção fornece um  
5 composto que possui a estrutura (Composto 111E):



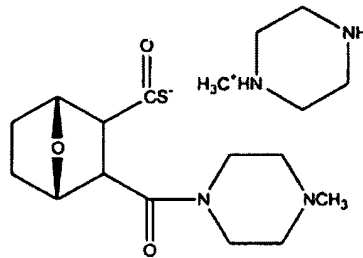
A presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 106):



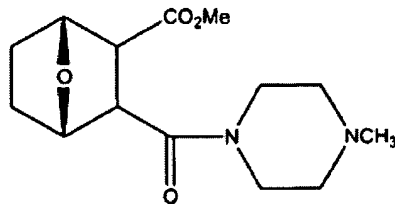
10 A presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 106E):



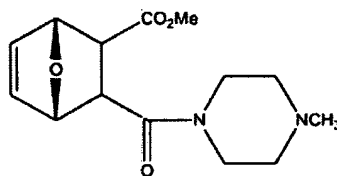
A presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 108):



5 A presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 107):

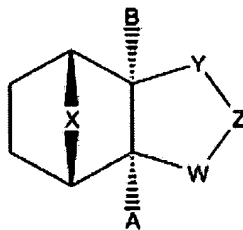


A presente invenção fornece um composto que possui a estrutura (Composto 107E):



10.

Em uma outra realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura:



em que A e B são, independentemente entre si, H, F, Cl, Br, SO<sub>2</sub>Ph, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, COR<sub>14</sub>, SR<sub>14</sub>, em que R<sub>14</sub> é H ou arila ou um alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído; X é O, NH ou S; Z é O, S, SR<sub>15</sub>, NH, NR<sub>15</sub>, CH<sub>2</sub>OH; 5 CH<sub>2</sub>OR<sub>15</sub> em que R<sub>15</sub> é arila ou um alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído; e Y e W são, independentemente entre si, CHOH CH<sub>2</sub>, C=S ou C=O, ou um sal do composto.

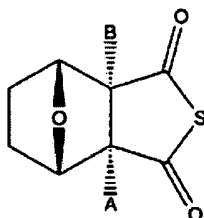
Em uma realização da presente invenção, Y e W são, 10 independentemente entre si, CH<sub>2</sub> ou C=S.

A presente invenção fornece ainda uma realização em que X é O; Z é S; e Y e W são, independentemente, C=S.

A presente invenção fornece ainda uma realização em que A e B são independentemente F.

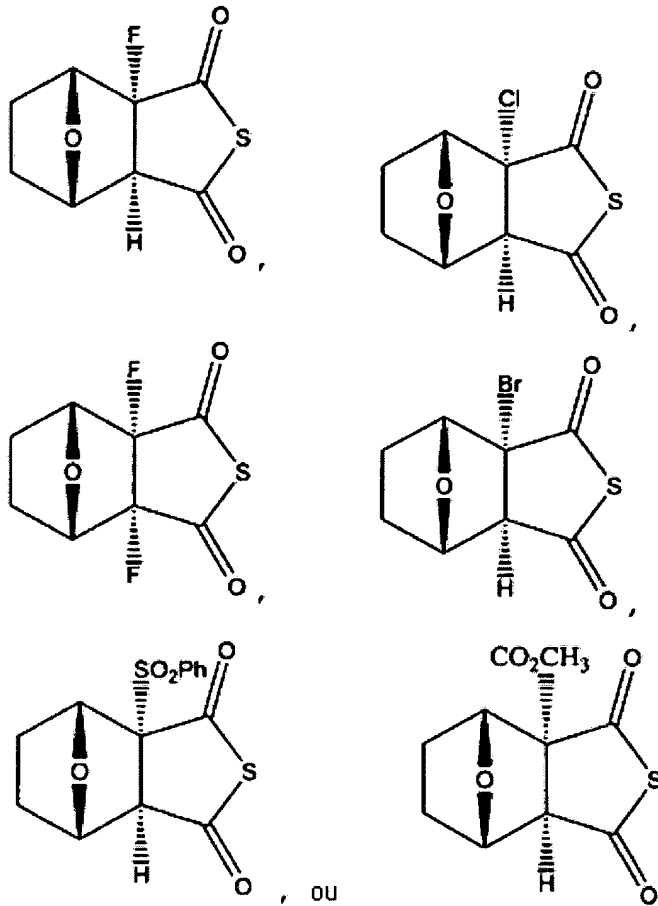
15 A presente invenção fornece ainda uma realização em que A é H; e B é F.

Em uma outra realização, a presente invenção fornece um composto que possui a estrutura:



20 em que A é F ou SR<sub>14</sub>, em que R<sub>14</sub> é arila ou um alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído; e B é F, Cl, Br, SO<sub>2</sub>Ph, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> ou SR<sub>14</sub>, em que R<sub>14</sub> é arila ou um alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído.

25 Em uma realização adicional, a presente invenção fornece as estruturas:



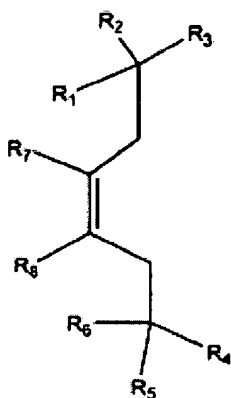
A presente invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende os compostos conforme a presente invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável.

A presente invenção também fornece um processo de elaboração de um composto que compreende a reação de um composto que possui a estrutura:

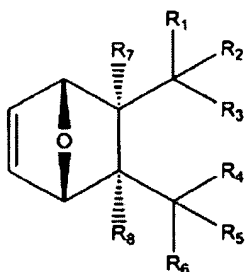


10

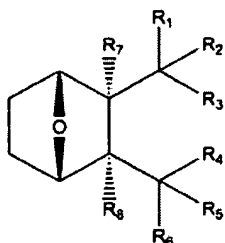
com um composto que possui a estrutura:



para formar um composto que possui a estrutura a seguir:



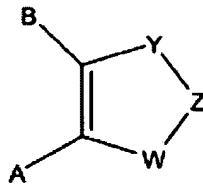
5 reação de um composto que possui a estrutura acima com hidrogênio na presença de um catalisador para formar:



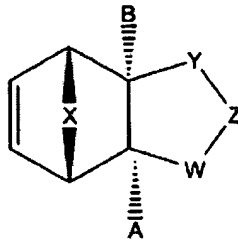
A presente invenção também fornece um processo de fabricação de um composto que compreende a reação de um  
10 composto que possui a estrutura:



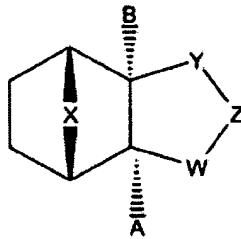
com um composto que possui a estrutura:



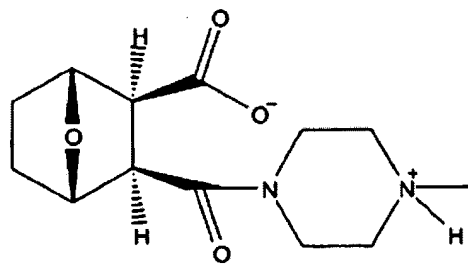
para formar um composto que possui a estrutura a seguir:



5 reação de um composto que possui a estrutura acima com hidrogênio na presença de um catalisador para formar:



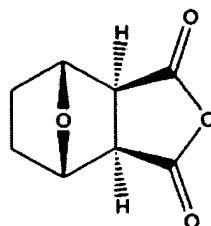
A presente invenção também fornece um processo de fabricação de um composto que possui a estrutura:



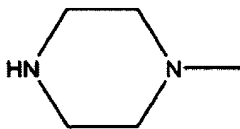
10

que compreende:

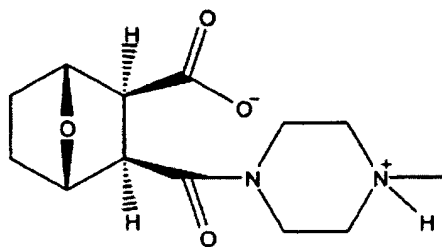
-dissolução de um composto que possui a estrutura a seguir:



em benzeno e adição de um composto que possui a estrutura:



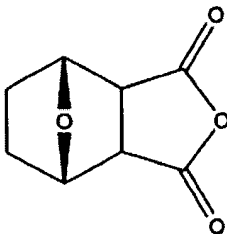
5 à temperatura ambiente para produzir um composto que possui a estrutura:



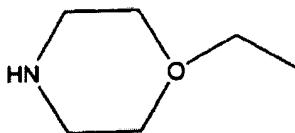
e recristalização do composto produzido a partir de um solvente quente.

A presente invenção também fornece um processo de fabricação de um composto que compreende:

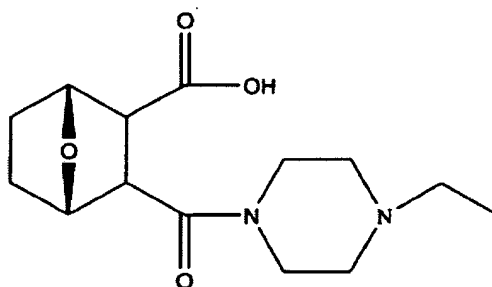
10 -dissolução de um composto que possui a estrutura a seguir:



15 em benzeno e adição de um composto que possui a estrutura:



à temperatura ambiente para produzir um composto que possui a estrutura:



recristalização do composto produzido a partir de um solvente quente.

Em uma realização, o solvente é dimetilformamida (DMF) ou etanol.

A presente invenção fornece um método de tratamento de um paciente que sofre de um tumor que sobre-expressa N-CoR que compreende a administração ao paciente de um ou mais dos compostos conforme a presente invenção, isoladamente ou em combinação com um ou mais ligantes receptores retinoides ou um ou mais ligantes de histona desacetilase, ou ambos, em cada caso em uma quantidade eficaz para o tratamento do paciente.

Em uma realização, o composto é selecionado a partir do Composto 100 e do Composto 105.

No método conforme a presente invenção, o ligante histona desacetilase pode ser um inibidor, tal como o inibidor histona desacetilase de HDAC-3 (histona desacetilase-3). O ligante histona desacetilase pode também ser selecionado a partir do grupo que consiste de 2-amino-8-oxo-9,10-epoxidecanoíla, 3-(4-aroil-1H-pirrol-2-il)-N-hidróxi-2-propenamida, Composto APHA 8, apicidina, butirato de arginina, ácido butírico, depsipeptídeo, depudecina, HDAC-3, bis-hidroxamida de ácido m-carboxicinâmico, N-(2-aminofenil)-4-[N-(piridin-3-ilmetoxicarbonil)aminometil]benzamida, MS 275, oxanfiatin, butirato de fenila, piroxamida, escriptaid, sirtinol, butirato de sódio, ácido subérico bis-hidroxâmico, ácido

suberoilânido hidroxâmico, tricostatina A, trapoxin A, trapoxin B e ácido valpróico.

Os compostos conforme a presente invenção podem ser utilizados em combinação com compostos que inibem a enzima histona desacetilase (HDAC). Essas enzimas HDAC modificam por meio de pós-tradução histonas (Patente Norte-Americana Publicada n° 2004/0197888, Armour et al). Histonas são grupos de proteínas que se associam com DNA em células eucarióticas para formar estruturas compactadas denominadas cromatina. Esta compactação permite a localização de uma enorme quantidade de DNA no interior do núcleo de uma célula eucariótica, mas a estrutura compacta de cromatina restringe o acesso de fatores de transcrição ao DNA. A acetilação das histonas reduz a compactação da cromatina, o que permite que fatores de transcrição unam-se ao DNA. Desacetilação, catalisada por histona desacetilases (HDACs), aumenta a compactação de cromatina, de forma a reduzir a acessibilidade do fator de transcrição a DNA. Inibidores de histona desacetilases evitam, portanto, a compactação de cromatina, permitindo que fatores de transcrição unam-se a DNA e aumentem a expressão dos genes.

Nos métodos conforme a presente invenção, uma determinação do percentual de células com N-CoR no citoplasma com relação ao percentual de células com N-CoR no núcleo é representativo da razão entre a quantidade de células não diferenciadas e a quantidade de células menos diferenciadas em um dado tecido.

No método conforme a presente invenção, os tumores que sobre-expressam N-CoR podem incluir glioblastoma multiforme, câncer de mama, câncer colo-retal, câncer do pulmão de células pequenas ou câncer do ovário.

A presente invenção também fornece um método de inibição do crescimento de um tumor que sobre-expressa N-CoR

em pacientes, que compreende a administração ao paciente de um ou mais dos compostos conforme a presente invenção, isoladamente ou em combinação com um ou mais ligantes receptores de retinóide, um ou mais ligantes de histona desacetilase ou ambos e, em cada caso, em quantidades eficazes para afetar N-CoR, de forma a induzir, com isso, a diferenciação de células do N-CoR que sobre-expressa tumores e inibir o crescimento do tumor no paciente.

Em uma realização, o composto é selecionado a partir do Composto 100 e do Composto 102.

Nos métodos conforme a presente invenção, uma determinação do percentual de células com N-CoR no citoplasma com relação ao percentual de células com N-CoR no núcleo é representativa da razão entre a quantidade de células mais diferenciadas e a razão de células menos diferenciadas em um dado tecido.

No método conforme a presente invenção, tumores que sobre-expressam N-CoR podem incluir glioblastoma multiforme, câncer de mama, câncer colo-retal, câncer do pulmão de células pequenas ou câncer do ovário.

A presente invenção contempla ainda um método de controle de vegetação indesejada que compreende o contato da vegetação ou seu ambiente com uma quantidade eficaz como herbicida dos compostos conforme a presente invenção.

A presente invenção contempla ainda um método de inibição da atividade de fosfatase de plantas que compreende o contato da planta ou seu ambiente com uma quantidade eficaz como herbicida dos compostos conforme a presente invenção.

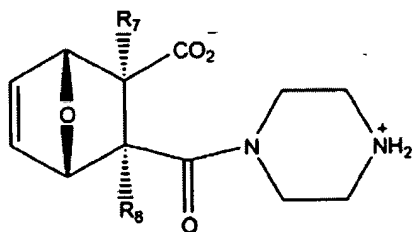
A presente invenção contempla ainda um método de prevenção ou tratamento de infecções fúngicas em um paciente que compreende a administração ao paciente de uma quantidade eficaz dos compostos conforme a presente invenção.

A presente invenção contempla ainda um método de tratamento de câncer em pacientes que compreende a administração ao paciente de uma quantidade eficaz dos compostos conforme a presente invenção.

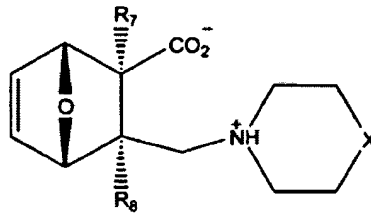
5 A presente invenção contempla ainda um método de tratamento de pacientes que sofrem de câncer de mama, câncer do cólon, câncer do pulmão de células grandes, adenocarcinoma do pulmão, câncer do pulmão de células pequenas, câncer do estômago, câncer do fígado, adenocarcinoma do ovário,  
 10 carcinoma do pâncreas, carcinoma da próstata, leucemia promielocítica, leucemia mielocítica crônica ou leucemia linfocítica aguda que compreende a administração ao paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz dos compostos conforme a presente invenção, de forma a tratar o paciente.

15 A presente invenção contempla ainda o uso de pró-drogas que são convertidas *in vivo* nos compostos conforme a presente invenção (vide, por exemplo, R. B. Silverman, 1992, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press, Capítulo 8, cujo conteúdo integral é  
 20 incorporado ao presente como referência). Essas pró-drogas podem ser utilizadas para alterar a biodistribuição (tal como para permitir compostos que tipicamente não entrariam em um local reativo) ou a farmacocinética do composto.

25 Em uma realização da presente invenção, o composto possui a estrutura:



Em uma realização da presente invenção, o composto possui a estrutura:



Da forma utilizada no presente, "zwitteríon" indica um composto que é eletricamente neutro, mas conduz cargas positivas e negativas formais sobre átomos diferentes. Zwitteríons são polares, possuem alta solubilidade em água e possuem baixa solubilidade na maior parte dos solventes orgânicos.

Aziridinas são compostos orgânicos que compartilham o grupo funcional aziridina que é um heterociclo com três membros com um grupo amina e dois grupos metileno. Precusores de intermediários aziridinila incluem compostos conhecidos dos técnicos no assunto que fornecem rapidamente intermediários de arizidinila sob condições apropriadas.

Os compostos descritos na presente invenção encontram-se em forma racêmica ou como enantiômeros individuais. Os enantiômeros podem ser separados utilizando métodos conhecidos, tais como os descritos, por exemplo, em *Pure and Applied Chemistry* 69, 1469-1474 (1997), IUPAC.

Da forma utilizada no presente, "sobre-expressão de N-CoR" indica que o nível de correpressor receptor nuclear (N-CoR) expresso nas células do tecido testado é elevado em comparação com os níveis de N-CoR conforme medido em células saudáveis normais do mesmo tipo de tecido sob condições análogas. O correpressor receptor nuclear (N-CoR) conforme a presente invenção pode ser qualquer molécula que se una ao domínio de união de ligantes do receptor de hormônio da tireóide unido por DNA (T<sub>3</sub>R) e receptor de ácido retinóico (RAR) (Patente Norte-Americana n° 6.949.624, Liu et al). Exemplos de tumores que sobre-expressam N-CoR podem incluir

glioblastoma multiforme, câncer de mama (Myers et al), câncer colo-retal (Giannini e Cavallini), carcinoma do pulmão de células pequenas (Waters et al) ou câncer do ovário (Havrilesky et al).

5. "Solvente", da forma utilizada no presente, destina-se a incluir compostos tais como hexanos, benzeno, tolueno, dietil éter, clorofórmio, cloreto de metileno, acetato de etila, 1,4-dioxano, água, THF, acetona, acetonitrila, DMF, DMSO, ácido acético, n-butanol, 10 isopropanol, n-propanol, etanol, metanol, ácido fórmico, tetracloreto de carbono, benzenotiol, clorobenzeno, ciclohexanotiol, 1-dietilaminoetanol, dicloreto de etileno, etileno glicol, xileno, 1,1,2,2-tetracloroetano, fenol, ácido acético, 1-butanol, 2-butanol, 2-butanona, diglima, dimetil 15 éter, dioxano, éter de petróleo, (NMP) N-metil-2-pirrolidinona, heptano, glicerina, HMPA (hexametilfósforo triamida), MTBE (metil t-butil éter), nitrometano, piridina, 1-propanol, 2-propanol e trietilamina.

Certas realizações dos compostos descritos podem 20 conter um grupo funcional básico, tal como amino ou alquilamino, e são, portanto, capazes de formar sais farmacologicamente aceitáveis com ácidos farmacologicamente aceitáveis ou conter um grupo funcional ácido e são, portanto, capazes de formar sais farmacologicamente aceitáveis 25 com bases. Os compostos do presente podem apresentar-se, portanto, em uma forma de sal. Da forma utilizada no presente, um "sal" é um sal dos compostos do presente que tenha sido modificado por meio da elaboração de sais de ácidos ou bases dos compostos. O sal pode ser 30 farmacologicamente aceitável. Exemplos de sais farmacologicamente aceitáveis incluem, mas sem limitar-se a sais de ácidos orgânicos ou minerais de resíduos básicos, tais como aminas; sais alcali ou orgânicos de resíduos

ácidos, tais como fenóis. Os sais podem ser elaborados utilizando um ácido orgânico ou inorgânico. Esses sais de ácidos são cloretos, brometos, sulfatos, nitratos, fosfatos, sulfonatos, formatos, tartaratos, maleatos, malatos, citratos, benzoatos, salicilatos, ascorbatos e similares. Sais de fenolato são os sais de metais alcalino-terrosos, sódio, potássio ou lítio. A expressão "sal farmacêuticamente aceitável", neste particular, indica os sais de adição de bases ou ácidos orgânicos e inorgânicos relativamente não tóxicos de compostos conforme a presente invenção. Esses sais podem ser preparados *in situ* durante o isolamento final e purificação dos compostos conforme a presente invenção, ou por meio de reação separada de um composto purificado conforme a presente invenção na sua forma de ácido livre ou de base livre com uma base ou ácido orgânico ou inorgânico apropriado e isolamento do sal formado desta maneira. Os sais representativos incluem os sais de bromidrato, cloridrato, sulfato, bissulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartarato, naftilato, mesilato, gluco-heptonato, lactobionato, laurilsulfonato e similares. Para uma descrição de possíveis sais, vide, por exemplo, Berge et al (1977), *Pharmaceutical Salts*, *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19.

Da forma utilizada no presente, "quantidade terapêuticamente eficaz" designa uma quantidade suficiente para tratar um paciente que sofre com uma doença (tal como tumores que sobre-expressam N-CoR) ou para aliviar um sintoma ou uma complicação associada à doença.

Da forma utilizada no presente, "eficaz como herbicida" indica uma quantidade suficiente para prejudicar o crescimento das plantas, particularmente por meio da inibição da atividade de fosfatase 2A da planta.

Da forma utilizada no presente, "tratamento" indica a redução da velocidade, suspensão ou reversão do progresso de uma doença, particularmente tumores que sobre-expressam N-CoR.

5 Da forma utilizada no presente, "alquila" destina-se a incluir grupos hidrocarbonetos alifáticos saturados de cadeia linear e ramificada que contêm o número especificado de átomos de carbono. Desta forma,  $C_1-C_n$  como em "alquila  $C_1-C_n$ " é definido como incluindo grupos que contêm 1, 2, ..., n-1  
10 ou n carbonos em uma disposição linear ou ramificada e, especificamente, inclui metila, etila, propila, butila, pentila, hexila e assim por diante. Uma realização pode ser alquila  $C_1-C_{12}$ . "Alcóxi" representa um grupo alquila conforme descrito acima ligado por meio de uma ponte de oxigênio.

15 O termo "alquenila" indica um radical hidrocarboneto não aromático, linear ou ramificado, que contém pelo menos uma união dupla carbono-carbono e até o número máximo possível de uniões duplas carbono-carbono não aromáticas pode estar presente. Desta forma, alquenila  $C_2-C_n$   
20 é definido como incluindo grupos que contêm 1, 2, ..., n-1 ou n carbonos. "Alquenila  $C_2-C_6$ ", por exemplo, indica um radical alquenila que contém dois, três, quatro, cinco ou seis átomos de carbono e pelo menos uma união dupla carbono-carbono e até, por exemplo, três uniões duplas carbono-carbono no caso  
25 de um alquenila  $C_6$ , respectivamente. Os grupos alquenila incluem etenila, propenila, butenila e ciclo-hexenila. Conforme descrito acima com relação a alquila, a parte linear, ramificada ou cíclica do grupo alquenila pode conter uniões duplas e pode ser substituída caso seja indicado um  
30 grupo alquenila substituído. Uma realização pode ser alquenila  $C_2-C_{12}$ .

O termo "alquinila" indica um radical hidrocarboneto linear ou ramificado, que contém pelo menos

uma união tripla carbono-carbono e até a quantidade máxima possível de uniões triplas carbono-carbono não aromáticas pode estar presente. Desta forma, alquinila  $C_2-C_n$  é definido como incluindo grupos que contêm 1, 2, ..., n-1 ou n carbonos.

5 "Alquinila  $C_2-C_6$ ", por exemplo, indica um radical alquinila que contém dois ou três átomos de carbono e uma união tripla carbono-carbono, ou que contém quatro ou cinco átomos de carbono e até duas uniões triplas carbono-carbono, ou que contém seis átomos de carbono e até três uniões triplas

10 carbono-carbono. Os grupos alquinila incluem etinila, propinila e butinila. Conforme descrito acima com relação a alquila, a parte linear ou ramificada do grupo alquinila pode conter uniões triplas e pode ser substituída caso seja indicado um grupo alquinila substituído. Uma realização pode

15 ser um alquinila  $C_2-C_n$ .

Da forma utilizada no presente, "arila" destina-se a indicar qualquer anel de carbono monocíclico ou bicíclico estável com até dez átomos em cada anel, em que pelo menos um anel é aromático. Exemplos desses elementos arila incluem

20 fenila, naftila, tetra-hidronaftila, indanila, bifenila, fenantrila, antrila ou acenaftila. Em casos em que o substituinte arila é bicíclico e um anel é não aromático, compreende-se que a ligação é realizada por meio do anel aromático. Os arilas substituídos incluídos na presente

25 invenção incluem substituição em qualquer posição apropriada com aminas, aminas substituídas, alquilaminas, hidróxis e alquil-hidróxis, em que a porção "alquila" das alquilaminas e alquil-hidróxis é um alquila  $C_2-C_n$  conforme definido acima. As aminas substituídas podem ser substituídas com grupos

30 alquila, alquenila, alquinila ou arila, conforme definido acima.

Os substituintes alquila, alquenila, alquinila e arila podem ser substituídos ou não substituídos, a menos que

definido especificamente em contrário. Alquila ( $C_1-C_6$ ) pode ser substituído, por exemplo, com um ou mais substituintes selecionados a partir de OH, oxo, halogênio, alcóxi, dialquilamino ou heterociclila, tal como morfolinila, piperidinila e assim por diante.

Nos compostos conforme a presente invenção, grupos alquila, alquenila e alquinila podem ser adicionalmente substituídos por meio da substituição de um ou mais átomos de hidrogênio por grupos não de hidrogênio descritos no presente até o máximo possível. Estes incluem, mas sem limitações, halo, hidróxi, mercapto, amino, carbóxi, ciano e carbamoíla.

O termo "substituído", da forma utilizada no presente, indica que uma dada estrutura possui um substituinte que pode ser um grupo alquila, alquenila ou arila, conforme definido acima. O termo deve ser considerado como incluindo diversos graus de substituição por um substituinte designado. Quando forem descritas ou reivindicadas diversas porções substituintes, o composto substituído pode ser substituído independentemente por uma ou mais das porções substituintes descritas ou reivindicadas, isoladamente ou em conjunto. Por independentemente substituído, indica-se que os (dois ou mais) substituintes podem ser idênticos ou diferentes.

Da forma utilizada no presente, "administração" de um agente pode ser realizada utilizando qualquer dos diversos métodos ou sistemas de fornecimento bem conhecidos dos técnicos no assunto. A administração pode ser realizada, por exemplo, por via parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intra-arterial, transdérmica, sublingual, intramuscular, retal, transbucal, intranasal, lipossômica, inalatória, vaginal, intraocular, por administração local, subcutânea, por via intra-adiposa, intra-articular, intratecal, em um

ventrículo cerebral, intraventricular, intratumoral, na parênquima cerebral ou intraparenquimal.

Os sistemas de administração a seguir, que empregam uma série de veículos farmacêuticos utilizados rotineiramente, podem ser utilizados, mas são apenas representativos dos diversos sistemas possíveis idealizados para administração de composições conforme a presente invenção.

Sistemas de fornecimento de drogas injetáveis incluem soluções, suspensões, géis, microesferas e injetáveis poliméricos e podem compreender excipientes tais como agentes de alteração da solubilidade (tais como etanol, propileno glicol e sacarose) e polímeros (tais como policaprilactonas e PLGAs).

Sistemas implantáveis incluem varas e discos e podem conter excipientes tais como PLGA e policaprilactona.

Sistemas de fornecimento oral incluem pastilhas e cápsulas. Estes podem conter excipientes tais como aglutinantes (por exemplo, hidroxipropilmetilcelulose, polivinil pirilodona, outros materiais celulósicos e amido), diluentes (tais como lactose e outros açúcares, amido, fosfato dicálcico e materiais celulósicos), agentes desintegrantes (tais como polímeros de amido e materiais celulósicos) e agentes lubrificantes (tais como estearatos e talco).

Sistemas de fornecimento transmucosa incluem emplastos, pastilhas, supositórios, pessários, géis e cremes e podem conter excipientes tais como solubilizantes e amplificadores (tais como propileno glicol, sais de bile e aminoácidos) e outros veículos (tais como polietileno glicol, ésteres de ácidos graxos e derivados e polímeros hidrofílicos, tais como hidroxipropilmetilcelulose e ácido hialurônico).

Sistemas de fornecimento dérmico incluem, por exemplo, géis aquosos e não aquosos, cremes, emulsões múltiplas, microemulsões, lipossomos, unguentos, soluções aquosas e não aquosas, loções, aerossóis, pós e bases de hidrocarboneto e podem conter excipientes tais como solubilizantes, amplificadores da permeação (tais como ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, álcoois graxos e aminoácidos) e polímeros hidrofílicos (tais como policarbofil e polivinilpirrolidona). Em uma realização, o veículo farmacêuticamente aceitável é um lipossomo ou um amplificador transdérmico.

Soluções, suspensões e pós para sistemas de fornecimento reconstituíveis incluem veículos tais como agentes formadores de suspensão (tais como gomas, zantanas, celulosas e açúcares), umectantes (tais como sorbitol), solubilizantes (tais como etanol, água, PEG e propileno glicol), tensoativos (tais como lauril sulfato de sódio, Spans, Tweens e cetil piridina), conservantes e antioxidantes (tais como parabens, vitaminas E e C e ácido ascórbico), agentes antiaglomeração, agentes de revestimento e agentes quelantes (tais como EDTA).

Compreende-se que substituintes e padrões de substituição sobre os compostos conforme a presente invenção podem ser selecionados por um técnico comum no assunto para fornecer compostos que sejam quimicamente estáveis e que possam ser facilmente sintetizados por meio de métodos conhecidos na técnica, bem como os métodos descritos abaixo, a partir de materiais de partida facilmente disponíveis. Caso um substituinte seja, por si próprio, substituído por mais de um grupo, compreende-se que esses diversos grupos podem estar sobre o mesmo carbono ou sobre carbonos diferentes, desde que resulte uma estrutura estável.

#### DISCUSSÃO

Descobrimos que uma proteína que possui maior expressão de glioblastoma multiforme (GBMs) em comparação com cérebro normal é correpressor receptor nuclear (N-CoR), um regulador do conjunto de células haste neurais normais. A  
5 expressão de N-CoR em GBM foi confirmada por meio de imunohistoquímica e Western Blot.

N-CoR é expresso no núcleo de células haste neurais (NSCs) (Hermanson et al (2002)). Após a fosforilação dependente de Akt1 quinase/fosfatidilinositol-3-OH quinase,  
10 N-CoR desloca-se para o citoplasma e gera diferenciação astrocítica de NSCs. A retenção nuclear de N-CoR é, portanto, essencial para a manutenção de NSCs no estado não diferenciado (Hermanson et al). De forma análoga a CD133+ NSC encontrado no interior do cérebro em desenvolvimento, células  
15 haste de tumores do cérebro (BTSC) que contêm CD133 foram identificadas em GBM (Uchida et al (2000); e Singh et al (2003)). BTSCs são capazes de proliferação, autorrenovação e diferenciação. BTSCs, mas não apenas células de tumores diferenciadas por CD133, são capazes de recapitular tumores  
20 mediante transplante de xenoenxerto (Singh et al (2004)).

Retinoides, metabólitos de vitamina A, foram examinados terapeuticamente em uma série de tumores, incluindo gliomas (Yung et al (1996)). N-CoR é intimamente associado ao receptor de retinoide e liberado mediante união  
25 de ligantes ao receptor (Bastien et al (2004)). Formulamos a hipótese de que um efeito de retinoides sobre gliomas malignos pode ser a indução de diferenciação por meio da união de retinoides ao receptor de retinoides, seguida por dissociação do complexo de receptor de retinoides e N-CoR e  
30 deslocamento de N-CoR para o citoplasma. Esta ideia explicaria a observação anterior de aumento da expressão de GFAP em uma linhagem de células de glioma (U343 MG-A) tratadas com retinoides (Rudka et al (1988)). Para testar

isso, direcionamos a dois locais diferentes, individual ou simultaneamente, dentro do processo de N-CoR por meio de tratamento da linhagem de células GBM U343 MG-A com 50  $\mu$ M de ácido retinóico (RA) e/ou 10 nM de ácido ocadaico (OA), um inibidor de fosfatase 1 de proteína e fosfatase 2A de proteína. Evitando-se a ação de fosfatase 1 de proteína e fosfatase 2A de proteína, ácido ocadaico aumenta a forma fosforilada de N-CoR e promove a sua deslocação citoplasmática subsequente (Hermanson et al (2002)).

10 A linhagem celular U343 MG-A é disponível por meio do Banco de Tecidos do Centro de Pesquisa de Tumores Cerebrais da Universidade da Califórnia em São Francisco (UCSF) (Universidade da Califórnia, São Francisco, Health Sciences West Building, San Francisco, Califórnia 94143-15 0520). Além disso, as linhagens de células U343 e U87 são disponíveis comercialmente por meio da EPO GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13092 Berlin-Buch, Alemanha.

Diversas moléculas que possuem atividade anti-PP2A sinergizam-se com ácidos retinóicos na inibição do crescimento de células de tumores que sobre-expressam N-CoR *in vitro*. O grupo mais eficaz de inibidores de fosfatase que se sinergizam com ácidos retinóicos e foram avaliados são análogos do antigo agente terapêutico, Mylabris, derivado dos corpos moídos do besouro da bolha, em que o principal agente ativo é cantaridina, conhecido como potente inibidor de PP2A (Wang, 1989; Peng et al, 2002).

Cantaridina possui atividade antitumorosa contra cânceres humanos do fígado (hepatomas) e do trato gastrointestinal superior, mas é tóxico para o trato urinário (Wang, 1989). Norcantaridina, uma cantaridina demetilada, mantém atividade antitumorosa de cantaridina contra hepatomas e cânceres do estômago e esôfago, mas possui pouca ou nenhuma toxicidade do trato urinário. Norcantaridina também estimula

a produção de glóbulos brancos do sangue em pacientes e camundongos, um fenômeno não compreendido mecanicamente, mas um efeito farmacológico de benefício potencial como um agente anticancerígeno (Wang et al, 1986; Wang, 1989).

5 A publicação de um relatório que cantaridina age como um inibidor da fosfatase de proteínas causou um interesse mais geral em compostos com este tipo de estrutura química (Li e Casida, 1992). Anteriormente, havia sido descoberto que o congênera mais simples e seu produto de  
10 hidrólise (disponível comercialmente como o herbicida Endothal) são hepatóxicos (Graziano e Casida, 1997). Os alvos primários no fígado aparentemente são as fosfatases de proteína PP2A e PP1, em que todos os compostos exibem valores ED<sub>50</sub> em nível micromolar. Estudos de união demonstraram que a  
15 ação de certos homólogos de cantaridina são diretos sobre PP2A e indiretos sobre PP1 (Honkanen et al, 1993; Li et al, 1993). Fosfatase PP1B é afetada apenas em níveis milimolares desses compostos, enquanto a enzima PP2C não é influenciada.

No passado, diversos análogos de cantaridina haviam  
20 sido sintetizados e avaliados para determinar a atividade antifosfatase e pela sua capacidade de inibir o crescimento de células cancerígenas em cultivo (Sakoff e McClusky, 2004; Hart et al, 2004). Algumas das moléculas de norcantaridina modificadas e avaliadas anteriormente inibiram o crescimento  
25 de diversas linhagens de células de tumores humanos. A atividade de análogos de norcantaridina contra células de tumores que sobre-expressam N-CoR ou a atividade de norcantaridinas combinada com outros potenciais agentes antitumores não foi analisada. Estudos adicionais incluíram  
30 dezesseis "norcantaridinas modificadas" avaliadas para determinar a atividade contra quatro linhagens de células de tumores humanos, que incluem ovário, rim, colo-retal e pulmão, bem como uma linhagem de leucemia de camundongo.

Nenhuma era tão ativa quanto agentes isolados tais como cantaridina ou norcantaridina e nenhuma foi avaliada para determinar a atividade em combinação com um outro agente antitumor (McCluskey et al, Pedido de Patente Norte-Americano Publicado n° 2006/0030616, 2006).

Uma série diferente de análogos de cantaridina havia sido sintetizada anteriormente e avaliada como pesticidas e para atividade antitumores contra linhagens de células de câncer. Quarenta e três análogos de Endothal e cantaridina foram desenvolvidos e tiveram determinada sua atividade como herbicidas e sua letalidade a camundongos (Matsuzawa et al, 1987). Demonstrou-se que tioanidrido Endothal é um herbicida mais potente que Endothal, mas foi tóxico para o fígado de camundongos (Matsuzawa et al, 1987; Kawamura et al, 1990).

Mais recentemente, descobriu-se que tioanidrido Endothal é um agente ativo contra PP2A e PP1 *in vivo* (Erdodi et al, 1995). Endothal e anidrido Endothal, como cantaridina, inibem a atividade de PP2A e, até certo ponto, a atividade de PP1 (Erdodi et al, 1995). No fígado, o alvo principal aparentemente é PP1. Em fibroblastas, apenas tioanidrido Endothal causou notáveis alterações morfológicas, ao contrário de cantaridina e Endothal (Erdodi et al, 1995). Acredita-se que a maior atividade de tioanidrido Endothal *in vivo* esteja relacionada com a sua maior lipofilicidade, o que resulta em aumento da difusão ao longo da plasmalema (Essers et al, 2001). Uma publicação mais recente descreveu a síntese dos análogos mono e difluor de Endothal e também os anidridos correspondentes, mas nenhum dado farmacológico acompanhou esse trabalho sintético (Essers et al, 2001).

Dos congêneres conhecidos deste tipo de composto, apenas o parental, cantaridina e seu derivado bis(normetila), norcantaridina, tiveram qualquer uso como substâncias de

drogas anticancerígenas e apenas norcantaridina é utilizada como agente antineoplástico (Tsauer et al, 1997).

Na pesquisa do desenvolvimento de novas substâncias de drogas nesta área, descobrimos que é essencial desenvolver  
5 inibidores que possuam maior especificidade, especialmente para as enzimas que exibam alta atividade contra os processos de reprodução de células de câncer. Alta especificidade também sustenta a possibilidade de evitar alvos importantes para a função celular normal. Do ponto de vista das  
10 características físicas de qualquer substância de droga recém desenvolvida, ela deve possuir predominantemente boa permeabilidade de membrana (ou seja, possui um valor log P de duas a quatro unidades).

Os compostos descritos no presente possuem um  
15 efeito antagonista sobre fosfatase 2A e fosfatase 1. Confirmamos que pelo menos os Compostos 100, 105 e 102 são eficazes na inibição do crescimento de células de tumores que sobre-expressam N-CoR. Os Compostos 100 e 105 são vantajosos sobre outros homólogos de cantaridina, pois eles existem na  
20 forma de zwitteríons, o que os torna hidrossolúveis e estáveis sob pH ácido, que são características desejáveis para drogas oralmente eficazes. O composto 102 é solúvel em lipídios, o que fornece maior capacidade que os Compostos 100 e 105 de cruzar a barreira entre o sangue e o cérebro. Isso é  
25 especialmente importante ao tratar-se tumores tais como glioblastoma multiforme.

O Composto 100, norcantaridina (nor-Can), Endothal (End) e tioanidrido Endothal (ET) foram avaliados para  
30 determinar a sua capacidade de inibir o crescimento de GBMs de forma dependente de dosagem *in vivo* conforme exibido na Figura 1.

A partir de plotagens gráficas da linhagem celular de glioblastoma multiforme GBM U373 (disponível por meio do

Instituto Nacional de Disfunções Neurológicas e Unidade de Patogênese Molecular de Apoplexia, Building 10, Room 5 D37, Institutos Nacionais de Saúde, 900 Rockville Pike, Bethesda, Maryland 20892) em função da exposição a diferentes doses da droga por sete dias, foi estimada a concentração de cada composto que inibiu a proliferação de células de tumores do cérebro em 50% (IC50). As IC50s expressas em micromolaridade ( $\mu\text{M}$ ) foram: 2,5, 3,0, 12,0 e 15,0 para tioanidrido Endothal, Composto 100, norcantaridina e Endothal, respectivamente, conforme exibido na Figura 1. Conforme exibido, em base molar, o Composto 100 foi um inibidor potente de GBMs *in vitro*.

Em combinação com antifosfatases, retinoides inibem sinergicamente a proliferação de glioblastoma multiforme. Afirma-se que a sinergia (potencialização) da atividade inibidora de duas drogas em combinação está presente quando o percentual de sobrevivência na presença de duas drogas é maior que a soma dos percentuais de sobrevivência das duas drogas utilizadas isoladamente nas mesmas doses na combinação.

A atividade inibidora do Composto 100 foi adicionalmente avaliada em combinação com retinoides, bem como individualmente. Conforme exibido na Figura 2, a combinação de Composto 100 com ácido retinóico totalmente trans (ATRA) demonstrou uma redução sinérgica do crescimento celular.

O percentual de sobrevivência esperado de células U373 expostas à combinação de ATRA e End é de 50% (77% por ATRA x 65% por End = 50%), enquanto a sobrevivência observada foi de 32%. O percentual esperado de sobrevivência na presença da combinação de ATRA e Composto 100 é de 60% (77% por ATRA x 78% por Composto 100 = 60%), enquanto a sobrevivência observada foi de 53%.

Para determinar se existe especificidade de tipo de tumor das propriedades inibidoras de inibidores de PP2A, ácido retinóico e tricostatina A, medimos os seus efeitos inibidores como agentes isolados contra a linhagem GBM U373, uma linhagem de câncer de mama, MCF-7 (obtida por meio de ATCC) e uma linhagem de células de câncer renal, UMRC (UMRC obtida por meio do Dr. Zhuang, NINDS, NIH do Programa de Suporte à Pesquisa Intramural, SAIC, Instituto Nacional do Câncer, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento do Câncer Frederick.

A linhagem de células de câncer dos rins, UMRC (Figura 3) foi menos sensível que a linhagem de tumor do cérebro, U373 (Figura 4), enquanto a linhagem de câncer de mama, MCF-7 (Figura 5) foi tão sensível quanto U373 a ácido retinóico totalmente trans, tioanidrido Endothal, norcantaridina, Endothal e tricostatina A. Existe alguma especificidade de tipo celular dessas drogas para GBMs. A atividade das drogas contra células MF-7 indica que os regimes que estão sendo desenvolvidos para o tratamento de tumores do cérebro provavelmente também são úteis contra câncer de mama e outros tumores que sobre-expressam N-CoR.

Demonstramos que o Composto 100 possuirá efeitos inibidores similares no tratamento de câncer de mama e outros tumores que sobre-expressam N-CoR devido às similaridades estruturais entre o Composto 100 e Endothal, bem como seus efeitos similares no tratamento de glioblastoma multiforme.

Endothal também é conhecido como um desfoliante ativo e potente herbicida de contato utilizado em muitas situações agrícolas. Ele é considerado eficaz como dissecante pré-colheita e como herbicida pré-emergência (Crafts, 1953).

Endothal, norcantaridinas e cantaridina são todos inibidores bem conhecidos de fosfatase de proteína de mamíferos, bem como potentes herbicidas (Matsuzawa et al,

1987). O mecanismo por meio do qual Endothal e outros homólogos exercem a sua potente atividade herbicida não foi estudado extensamente, apesar do uso disseminado de Endothal internacionalmente na agricultura. Dever-se-á observar que Endothal é hidrossolúvel, ao contrário de cantaridina e norcantaridina.

Considerou-se que a atividade de Endothal como herbicida de contato e desfoliante é relacionada à conhecida toxicidade irritante do seu composto parental, norcantaridina. Estudos mais recentes sugerem, entretanto, que a atividade herbicida de Endothal pode ser uma função principalmente da sua atividade anti-proteínas de plantas (PP2A). Li et al (1993) demonstraram que cantaridina e Endothal inibem PP2A e PP1 de folha de espinafre e inibem a ativação de nitrato reductase pela luz na folha de espinafre intacta, um processo mediado por PP2A. Smith et al (1994), demonstram que os inibidores de fosfatase de proteína não relacionados estruturalmente ácido ocadaico e caliculina A são potentes inibidores sob concentrações nanomolares do crescimento de certas plantas. A atividade de ácido ocadaico e caliculina A sugere fortemente que a atividade de Endothal como herbicida deve-se à sua atividade antifosfatase.

Baskin e Wilson (1997) exibiram inibidores de proteína serino-treonina fosfatases que incluem cantaridina, que inibe a organização de microtúbulos de plantas. Ayaydin et al (2000) demonstram que Endothal inibiu a atividade de PP2A, causando alteração da divisão celular em células de alfafa cultivadas. Eles observaram que Endothal era permeável às células.

Como Endothal, os Compostos 100 e 105 são hidrossolúveis. Mas, ao contrário de Endothal, que é um diácido, os Compostos 100 e 105 podem ser zwitteríons. O fato de que os compostos descritos no presente tais como o

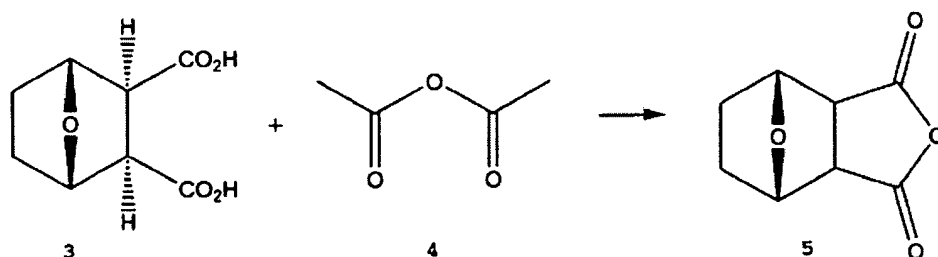
Composto 100 são mais potentes que Endothal contra o crescimento de células de câncer de mamíferos pode dever-se à maior permeabilidade celular dos zwitteríons com relação ao diácido. Os Compostos 100 e 105 são herbicidas mais potentes em base molar devido à melhor penetração celular. Os Compostos 100 e 105, como zwitteríons, também são menos tóxicos para distribuidores e aplicadores do herbicida, bem como para o público exposto inadvertidamente ao agente. Os Compostos 100 e 105 não possuem o caráter ácido de Endothal.

Os compostos do presente, incluindo os Compostos 100 e 105, são, portanto, herbicidas úteis, comercialmente viáveis e mais seguros com relação à exposição humana e ao meio ambiente.

#### DETALHES EXPERIMENTAIS

##### MÉTODOS E MATERIAIS

##### Preparação de anidrido Endothal

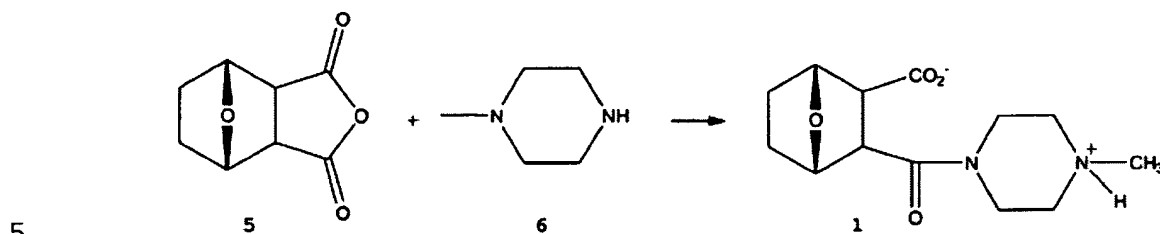


Esquema 1

Conforme exibido no Esquema 1, preparamos anidrido Endothal por meio da adição de anidrido acético (0,5 ml) (4) a uma suspensão de Endothal (186 mg) (3) em benzeno (3 ml) e a mistura foi agitada em seguida até que o sólido houvesse entrado em solução (duas horas). A solução foi aquecida a vácuo para remover o benzeno e o resíduo foi aquecido em seguida a 80 °C por trinta minutos. Adicionou-se em seguida éter de petróleo (5 ml) e o anidrido desejado cristalinizou-se espontaneamente. O produto foi removido por meio de filtragem e lavado com um pouco de éter de petróleo para

gerar o produto puro (85 mg) que foi utilizado imediatamente nas duas preparações a seguir.

Preparação de Endothal 4-metilpiperazina monoamida (EMPM) (Composto 100):



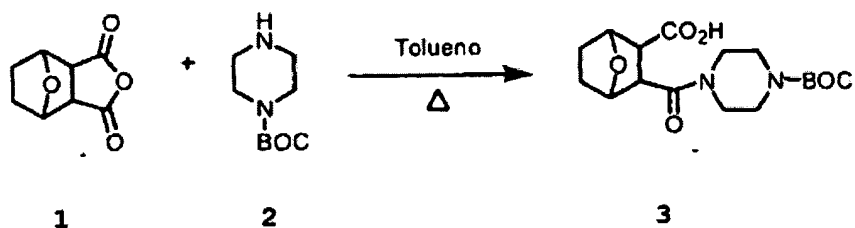
Esquema 2

Anidrido Endothal (85 mg) (5), preparado conforme descrito acima, foi dissolvido em benzeno (2 ml) e N-metilpiperazina (60 mg) (6) foi adicionada em uma parcela à temperatura ambiente. Quase imediatamente, surgiu um cristalino branco. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por uma noite e o produto foi removido em seguida por meio de filtragem, lavado com um pouco de benzeno e seco em seguida (145 mg). Um espectro de massa de íons negativos exibiu um íon parental a  $m/z$  267 (267 teóricos), que confirma o peso molecular de 268 unidades de massa. O produto foi recristalizado a partir de DMF quente para gerar 95 mg da monoamida pura, Composto 100 (1), ponto de fusão 226-227 °C, com alguma decomposição iniciando-se em 224 °C. O espectro de NMR  $^1\text{H}$  do sal de sódio do Composto 100 confirma a estrutura. Sal de sódio. NMR  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 1,41-1,70 (m, 4H), 2,18 (s, 3H), 2,21-2,55 (m, 4H), 2,92 (d, 1H), 3,17 (d, 1H), 3,22-3,40 (m, 2H), 3,45 (m, 2H), 4,60 (q, 1H), 4,78 (q, 1H). Os dados de espectrometria de massa que medem a razão entre massa e carga do Composto 100 exibiram picos a 141  $m/z$ , 167  $m/z$ , 254  $m/z$ , 199  $m/z$  e 185  $m/z$ , correspondentes a fragmentos com carga negativa (Tabela 1).

Preparação de Endothal 4-etilpiperazina monoamida (EPEM) (Composto 105):

Anidrido Endothal (1,68 g, 10 mmol) e N-etilpiperazina (3,42 g, 30 mmol) foram adicionados a 10 ml de tolueno e aquecidos sob refluxo por dezoito horas. O solvente foi evaporado em seguida sob pressão reduzida e o resíduo foi cristalizado a partir de metil t-butil éter para gerar o produto bruto (1,8 g). Recristalização a partir do mesmo solvente gerou um total de 1,2 g (rendimento de 42,5%) em duas safras. Ponto de fusão 215-218 °C (com decomposição). O NMR <sup>1</sup>H do sal de sódio em D<sub>2</sub>O e o espectro de íons negativos MS confirmam a estrutura e o peso molecular (m/z 282,2 amu), respectivamente. Sal de sódio. NMR <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O): 0,95 (t, 3H), 1,42-1,65 (m, 4H), 2,20-2,42 (m, 4H), 2,43-2,55 (m, 2H), 2,93 (d, 1H), 3,08 (d, 1H), 3,20-3,33 (m, 2H), 3,42-3,58 (m, 2H), 4,45 (q, 1H), 4,75 (q, 1H). O espectro de MS indica a presença do dímero de associação em m/z 563,3 amu, que poderia ser esperado para um zwitterion. Além disso, um traço de Endothal (MS m/z 185 amu) está presente, mas não é evidente no espectro de NMR. Um espectro de massa de íons negativos exibiu um íon parental a 282,2 m/z (282,2 teórico), o que confirma o peso molecular como 282,2 unidades de massa.

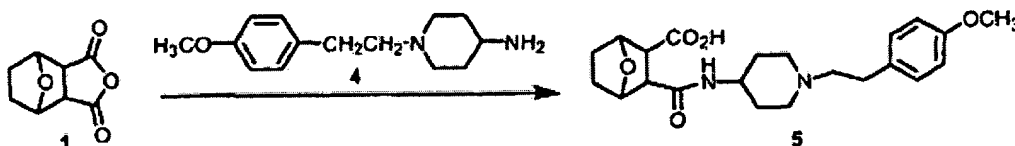
Preparação de terc-butil éster de ácido 4-(3-carbóxi-7-oxa-biciclo[2.2.1]heptano-2-carbonil)piperazino-1-carboxílico (Composto 102):



Anidrido Endothal (1) (500 mg, 3 mmol) e N-BOC piperazina (2) (1,86 g, 10 mol) foram adicionados a tolueno seco (8 ml) e aquecidos a 100-110 °C por oito horas. O solvente foi removido em um evaporador giratório e adicionou-se ao resíduo uma mistura de ácido cítrico aquoso a 10% (20

ml) e acetato de etila (20 ml). O sólido separado (Composto 102) (3) foi filtrado, lavado com hexano e seco a vácuo. Rendimento, 500 mg (47%), ponto de fusão 206-208 °C. O espectro de massa e os dados de NMR  $^1\text{H}$  confirmaram a  
 5 identidade do Composto 102. Dados de espectrometria de massa que medem a razão entre massa e carga do Composto 102 exibiram picos a 141,1 m/z, 185 m/z e 354 m/z. NMR  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 1,42 (s, 9H), 1,45-1,72 (m, 4H), 3,02-3,15 (d, 1H), 3,20-3,55 (m, 9H), 4,65-4,70 (m, 2H).

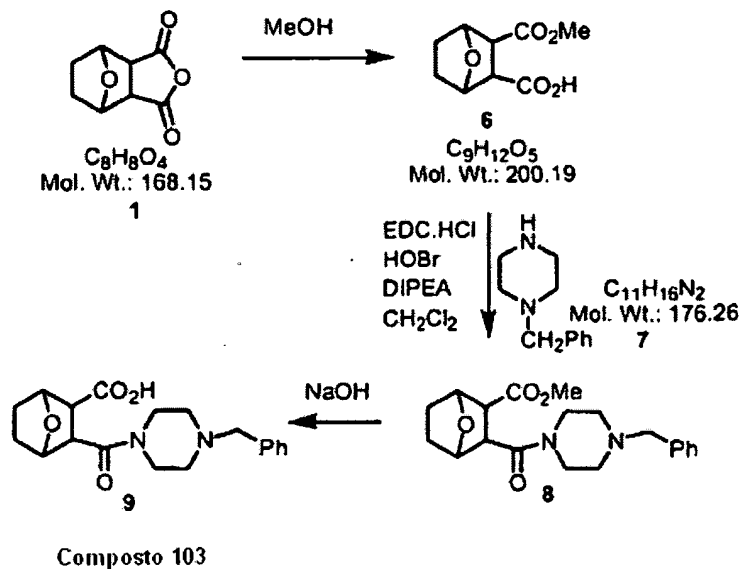
10                   Preparação de ácido 3-{1-[2-(4-metoxifenil)-etil]piperidin-4-ilcarbamoil}-7-oxabicyclo[2.2.1]-heptano-2-carboxílico (Composto 104):



Anidrido Endothal (1) (500 mg, 3 mmol) e amina (4)  
 15 (2,34 g, 10 mmol) foram adicionados a tolueno seco (8 ml) e aquecidos a 100 °C por vinte horas. O solvente foi evaporado em seguida sob pressão reduzida, o resíduo foi absorvido em água e a solução foi acidificada até pH 5,5 a 6 com HCl diluído. O sólido foi filtrado e recristalizado a partir de  
 20 metanol para gerar (5) puro (Composto 104). Rendimento, 450 mg (36%). Ponto de fusão: 140-142 °C. O espectro de massa e os dados de NMR  $^1\text{H}$  confirmaram a identidade do Composto 104. Dados de espectrometria de massa que medem a razão entre  
 massa e carga do Composto 104 exibiram picos em 385. NMR  $^1\text{H}$   
 25 (CDCl $_3$ ): 1,48-1,65 (m, 4H), 1,78-1,95 (m, 2H), 1,98-2,15 (t, 2H), 2,40-2,60 (m, 4H), 2,68-2,78 (m, 2H), 2,80 (s, 2H), 3,02-3,15 (d, 2H), 3,78 (s, 3H), 3,82-3,98 (m, 1H), 4,82-4,88 (m, 2H), 6,78-6,82 (d, 2H), 7,09-7,12 (d, 2H).

30                   Preparação de ácido 3-(4-benzilpiperazino-1-carbonil)-7-oxabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico (Composto

103): este composto foi preparado em três etapas a partir de anidrido Endothal (1) conforme exibido abaixo no Esquema 1.



Esquema 1

5 Etapa 1: preparação de monometil éster de ácido 7-oxabicyclo[2.2.1]heptano-2,3-dicarboxílico:

Anidrido Endothal (1) (4 g, 24 mmol) foi aquecido sob refluxo em metanol seco (20 ml) por três horas. A mistura de reação foi resfriada à temperatura ambiente e o sólido separado (6) foi filtrado e cristalizado a partir de metanol. 10  
Rendimento: 4,6 g (96%). Ponto de fusão: 114-146 °C.

Etapa 2: preparação de metil éster de ácido 3-(4-benzilpiperazino-1-carbonil)-7-oxabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico (8):

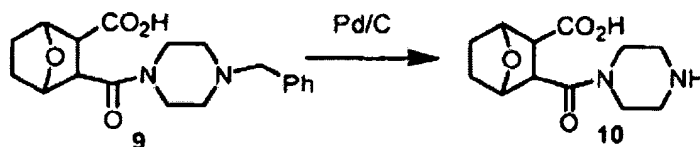
15 À mistura de derivado ácido (6) (2,6 g, 13 mmol) em cloreto de metileno (40 ml), adicionou-se EDC.HCl (2,75 g, 15 mmol) seguido por HOBT (150 mg). A mistura foi agitada por dez minutos à temperatura ambiente antes da adição de N-benzil piperazina (7) (1,76 g) seguida por DIPEA (3,5 ml, 20  
20 mmol). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por uma noite. Adicionou-se água à mistura de reação, a camada de cloreto de metileno foi separada, lavada uma vez com NaHCO<sub>3</sub> aquoso, seca em seguida sobre NaSO<sub>4</sub>, filtrada e

concentrada. O resíduo bruto foi purificado por meio de cromatografia de coluna utilizando 1 a 2% de metanol em cloreto de metileno como eluente para gerar o material puro necessário (8). Rendimento: 2,7 g (58%).

5 Etapa 3: preparação de ácido 3-(4-benzilpiperazino-1-carbonil)-7-oxabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico (Composto 103):

A uma solução de éster (8) (2,50 g, 7 mmol) em metanol (20 ml), adicionou-se NaOH aquoso (360 mg dissolvidos  
10 em 5 ml de água) e agitou-se à temperatura ambiente. O solvente foi evaporado em seguida até secar, adicionou-se água (20 ml) e o pH da solução foi ajustado em seguida até pH 5 utilizando 6 N HCl. Ele foi evaporado até secar em seguida e adicionou-se cloreto de metileno (30 ml). O NaCl sólido  
15 residual foi removido por meio de filtração e o filtrado foi concentrado. O sólido resultante foi triturado com isopropil éter para gerar o ácido puro (9) (Composto 103). Rendimento: 1,8 g (75%). Ponto de fusão > 190 °C (dec). O espectro de massa e os dados de NMR <sup>1</sup>H confirmaram a identidade do  
20 Composto 103. NMR <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 1,45-1,84 (m, 4H), 2,45-2,68 (m, 2H), 2,75-2,95 (m, 2H), 3,12-3,35 (m, 2H), 3,38-3,55 (m, 2H), 3,60-3,80 (m, 2H), 3,95-4,20 (m, 2H), 4,75-4,85 (m, 2H), 7,40 (s, 5H). Dados de espectrometria de massa que medem a razão entre massa e carga de composto 103 exibiram picos a  
25 177,2 m/z, 345 m/z e 711 m/z.

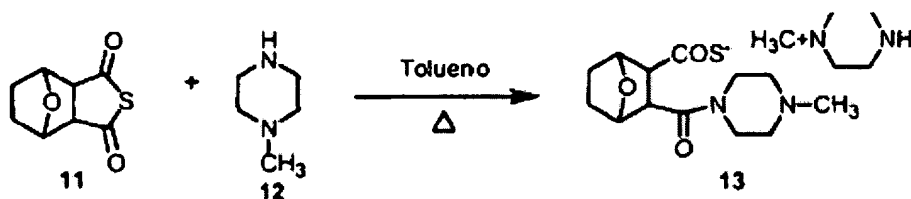
Preparação de ácido 3-(piperazino-1-carbonil)-7-oxabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico (Composto 101):



O derivado ácido N-benzil protegido (9) (500 mg,  
30 1,45 mmol) em metanol foi hidrogenado utilizando balão de

hidrogênio sobre um catalisador Pd/C (5%, 50 mg) à temperatura ambiente por uma noite. A mistura de reação foi filtrada a partir dos catalisadores e concentrada até secar. O resíduo bruto foi cristalizado a partir de 2-proponal para gerar amina (10) (Composto 101) na forma de sólido branco puro. Rendimento: 215 mg (58%), ponto de fusão > 240 °C (dec). O espectro de massa e os dados de NMR <sup>1</sup>H confirmaram a identidade do Composto 101. NMR <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD): 1,42-1,78 (m, 4H), 2,92-3,15 (m, 8H), 3,52-3,82 (m, 2H), 4,58 (q, 1H), 4,78 (q, 1H). Dados de espectrometria de massa que medem a razão entre massa e carga do Composto 101 exibiram picos a 177,2 m/z, 255,2 m/z, 277,2 m/z e 318,2 m/z.

Preparação de sal de ácido 3-(piperazino-1-carbonil)-7-oxabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico de N-metil piperazina (Composto 108):



Tioanidrido Endothal (11) (552 mg, 3 mmol) e N-metil piperazina (12) (1 g, 10 mmol) foram adicionados a tolueno seco (10 ml) e aquecidos sob refluxo por duas horas e meia. A mistura de reação foi resfriada à temperatura ambiente e o sólido que havia se separado foi filtrado e cristalizado a partir de cloreto de metileno e acetato de etila para gerar (13) necessário puro (Composto 108). Rendimento: 585 mg (51%), ponto de fusão > 180 °C (dec). O espectro de massa e os dados de NMR <sup>1</sup>H confirmaram a identidade do Composto 108. NMR <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 1,52-1,56 (m, 2H), 1,82-1,85 (m, 2H), 2,27 (s, 3H), 2,28-2,42 (m, 11H), 3,01 (s, 3H), 3,28-3,36 (m, 2H), 3,42-3,49 (m, 4H), 3,60-3,78 (m, 2H), 4,89-4,91 (m, 2H). Dados de espectrometria de massa

que medem a razão entre massa e carga do Composto 108 exibiram picos a 217 m/z, 251 m/z e 351 m/z.

Preparação de metil éster de ácido 3-(4-metilpiperazino-1-carbonil)-7-oxabicyclo[2.2.1]2-carboxílico  
5 (Composto 107):



A uma suspensão de derivado ácido (14) (536 mg, 2 mmol) em cloreto de metileno, adicionou-se cloreto de tionila (0,5 ml) seguido por duas gotas de DMF. A mistura de reação  
10 foi agitada à temperatura ambiente por uma noite. Foi uma suspensão de sal de cloridrato cloreto ácido. Adicionou-se metanol seco (10 ml), agitou-se por trinta minutos e evaporou-se até secar utilizando evaporador giratório. Ao resíduo, adicionou-se água (20 ml) e extraiu-se com acetato  
15 de etila (20 ml). O pH da camada aquosa foi ajustado em 4,5 utilizando NaHCO<sub>3</sub> (10%) e evaporado até secar. O resíduo foi transformado em azeotropo com acetonitrila. Ele foi novamente dissolvido em acetonitrila e o NaCl separado foi removido por meio de filtragem. O filtrado foi evaporado até secar e  
20 triturado com acetato de etila para gerar um sólido pegajoso, que foi seco em um forno a vácuo para obter o composto desejado na forma de sólido incolor (15) (Composto 107).  
Rendimento: 140 mg (25%, ponto de fusão 105-107 °C). Os dados de NMR <sup>1</sup>H foram compatíveis com o espectro esperado para o  
25 Composto 107. NMR <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O): 1,49-1,53 (m, 2H), 1,60-1,64 (m, 2H), 2,8 (s, 3H), 2,96-3,36 (m, 10H), 3,52 (s, 3H), 4,84-4,86 (m, 2H). Dados de espectrometria de massa que medem a razão entre massa e carga do Composto 107 exibiram picos a 123 m/z, 183 m/z, 251 m/z e 283 m/z.

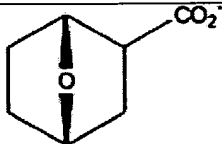
Preparação de 1-{N-(3-exocarboxi-7-oxabicyclo [2.2.1]heptano-2-exocarbonil) amino-2-(*N,N*-dimetil) aminoetano (Composto 106).

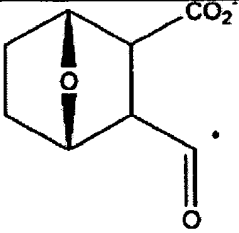
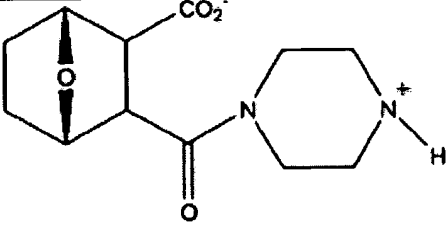
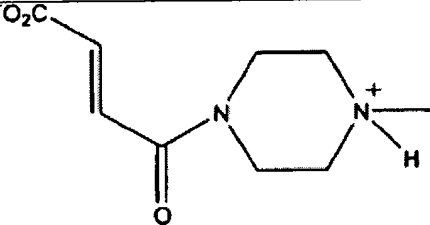
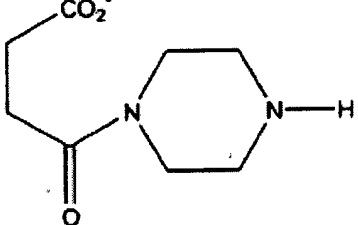
Anidrido Endothal (1,68 g, 10 mmol) e unsim-*N,N*-  
 5 dimetiletileno diamina (2,64 g, 30 mmol) foram adicionados a tolueno (10 ml) e aquecidos sob refluxo por duas horas. O solvente foi removido em seguida por meio de evaporação sob pressão reduzida e o resíduo foi triturado com um pouco de di-isopropil éter para causar cristalização. O produto foi  
 10 recristalizado duas vezes em seguida a partir de hexano por meio de resfriamento a -20 °C. O produto puro (1,9 g; rendimento de 74%) fundiu-se a 48-50 °C. O espectro de NMR <sup>1</sup>H encontra-se em perfeito acordo com a estrutura que é zwitteriônica e sofre uma substituição de dois prótons quando  
 15 tratado com D<sub>2</sub>O. O espectro de massa também confirmou a identidade do Composto 106. NMR <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 1,62-1,75 (m, 2H), 1,85-1,95 (m, 2H), 2,2 (s, 6H), 2,45 (t, 2H), 2,92 (s, 2H), 3,60 (t, 2H), 4,85-4,95 (m, 2H). Dados de espectrometria de massa que medem a razão entre massa e carga do Composto  
 20 106 exibiram picos a 239,2 m/z, 257 m/z e 513 m/z.

#### ESPECTROMETRIA DE MASSA:

A Tabela 1 demonstra a correlação entre a razão entre massa e carga dos íons e as estruturas correspondentes. Uma amostra do composto 100 foi ionizada no espectrômetro de  
 25 massa. Íons com massas diferentes foram separados e a sua abundância relativa foi medida.

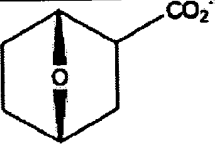
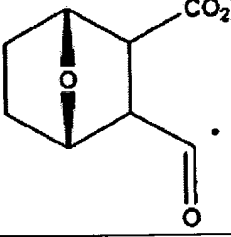
Tabela 1: Relação Entre Massa e Carga de Íons

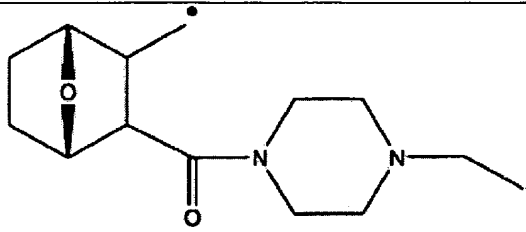
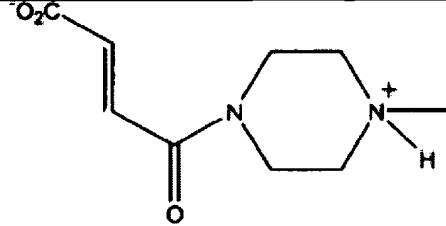
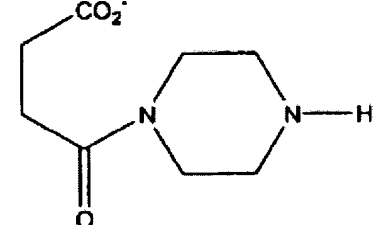
Razão entre massa e carga (m/z)	Estrutura teórica de íons
141	

167	
254	
199	
185	

A Tabela 2 exibe a correlação entre a razão entre massa e carga dos íons e estruturas correspondentes. Uma amostra do Composto 105 foi ionizada no espectrômetro de massa. Íons com massas diferentes foram separados e foi medida a sua abundância relativa.

Tabela 2: Relação Entre Massa e Carga de Íons

Razão entre massa e carga (m/z)	Estrutura teórica de íons
141	
167	

249	
199	
185	

EXEMPLO 1: EFEITO DO COMPOSTO 100 E ANÁLOGOS

RELACIONADOS SOBRE CÉLULAS GBM

Para identificar alvos terapêuticos inovadores para o tratamento de glioblastoma multiforme (GBM), análogos de cantaridina foram avaliados para determinar a sua capacidade de inibição do crescimento de células de glioblastoma multiforme. Especificamente, a linhagem de células GBM U373 foi utilizada nas avaliações.

Os homólogos de cantaridina que foram avaliados foram norcantaridina (nor-Can), que é uma bis(normetil) cantaridina; Endothal (End), que é um derivado de ácido dicarboxílico de norcantaridinas; tioanidrido Endothal (ET); e Compostos 100 e 105, preparados conforme descrito acima.

As células foram colocadas em placas em três cópias no dia 1 com e sem quantidades diferentes de cada droga dissolvidas em meios (Composto 100, Composto 105 e Endothal) ou em sulfóxido de dimetila (tioanidrido Endothal e norcantaridina). O número total de células é contado nos cultivos em três cópias em cada dose e em controles após sete

dias e determina-se o número médio de células e o desvio padrão.

A quantidade de inibição do crescimento de células GMB é expressa como a proporção do número de células nas placas experimentais em comparação com o número de células em placas controle que contêm apenas o veículo da droga e o meio de cultivo. O percentual médio de controle é plotado e inserido entre parênteses por um desvio padrão calculado a partir das medições em três cópias.

10

#### RESULTADOS

Cada um dos análogos de norcantaridina inibiu o crescimento de GMBs de forma dependente de dosagem *in vivo*, conforme exibido na Figura 1.

15

A partir das plotagens de gráficos da linhagem de células GBM U373 em função da exposição a diferentes doses de droga por sete dias, foi estimada a concentração de cada composto que inibiu a proliferação de células de tumor do cérebro em 50% (IC50). As IC50s expressas em micromolaridade ( $\mu\text{M}$ ) foram: 2,5, 3,0, 12,0 e 15,0 para tioanidrido endothal, Composto 100, norcantaridina e endothal, respectivamente, conforme observado na Figura 1.

20

25

Além disso, curvas logarítmicas da linhagem de células de glioma U373 tratadas com diferentes doses de Composto 105 por três (Figura 6) e sete dias (Figura 7) indicam que o aumento das dosagens demonstra uma inibição maior do crescimento. Além disso, a Figura 8 é uma curva de reação à dosagem para o Composto 105 contra o cultivo de células de GBM humanas ao longo de sete dias em diversas concentrações do Composto 105. Dever-se-á observar que o Composto 100 foi incluído em uma única concentração de 10  $\mu\text{M}$  e que, nessa concentração, os dois compostos possuem valores inibidores idênticos.

30

EXEMPLO 2: EFEITO DO COMPOSTO 100 COMBINADO COM  
ÁCIDO RETINÓICO

Para identificar o efeito de combinações de antifosfatases PP2A e retinoides que afetam complexos nucleares, concentramo-nos em derivados de cantaridina hidrossolúveis que se demonstrou serem ativos contra GBMs humanos *in vitro*, Endothal e Composto 100.

Para observar os efeitos do Composto 100 em combinação com ácidos retinóicos, o Composto 100 foi combinado com ácido retinóico totalmente trans.

As células foram colocadas em placas em três cópias no dia 1 com e sem quantidades diferentes de cada droga dissolvidas em meios (Composto 100 e Endothal). O número total de células é contado nos cultivos em três cópias em cada dose e nos controles após sete dias e é determinado o número médio de células e o desvio padrão.

A quantidade de inibição do crescimento de células GBM é expressa na forma de proporção entre o número de células nas placas experimentais em comparação com o número de células em placas controle que contêm apenas o veículo de droga e o meio de cultivo. O percentual médio de controle é plotado e inserido entre parênteses por um desvio padrão calculado a partir das medições em três cópias.

RESULTADOS

A Figura 2 demonstra que o Composto 100, bem como Endothal, cada qual em combinação com ATRA, inibiram sinergicamente a proliferação da linhagem de células GBM U373. Afirma-se que a sinergia (potencialização) da atividade inibidora de duas drogas em combinação está presente quando o percentual de sobrevivência na presença de duas drogas for menor que o produto dos percentuais de sobrevivência das duas drogas utilizadas isoladamente nas mesmas doses em combinação. A extensão da sinergia do Composto 100 e Endothal

(end) em combinação com ATRA é quantificada abaixo na Tabela 3.

Tabela 3: Endothal e Composto 100 +/- Inibição de ATRA de células U373

	Percentual de controle	
	Observado	Esperado se aditivo
ATRA 25 $\mu$ M	77%	-
END 10 $\mu$ M	65%	-
ATRA 25 $\mu$ M + END 10 $\mu$ M	32%	50%
Composto 100 1 $\mu$ M	78%	-
ATRA 25 $\mu$ M + Composto 100 1 $\mu$ M	53%	60%

5 O percentual esperado de sobrevivência de células U373 expostas à combinação de ATRA e Composto 1 foi de 60% (77% por ATRA x 78% por Composto 100 = 60%), enquanto a sobrevivência observada foi de 53%. O percentual esperado de sobrevivência na presença da combinação de ATRA e End foi de 10 50% (77% por ATRA x 65% por End = 50%), enquanto a sobrevivência esperada foi de 32%.

O Composto 100, quando combinado com Tricostatina A ou quando combinado com ácido 13-cis retinóico, inibiu sinergicamente o crescimento de linhagem de células GBM U373 15 conforme exibido abaixo na Tabela 4.

Tabela 4: Composto 100 +/- Ácido 13-Cis Retinóico (CIS-RA) e Composto 1 +/- Tricostatina A (TSA) na Inibição de Linhagem de Células GBM U373

	Percentual de controle	
	Observado	Esperado se aditivo
Cis-RA 50 $\mu$ M	93,3 +/- 2,2	
TSA 0,033 $\mu$ M (0,01 $\mu$ g/ml)	71,6 +/- 0,4	
Composto 100 - 1 $\mu$ M	97,9 +/- 1,0	
Composto 100 - 5 $\mu$ M	52,5 +/- 2,9	
Cis-RA 50 $\mu$ M + Composto 100 - 1 $\mu$ M	79,3 +/- 3,2	91,3
Cis-RA 50 $\mu$ M + Composto 100 - 5 $\mu$ M	31,6 +/- 2,0	49,0
TSA 0,033 $\mu$ M + Composto 100 - 1 $\mu$ M	65,7 +/- 2,0	70,1
TSA 0,033 $\mu$ M + Composto 100 - 5 $\mu$ M	13,9 +/- 1,0	37,6

20 As duas drogas foram sinérgicas na sua inibição do crescimento de células U373. O percentual de sobrevivência das células após a exposição às duas drogas em combinação foi menor que o que seria esperado do percentual de sobrevivência

das células quando expostas a cada uma das duas drogas às mesmas dosagens utilizadas na combinação.

EXEMPLO 3: DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE TIPOS DE TUMORES

5. Para determinar se existe especificidade de tipo de tumores das propriedades inibidoras de análogos de Composto 100, ácido retinóico e Tricostatina A, medimos os seus efeitos inibidores como agentes isolados contra a linha GBM U373, uma linhagem de câncer de mama, MCF-7 (obtida por meio da ATCC) e uma linhagem de células de câncer do fígado, UMRC (UMRC obtida por meio do Dr. Zhuang, NINDS, NIH do Programa de Suporte à Pesquisa Intramural, SAIC, Instituto Nacional do Câncer, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Câncer Frederick).

15

RESULTADOS

A linhagem de células de câncer renal, UMRC (Figura 3), foi menos sensível que a linhagem de tumor do cérebro, U373 (Figura 4), enquanto a linhagem de câncer de mama, MCF-7 (Figura 5), foi tão sensível quanto U373 para ácido retinóico totalmente trans, tioanidrido Endothal, norcantaridina, Endothal e Tricostatina A. Existe alguma especificidade de tipo celular dessas drogas para GBMs. A atividade das drogas contra células MCF-7 indica que os regimes sendo desenvolvidos para o tratamento de tumores do cérebro podem também ser úteis contra câncer de mama, bem como outros tumores que sobre-expressam N-CoR.

25.

EXEMPLO 4

Além das atividades inibidoras sob baixas concentrações micromolares de Composto 100, o Composto 105, como o Composto 100, também é um zwitterion e é altamente ativo, conforme exibido na Figura 9. O composto solúvel em lipídios 102 também é altamente potente na inibição de linhagens de células de glioma, U373 (Figura 10). Outros

30

derivados de nocantaridina, os Compostos 101, 103, 104 e 106 possuem menos atividade (Figuras 11 a 14).

Para todos os experimentos de cultivo celular, as células são mantidas em crescimento na presença ou ausência de diferentes concentrações de droga ou na presença do veículo utilizado para dissolver a droga, PBS para Composto 100 e DMSO para o Composto 102. As contagens de células são realizadas em três cópias no dia 3 e no dia 7 e a inibição de crescimento é expressa na forma de percentual do número de células presentes na cavidade experimental dividido pelo número de células em uma cavidade controle.

Existe inibição dependente de dosagem pelo Composto 100 da linhagem de células GBM U373 (Figura 15) e inibição dependente de dosagem da linhagem de células de meduloblastoma DAOY (Figura 16).

Para experimentos *in vivo*, células de tumores implantadas por via subcutânea são mantidas em crescimento por sete dias até um tamanho de 5 a 7 mm. No dia 7, a administração da droga inicia-se por via intraperitoneal por vinte dias. Os diâmetros perpendiculares máximos das massas de tumor são medidos a cada dois a cinco dias. No 21º dia após o início do tratamento, os animais são sacrificados e dissecados livres dos tecidos subcutâneos e medidos.

Demonstra-se que o Composto 100 suprime o crescimento da linhagem de células GBM U87 que cresce de forma subcutânea em camundongos SCID (Figura 17). Também se demonstra que o Composto 100 e o Composto 200 inibem a proliferação de células DAOY quando implantados por via subcutânea em camundongos SCID (Figura 18).

EXEMPLO 5: ATIVIDADE DE DROGAS CONTRA LINHAGENS DE CÉLULAS DE CÂNCER HUMANO DIFERENTES DE GLIOBLASTOMAS E MEDULOBLASTOMAS

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagens celulares MDA-MB-231, HT-29, NCI-H460, NCI-H522, NCI-H69, GXF-209, HepG2, OVAR-3, PANC-1, DU-145, LNCAP, HL-60, K-562 e MOLT-4 foram obtidas da Coleção Norte-Americana de Cultivos de Tipos (ATCC, Manassas VA) ou do Instituto Nacional de Câncer (NCI, Frederick MD). Meios RPMI-1640, dipeptídeo L-glutamina (HyQ SG-200) e HEPES foram obtidos por meio da Hyclone (Logan UT).

Soro de feto bovino (FBS) foi obtido por meio da Sigma-Aldrich (St. Louis MO). DMSO foi adquirido da Fisher Chemicals (Fair Lawn NJ). O reagente do Teste de Viabilidade Celular Luminescente CellTiter-Glo foi obtido por meio da Promega Corporation (Madison WI). Todos os plásticos de cultivo de tecido foram obtidos por meio da Corning Incorporated (Nova Iorque NY). O Composto 100 e o Composto 102 foram fornecidos pela Lixte Biotechnology Holdings, Inc. (East Setauket NY).

Todas as linhagens celulares foram cultivadas rotineiramente duas vezes por semana em meio RPMI-1640 suplementado com 2 mM de dipeptídeo L-glutamina, 10 mM de HEPES e 10% FBS.

As linhagens celulares aderentes células MDA-MB-231, HT-29, NCI-H460, NCI-H522, GXF-209, HepG2, OVAR-3, PANC-1, DU-145 e LNCAP foram semeadas em duas placas com 96 cavidades a 2500 células por cavidade em um volume total de 50 µl e incubadas em um incubador de cultivo de células de CO<sub>2</sub> a 5% umidificado a 37 °C por uma noite. As linhagens de células em suspensão NCI-H69, HL-60, K-562 e MOLT-4 foram semeadas em duas placas com 96 cavidades a dez mil células por cavidade em um volume total de 50 µl e incubadas em um incubador de CO<sub>2</sub> a 5% umidificado a 37 °C por uma noite.

Um estoque de 20 mM de droga hidrossolúvel Composto 100 foi elaborado em água estéril e estoques de 20 mM de Composto 102 foram elaborados em DMSO. Isso foi seguido pela

elaboração de 2X estoques das concentrações finais necessárias em meio RPMI-1640. 50 µl das soluções padrão 2X foram adicionados às cavidades apropriadas, que continham 50 µl de células e meio para gerar as concentrações finais descritas no Apêndice. A concentração superior do Composto 100 foi esterilizada por filtração antes do uso. Foram adicionados 50 µl de meios aos meios e cavidades de controle de células e 50 µl de uma solução padrão 2X DMSO imitação foram adicionados às células de controle de veículos. Ao mesmo tempo em que as drogas eram adicionadas às células, uma das placas de cada linhagem celular foi utilizada para o teste CellTiter-Glo conforme descrito abaixo, para a fim de obter valores de Dia 0 para cada linhagem celular. Após um período de incubação de 72 horas, o teste CellTiter-Glo foi realizado sobre a placa remanescente.

#### TESTE CELLTITER-GLO

O teste foi realizado conforme as instruções do fabricante. Resumidamente, placas foram removidas do incubador e colocadas sobre a bancada sob temperaturas ambiente por trinta minutos. As placas não foram empilhadas. Após a incubação por trinta minutos à temperatura ambiente, 100 µl de reagente CellTiter-Glo foram adicionados a cada cavidade sobre a placa e misturados por dois minutos, seguidos por incubação por dez minutos adicionais à temperatura ambiente. A luminescência foi registrada em seguida utilizando o contador de luminescência e cintilação Perkin Elmer Microbeta (Trilux).

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estes estudos foram realizados conforme descrito em Materiais e Métodos, com os dados brutos e configuração de placas descritos no Apêndice. Os valores IC50 obtidos para cada droga em cada linhagem celular são descritos na Tabela 5. A representação gráfica do efeito dos compostos em cada

linhagem celular, junto com as adequações de curvas associadas, é ilustrada nas Figuras 19A a N.

A maior parte das linhagens celulares testadas foi sensível a todas as drogas na faixa com baixo  $\mu\text{M}$  (Tabela 5).  
 5 O Composto 100 e o Composto 102 possuem atividade significativa (aproximadamente igual para todas as linhagens à droga anticancerígena utilizada clinicamente como comparador positivo, doxorubicina). As drogas foram ativas  
 10 contra linhagens celulares de: câncer de mama; câncer do cólon; os três tipos principais de câncer do pulmão, células grandes, adenocarcinoma e células pequenas; câncer do estômago; câncer do fígado (hepatoma); adenocarcinoma do ovário; carcinoma do pâncreas, dois tipos de carcinoma da próstata; e três tipos de leucemia, promielocítica,  
 15 mielocítica crônica e linfocítica aguda (Tabela 5).

Tabela 5: Concentração do Composto 100 e 102 que Resulta em Inibição de 50% da Proliferação ( $\text{IC}_{50}$ ) Obtida das Adequações de Curvas de Quatorze Linhagens de Células de Câncer Humano (Figuras 19A a N)

Linhagem celular	$\text{IC}_{50}$ $\mu\text{M}$		
	Composto 100	Composto 102	
MDA-MB-231 Mama	9,5	6,6	
HT-29 Cólon	5,3	3,6	
NCI-H460 Pulmão: células grandes	24,3	17,5	
NCI-H522 Pulmão adenoca	3,4	2,2	
NCI-H69 Pulmão: células pequenas	23,9	24,6	
GXF-209 Estômago	7,9	5,3	
HepG2 Fígado	31,6	22,1	
OVCAR-3 Ovário adenoca	2,9	5,1	

PANC-1 Pâncreas	25,1	20,7	
DU-145 Próstata	16,4	13,0	
LNCAP Próstata	1,5	0,48	
HL-60 Leucemia promielocítico	7,7	6,5	
K-562 Leucemia mielo crônico	10,7	13,7	
MOLT-4 agudo linfo	5,7	5,6	

#### EXEMPLO 6: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A população crescente de pacientes com comprometimento imunológico devido a transplantes, HIV/AIDS e câncer, principalmente leucemia, resultou em um aumento das infecções fúngicas severas. Os fungos mais frequentemente recuperados de infecções nesses pacientes são *Aspergillus spp* e *Candida spp*. Terapias eficazes são disponíveis para o tratamento de *Candida spp*, mas permanece a preocupação sobre o tratamento de infecções causadas por *Aspergillus spp*, que são associadas a alta mortalidade no hospedeiro imunocomprometido. Essas infecções são de difícil limpeza neste grupo de pacientes, de forma a aumentar a necessidade de agentes com boa atividade contra esses fungos. Além disso, infecções fúngicas trabalhosas menos sérias, mas crônicas das unhas e da pele dos pés e das mãos, as dermatofitoses, afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Como resultado do cenário mutante de infecções fúngicas e da falta de uma cura geral para essas infecções, os Compostos 100 e 102 estão passando por testes para possível desenvolvimento futuro.

20

#### MATERIAIS E MÉTODOS

Testes antifúngicos foram completados com um lote comum para os Compostos 100 e 102.

Uma porção de 10 mg de cada pó foi pesada e adicionada a 1 ml de água destilada estéril para o Composto 100 e DMSO para o Composto 102. A concentração resultante de 10 µg/ml foi diluída em uma concentração de trabalho de 640 µg/ml para cada composto. Todas as diluições subsequentes foram também realizadas utilizando os diluentes correspondentes. Concentrações de teste finais variaram de 0,125 a 64 µg/ml.

### RESULTADOS

Um total de 23 isolados foi testado para incluir 3 *Candida albicans*, 3 *Candida glabrata*, 3 *Cryptococcus neoformans*, 3 *Aspergillus fumigatus*, 3 *Rhizopus oryzae*, 3 *Fusarium solani*, 3 *Pseudallescheria boydii* e 2 *Trichosporon rubrum*. Todos os isolados foram isolados clínicos submetidos ao Laboratório de Testes com Fungos para avaliação. Testes de susceptibilidade antifúngica foram realizados conforme os métodos descritos no Comitê Nacional de Padrões de Laboratórios Clínicos, M-27A2, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard*, e M38-A, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming Filamentous Fungi; Approved Standard*. Estes incluem teste em RPMI-1640 com glutamina e sem bicarbonato, um tamanho de inoculado de 0,5 a 2,5 x 10<sup>3</sup> para leveduras ou 1 a 5 x 10<sup>4</sup> para fungos e incubação a 35 °C por 24 e 48 horas. A concentração inibidora mínima (MIC) foi definida como a concentração mais baixa que resultou em uma redução de 50% da turvação em comparação com um tubo controle livre de drogas para a levedura e 80% de inibição para os moldes.

Embora não se observasse a atividade do Composto 100 nos níveis testados, descobriu-se atividade significativa para o Composto 102 contra *T. rubrum* (Tabela 6).

### CONCLUSÃO

Dependendo dos níveis deste composto que podem ser atingidos em pacientes humanos, perfis de segurança e outros fatores pertinentes, este composto pode ser um combatente viável das infecções dermatofíticas causadas por *Trichosporon rubrum*.

Tabela 6

CP	Controle	Composto 100/24 horas	Composto 100/48 horas	Composto 102/24 horas	Composto 102/48 horas
07-3006	<i>C. albicans</i>	>64	>64	>64	>64
07-3011	<i>C. albicans</i>	>64	>64	>64	>64
07-3012	<i>C. albicans</i>	>64	>64	>64	>64
07-2964	<i>C. glabrata</i>	>64	>64	>64	>64
07-2965	<i>C. glabrata</i>	>64	>64	>64	>64
07-3013	<i>C. glabrata</i>	>64	>64	>64	>64
07-2665	<i>C. neoformans</i>	>64	>64	>64	>64
07-2737	<i>C. neoformans</i>	>64	>64	>64	>64
07-2829	<i>C. neoformans</i>	>64	>64	>64	>64
07-1870	<i>R. arrhizus</i>	>64	>64	>64	>64
07-2044	<i>R. arrhizus</i>	>64	>64	>64	>64
07-2078	<i>R. arrhizus</i>	>64	>64	>64	>64
07-1399	<i>F. solani</i>	>64	>64	>64	>64
07-1755	<i>F. solani</i>	>64	>64	>64	>64
07-1867	<i>F. solani</i>	>64	>64	>64	>64
07-1333	<i>P. boydii</i>	>64	>64	>64	>64
07-1502	<i>P. boydii</i>	>64	>64	>64	>64
07-1601	<i>P. boydii</i>	>64	>64	>64	>64
05-388	<i>A. fumigatus</i>	>64	>64	>64	>64
06-4126	<i>A. fumigatus</i>	>64	>64	>64	>64
07-2039	<i>A. fumigatus</i>	>64	>64	>64	>64
07-1743	<i>T. rubrum</i>	>64	>64	2	2
07-2055	<i>T. rubrum</i>	>64	>64	2	2

## REFERÊNCIAS

Alder, B. (1938), *Ann. Chem.*, 113, 120.

10 Ayaydin, F. et al (2000), *The Plant Journal*, 23:  
85-96.

Baskin, T. e Wilson, J. (1997), *Plant Physiol.* 113:  
493-502.

Bastien et al (2004), *Gene*, Vol. 328, págs. 1-16.

15 Bhongle, N. N. et al (1984), *Indian J. Chem. Sect.*  
*B*, 23, 465-468.

Blaheta, A. et al (2002), *Current Medicinal  
Chemistry*, Vol. 9, págs. 1417-1433.

Crafts, A. S. (1953), *Rev. Plant. Physiol.* 4: 253-282.

Drewinko et al (1967), *Cancer Biochem. Biophys.*, Vol. 1, págs. 187-195.

5 Erdodi, F. et al (1985), *Am. J. Physiol.*, 269 (*Cell Physiol.* 38) C1176-C1184.

Essers, M. et al (2001), *Tetrahedron Lett.*, 42, 5429-5433.

10 Fanghaemel, F. et al (1994), *Synthesis*, 10, 1067-1071.

Giannini, R. e Cvallini, A. (2005), *Anticancer Research*, Vol. 36, N° 6B, págs. 4287-4292.

Göttlicher, M. et al (2001), *Eur. Mol. Bio. Journal*, Vol. 20, n° 24, págs. 6969-6978.

15 Graziano, M. J. e Casida, J. E. (1987), *Toxicol. Lett.*, 37, 143-148.

Hart, M. E. et al (2004), *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 14, págs. 1969-1973.

20 Havrilesky, L. J. et al (2001), *J. Soc. Gynecology. Investig.*, Vol. 8, págs. 104-113.

Hermanson et al (2002), *Nature*, Vol. 419, págs. 934-939.

Honkanan, R. E. et al (1993), *FEBS Lett.*, 330, 283-286.

25 Hughes et al (1988), *Nature*, Vol. 335, págs. 70-73.  
Kayser, M. M. et al (1989), *Can. J. Chem.*, 67, 1401-1410.

Kayser, M. M. et al (1982), *Can. J. Chem.*, 60, 1199-1208.

30 Kawamura, N. et al (1990), *Chem. Res. Toxicol.*, Vol. 3, págs. 318-324.

Kovach, J. S. et al (1985), *Cancer Treat. Rep.*, Vol. 69, págs. 97-103.

Li, Y. M. et al (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89, 11867-11870.

Li, Y. M. et al (1993), *Biochem. Pharmacol.*, 46, 1435-1443.

5 Matsuzawa, M. et al (1987), *J. Agric. Food Chem.*, Col. 35, N° 5.

Momparlet, R. L. (1980), *Pharmacol. Ther.*, Vol. 8, págs. 21-35.

10 Myers, E. et al (2005), *Clin. Cancer Res.*, Vol. 11, págs. 2111-2122.

Park, D. M. et al (2007), *Cell Cycle*, 6 (4): 467-70.

Peng, F. et al (2002), *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, Vol. 128, págs. 223-230.

15 Ramezani, M. et al (1989), *J. Org. Chem.*, 54, 2852-2854.

Rutka et al (1988), *Int. J. Cancer*, Vol. 42, págs. 419-427.

20 Sanderson, L. et al (2004), *Drug Metabolism and Disposition*, Vol. 32, N° 10, págs. 1132-1138.

Sakoff, J. A. (2004), *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 10, págs. 1139-1159.

Schweizer, H. R. (1989), *Helv. Chim. Acta.*, 2221-2235.

25 Shimi, I. R. et al (1982), *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 18: 785-793.

Singh et al (2003), *Cancer Research*, Vol. 63, págs. 5821-5828.

30 Singh et al (2004), *Nature*, Vol. 432, págs. 396-401.

Smith et al (1994), *Planta* 194: 516-524.

Stupp et al (2005), *N. Engl. J. Med.*, Vol. 352, págs. 987-996.

Trost, L. (1977), *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 7079.

Tsauer, W. et al (1997), *Anticancer Research* 17, 2095-2098.

Uchida et al (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 97, págs. 14720-14725.

Wang, D. S. (1989), *Journal of Ethnopharmacology*, 26: 147-162.

Yi, S. N. et al (1988), *Bulletin of Hunan Medical University*, 13: 327-330.

10 Patente Norte-Americana nº 6.949.624, Liu et al.

Patente Norte-Americana Publicada nº 2004/0197888, Armour et al.

Patente Norte-Americana Publicada nº 2004/0253637, Buechler et al.

15 Patente Norte-Americana Publicada nº 2005/0203082, Hsu et al.

Patente Norte-Americana Publicada nº 2006/0030616A1, depositada em nove de fevereiro de 2006 (McCluskey et al).

20 Valeriotte, F. (1975), *Cancer Chemother. Rep.*, Vol. 59, págs. 895-900.

Wang, G. S. (1983), *Chin. Pharmac. Bull.*, Col. 18, págs. 18-19.

25 Wang, G. S. (1989), *J. Ethnopharmacol.*, Vol. 26, págs. 147-162.

Wang, G. S. et al (1986), *Chinese Pharm. Bull.*, Vol. 21, págs. 90-93.

Wang, G. S. et al (1987), *Chinese Pharm. Bull.*, Vol. 22, págs. 517-519.

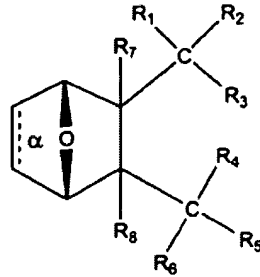
30 Waters, C. E. et al (2004), *J. Endocrinol.*, Vol. 183, págs. 375-383.

Yoshida, M. et al (1990), *Journal of Biological Chem.*, Vol. 265, Nº 28, págs. 17174-17179.

Yung et al (1996), *Clin. Cancer Res.*, Vol. 2, págs.  
1931-1935.

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSTO, que possui a estrutura:

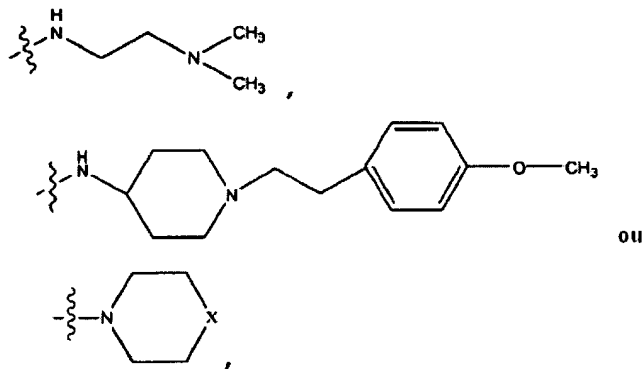


caracterizado pelo fato de que:

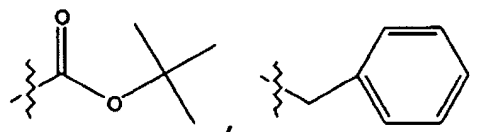
5 a união  $\alpha$  está presente ou ausente;

$R_1$  e  $R_2$  são, independentemente entre si, H,  $O^-$  ou  $OR_9$ , em que  $R_9$  é H, alquila, alquenila, alquinila ou arila; ou  $R_1$  e  $R_2$  juntos são =O;

10  $R_3$  e  $R_4$  são diferentes entre si e cada qual é OH,  $O^-$ ,  $OR_9$ , SH,  $S^-$  ou  $SR_9$ ;



em que X é O, S,  $NR_{10}$  ou  $N^+R_{10}R_{10}$ , em que cada  $R_{10}$  é independentemente H, alquila, alquila  $C_2$ - $C_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $C_4$ - $C_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila ou arila substituído, em que o substituinte é diferente de cloro quando  $R_1$  e  $R_2$  forem =O;



- $CH_2CN$ , - $CH_2CO_2R_{11}$ , - $CH_2COR_{11}$ , - $NHR_{11}$  ou - $NH^+(R_{11})_2$ , em que cada  $R_{11}$  é independentemente alquila, alquenila ou

alquinila, cada um dos quais substituído ou não substituído, ou H;

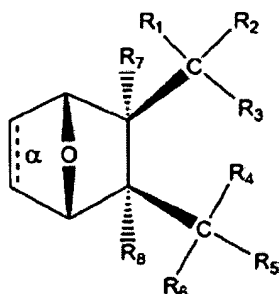
$R_5$  e  $R_6$  são, independentemente entre si, H, OH ou  $R_5$  e  $R_6$ , tomados em conjunto, são =O; e

5  $R_7$  e  $R_8$  são, independentemente entre si, H, F, Cl, Br,  $\text{SO}_2\text{Ph}$ ,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$  ou  $\text{SR}_{12}$ ;

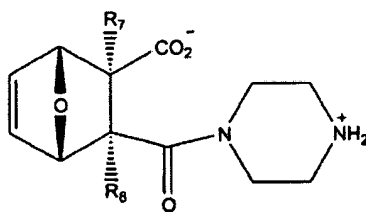
em que  $R_{12}$  é H, arila ou alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído;

ou um sal, enantiômero ou zwitterion do composto.

10 2. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto possui a estrutura:

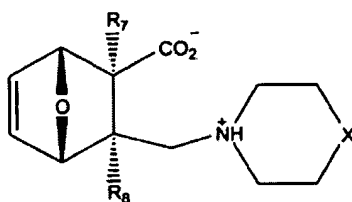


3. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o composto possui a estrutura:



15

4. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o composto possui a estrutura:



20 5. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a união  $\alpha$  está presente.

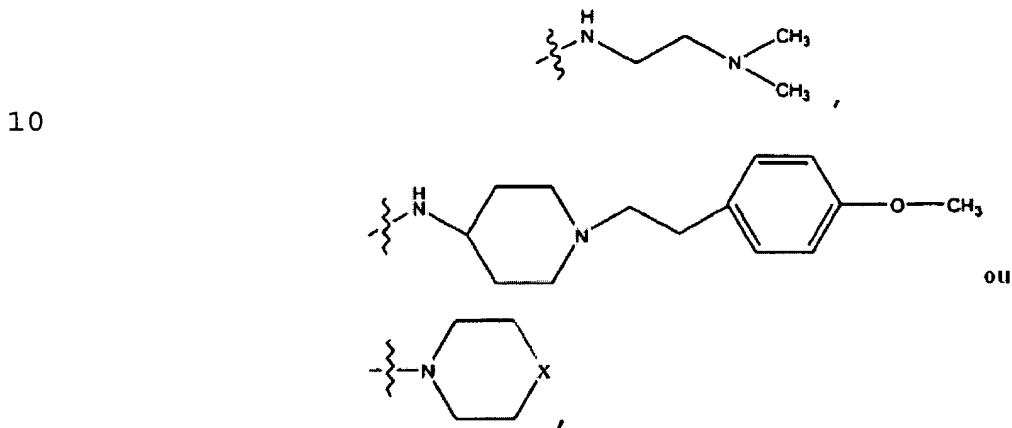
6. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a união  $\alpha$  está ausente.

7. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que:

$R_1$  e  $R_2$  juntos são =O;

$R_3$  é  $O^-$  ou  $OR_9$ , em que  $R_9$  é H, metila, etila ou fenila;

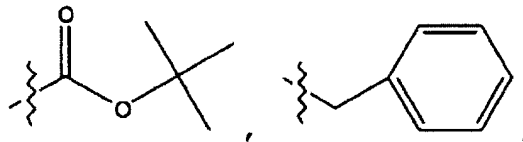
$R_4$  é:



em que X é O, S,  $NR_{10}$  ou  $N^+R_{10}R_{10}$ ;

em que cada  $R_{10}$  é independentemente H, alquila, alquila  $C_2-C_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $C_4-C_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila, arila substituído em que o substituinte é diferente de cloro;

15



$-CH_2CN$ ,  $-CH_2CO_2R_{11}$ ,  $-CH_2COR_{11}$ ,  $-NHR_{11}$  ou  $-NH^+(R_{11})_2$  em que  $R_{11}$  é alquila, alquenila ou alquinila, cada um dos quais substituído ou não substituído, ou H;

20

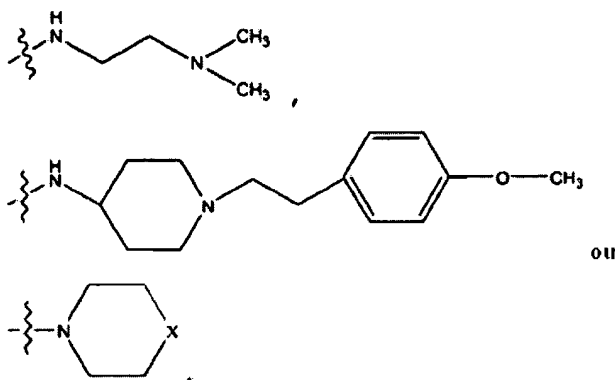
$R_5$  e  $R_6$ , tomados em conjunto, são =O; e

$R_7$  e  $R_8$  são, independentemente entre si, H, F, Cl, Br,  $SO_2Ph$ ,  $CO_2CH_3$  ou  $SR_{12}$ ;

em que  $R_{12}$  é um alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído.

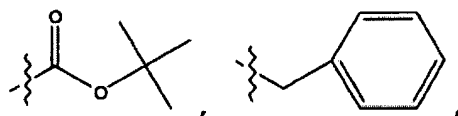
8. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de que  $R_3$  é  $O^-$ .

9. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizado pelo fato de que  $R_4$  é:



em que  $X$  é  $O$ ,  $NR_{10}$ ,  $N^+R_{10}R_{10}$ ;

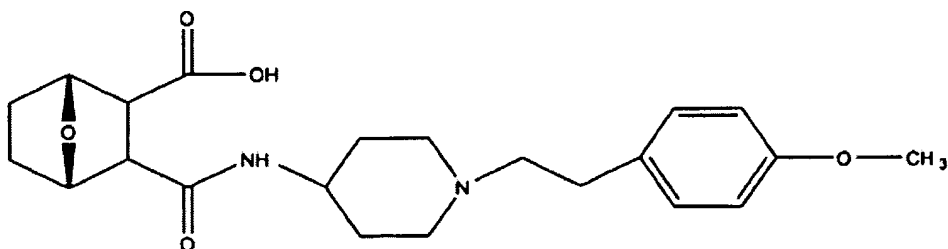
em que cada  $R_{10}$  é independentemente  $H$ , alquila, alquila  $C_2-C_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $C_4-C_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila, arila substituído em que o substituinte é diferente de cloro quando  $R_1$  e  $R_2$  forem  $=O$ ;

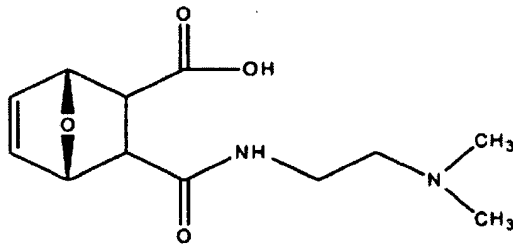
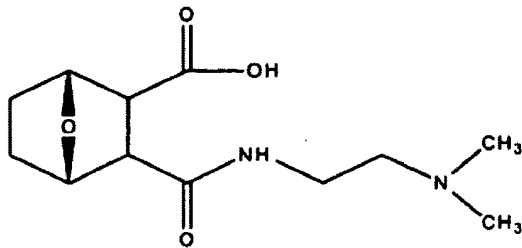
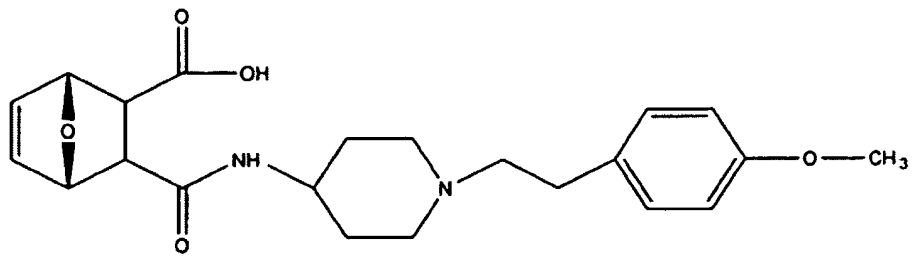


$-CH_2CN$ ,  $-CH_2CO_2R_{11}$ ,  $-CH_2COR_{11}$ ,  $-NHR_{11}$  ou  $-NH^+(R_{11})_2$ , em

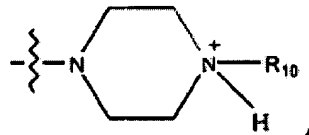
que  $R_{11}$  é  $H$  ou alquila.

10. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que possui a estrutura:

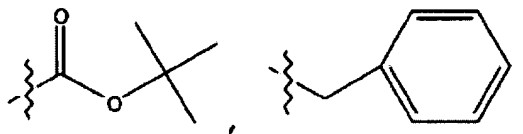




11. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, caracterizado pelo fato de que R<sup>4</sup> é:

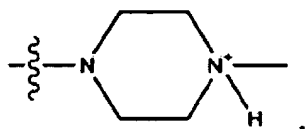


em que R<sub>10</sub> é H, alquila, alquila C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> substituído, alquenila, alquenila C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub> substituído, alquinila, alquinila substituído, arila, arila substituído em que o substituinte é diferente de cloro quando R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> forem =O;

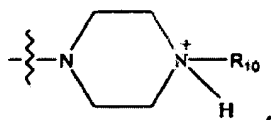


-CH<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>R<sub>11</sub>, -CH<sub>2</sub>COR<sub>11</sub>, -NHR<sub>11</sub> ou -NH<sup>+</sup>(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>, em que R<sub>11</sub> é H ou alquila.

12. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9 ou 11, caracterizado pelo fato de que R<sub>4</sub> é:

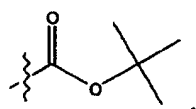


13. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9 ou 11, caracterizado pelo fato de que  $R_4$  é:



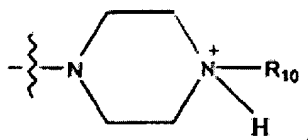
5

em que  $R_{10}$  é:

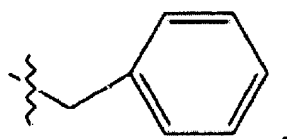


14. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9 ou 11, caracterizado pelo fato de que  $R_4$  é:

10

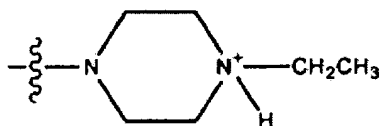


em que  $R_{10}$  é:



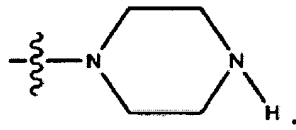
15. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9 ou 11, caracterizado pelo fato de que  $R_4$  é:

15



16. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9 ou 11, caracterizado pelo fato de que  $R_4$  é:

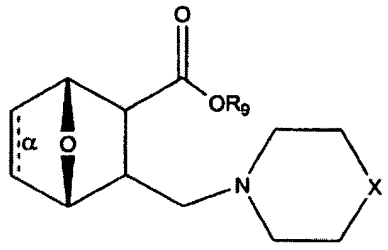
20



17. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9 ou 11 a 16, caracterizado pelo fato de que  $R_5$  e  $R_6$  juntos são =O.

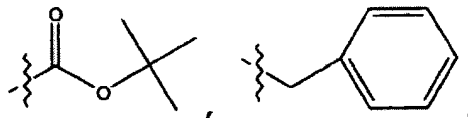
5 18. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9 ou 11 a 17, caracterizado pelo fato de que  $R_7$  e  $R_8$  são independentemente H.

19. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 1:



10 caracterizado pelo fato de que a união  $\alpha$  está presente ou ausente;  $R_9$  está presente ou ausente e, quando presente, é H, alquila  $C_1$ - $C_{10}$ , alquenila  $C_2$ - $C_{10}$  ou fenila; e X é O, S,  $NR_{10}$  ou  $N^+R_{10}R_{10}$ ;

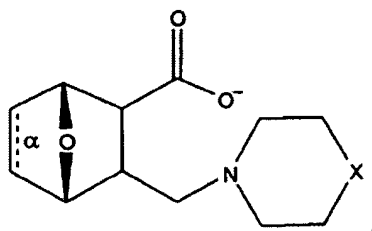
15 em que cada  $R_{10}$  é independentemente H, alquila, alquila  $C_2$ - $C_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $C_4$ - $C_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila, arila substituído, em que o substituinte é diferente de cloro;



20  $-CH_2CO_2R_{11}$ ,  $-CH_2COR_{11}$ ,  $-CH_2CN$  ou  $-CH_2CH_2R_{16}$ , em que  $R_{11}$  é H ou alquila e em que  $R_{16}$  é qualquer substituinte que é um precursor de um intermediário aziridinila;

ou um sal, zwitterion ou enantiômero do composto.

20. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que possui a estrutura:

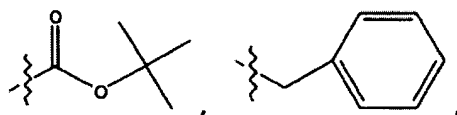


em que:

a união  $\alpha$  está presente ou ausente;

X é O, S,  $\text{NR}_{10}$  ou  $\text{N}^+\text{R}_{10}\text{R}_{10}$ ;

- 5 em que cada  $\text{R}_{10}$  é independentemente H, alquila, alquila  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $\text{C}_4\text{-C}_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila e arila substituído, em que o substituinte é diferente de cloro;



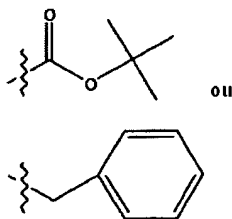
- 10  $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}_{11}$ ,  $-\text{CH}_2\text{COR}_{11}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CN}$  ou  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}_{16}$ , em que  $\text{R}_{11}$  é H ou alquila e em que  $\text{R}_{16}$  é qualquer substituinte que é um intermediário aziridinila;

ou um sal, zwitterion ou enantiômero de um composto.

- 15 21. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que:

X é O ou  $\text{NH}^+\text{R}_{10}$ ;

- 20 em que  $\text{R}_{10}$  é H, alquila, alquila  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $\text{C}_4\text{-C}_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila ou arila substituído, em que o substituinte é diferente de cloro;



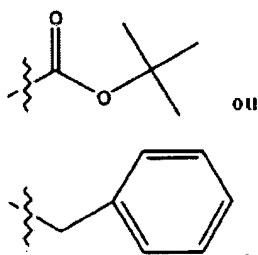
22. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que X é  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}_{16}$ , em que  $\text{R}_{16}$  é qualquer substituinte que é um precursor de um intermediário de aziridinila.

23. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 ou 21, caracterizado pelo fato de que X é O.

24. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 ou 21, caracterizado pelo fato de que:

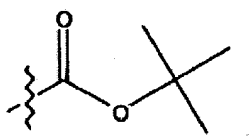
X é  $\text{NH}^+\text{R}_{10}$ ;

em que  $\text{R}_{10}$  é H, alquila, alquila  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $\text{C}_4\text{-C}_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila, arila substituído em que o substituinte é diferente de cloro;



25. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20, 21 ou 24, caracterizado pelo fato de que  $\text{R}_{10}$  é metila.

26. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20, 21 ou 24, caracterizado pelo fato de que  $\text{R}_{10}$  é:



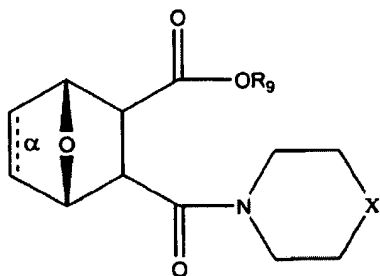
27. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20, 21 ou 24, caracterizado pelo fato de que  $\text{R}_{10}$  é:



28. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20, 21 ou 24, caracterizado pelo fato de que  $R_{10}$  é etila.

5 29. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20, 21 ou 24, caracterizado pelo fato de que  $R_{10}$  é ausente.

30. COMPOSTO, que possui a estrutura:

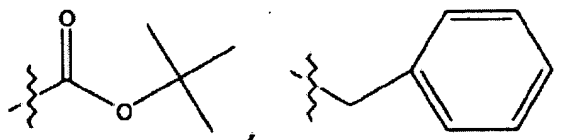


10 caracterizado pelo fato de que:

a união  $\alpha$  está presente ou ausente;

$R_9$  está presente ou ausente e, quando presente, é H, alquila, alquenila, alquinila ou fenila; e

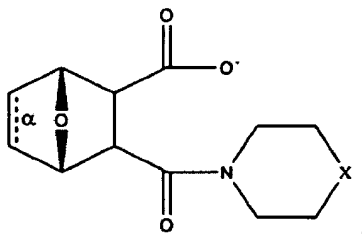
15 X é O,  $NR_{10}$  ou  $N^+R_{10}R_{10}$ , em que cada  $R_{10}$  é independentemente H, alquila, alquila  $C_2-C_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $C_4-C_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila, arila substituído em que o substituinte é diferente de cloro;



20  $-CH_2CN$ ,  $-CH_2CO_2R_{12}$  ou  $-CH_2COR_{12}$ , em que  $R_{12}$  é H ou alquila;

ou um sal, zwitterion ou enantiômero do composto.

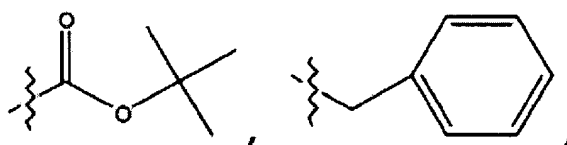
31. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 30, que possui a estrutura:



caracterizado pelo fato de que:

5 a união  $\alpha$  está presente ou ausente;

X é O ou  $\text{NH}^+\text{R}_{10}$ , em que  $\text{R}_{10}$  é H, alquila, alquila  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $\text{C}_4\text{-C}_{12}$  substituído, alquinila, alquinila substituído, arila, arila substituído em que o substituinte é diferente de cloro;



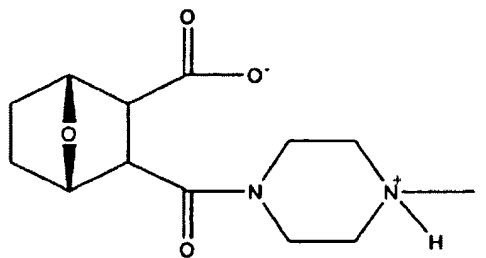
10

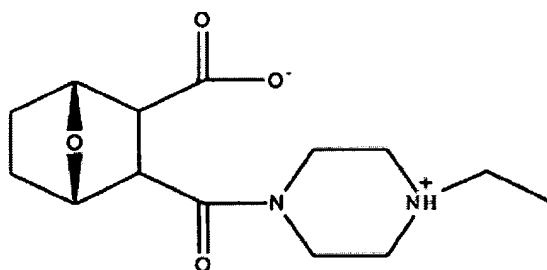
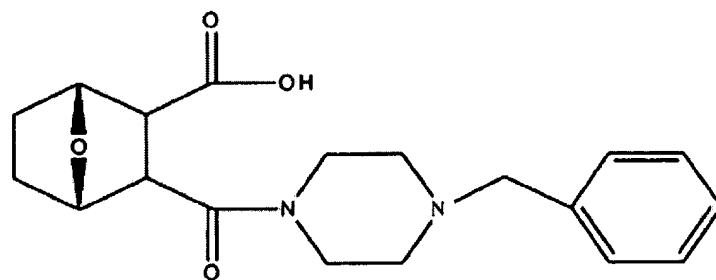
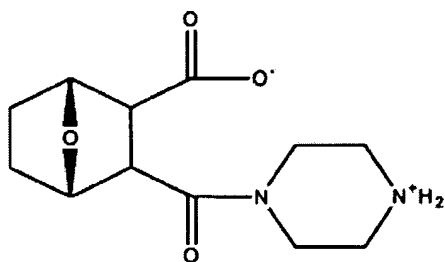
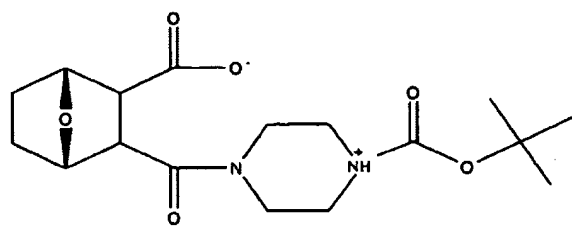
$-\text{CH}_2\text{N}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}_{12}$  ou  $-\text{CH}_2\text{COR}_{12}$ , em que  $\text{R}_{12}$  é H ou alquila.

32. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a união  $\alpha$  está presente.

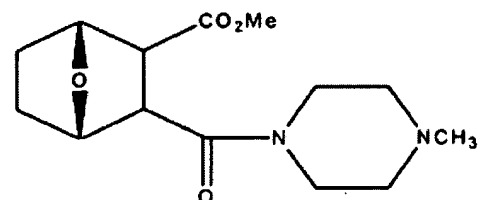
15 33. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a união  $\alpha$  está ausente.

34. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que possui a estrutura:



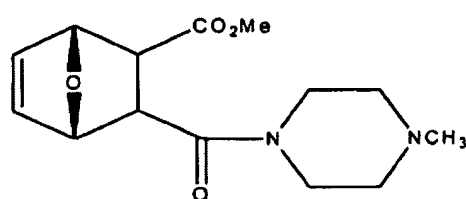
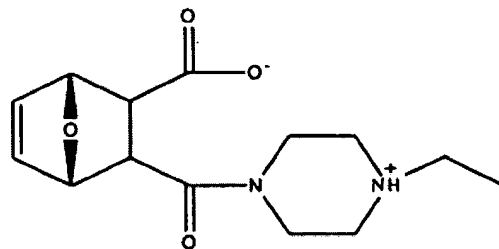
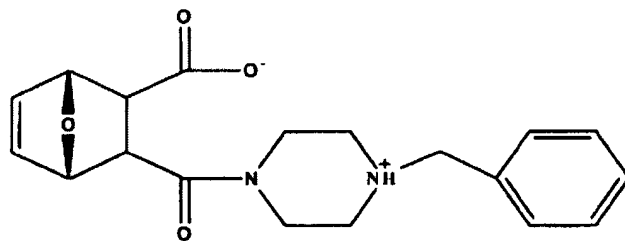
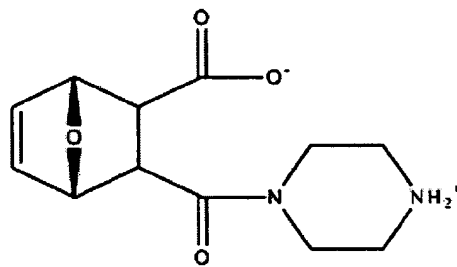
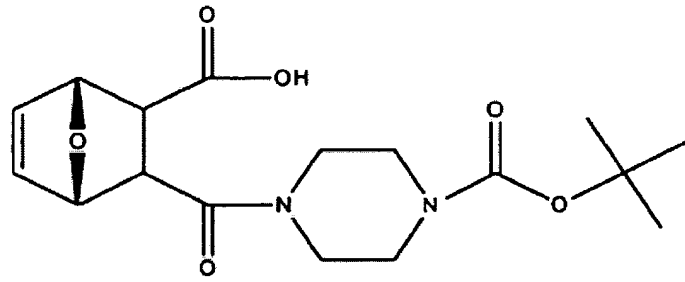
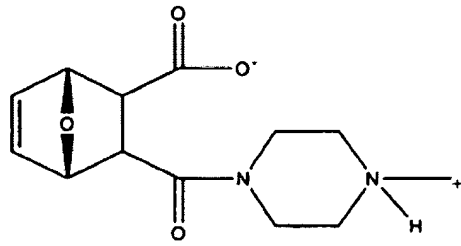


, ou

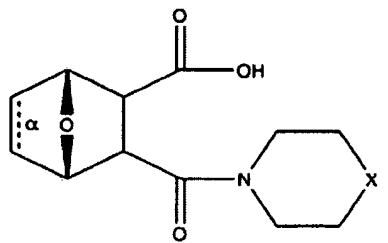


5

35. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que possui a estrutura:



36. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 30, que possui a estrutura:



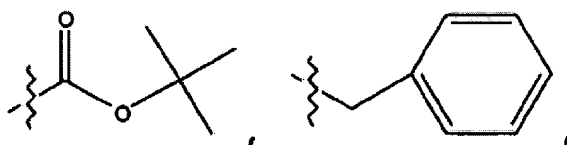
Caracterizado pelo fato de que:

5

a união α está presente ou ausente;

X é  $\text{NH}^+\text{R}_{10}$ ;

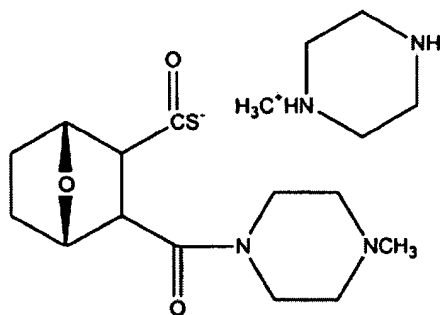
em que  $\text{R}_{10}$  está presente ou ausente e, quando presente,  $\text{R}_{10}$  é alquila, alquila  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$  substituído, alquenila, alquenila  $\text{C}_4\text{-C}_{12}$  substituído;



10

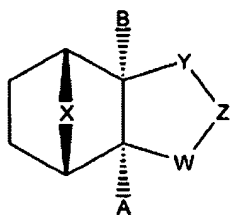
$-\text{CH}_2\text{N}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}_{12}$  ou  $-\text{CH}_2\text{COR}_{12}$ , em que  $\text{R}_{12}$  é H ou alquila.

37. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto possui a estrutura:



15

38. COMPOSTO, que possui a estrutura:



caracterizado pelo fato de que:

A e B são, independentemente entre si, H, F, Cl, Br, SO<sub>2</sub>Ph, COR<sub>14</sub>, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, SR<sub>14</sub>;

em que R<sub>14</sub> é H ou arila ou um alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído;

X é O, NH ou S;

Z é O, S, SR<sub>15</sub>, NH, NR<sub>15</sub>, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>OR<sub>15</sub> em que R<sub>15</sub> é arila ou um alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído; e

Y e W são, independentemente entre si, CHOH CH<sub>2</sub>, C=S ou C=O;

ou um sal do composto.

39. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que:

A e B são, independentemente entre si, H ou F;

X é O;

Z é S; e

Y e W são independentemente C=S.

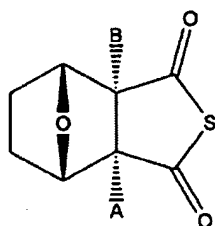
40. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 ou 39, caracterizado pelo fato de que A e B são independentemente F.

41. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 ou 39, caracterizado pelo fato de que:

A é H; e

B é F.

42. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 38, que possui a estrutura:

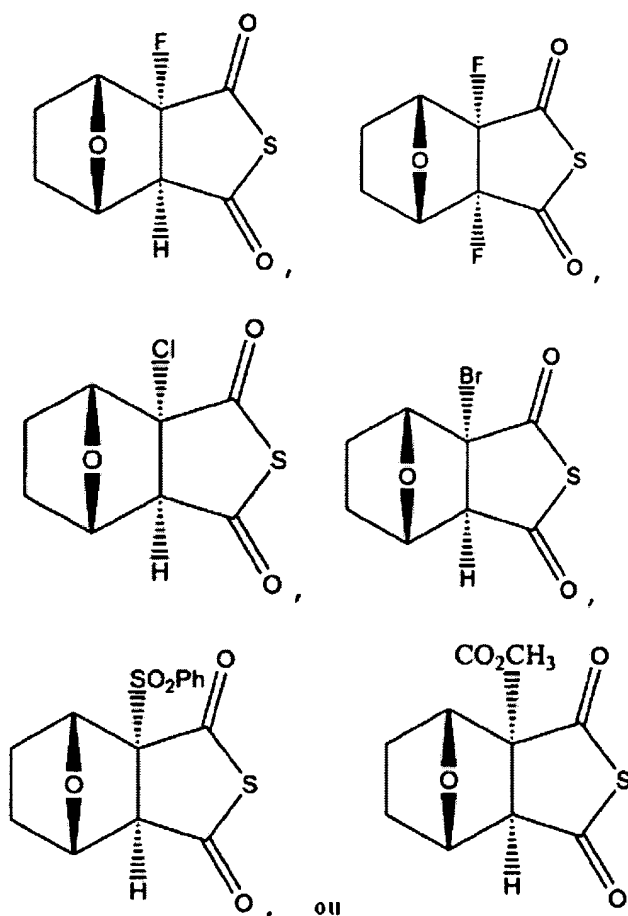


caracterizado pelo fato de que:

A é F ou  $SR_{14}$ , em que  $R_{14}$  é arila ou um alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído; e

B é F, Cl, Br,  $SO_2Ph$ ,  $CO_2CH_3$ ,  $COR_{14}$  ou  $SR_{14}$ , em que  $R_{14}$  é arila ou um alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído.

43. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que possui a estrutura:



10

44. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizado pelo fato de compreender o composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 37 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

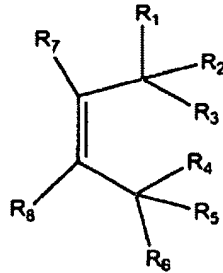
15

45. PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM COMPOSTO, que possui a estrutura conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de compreender:

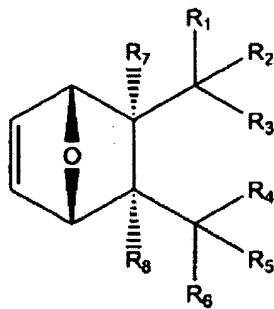
a. reação de um composto que possui a estrutura:



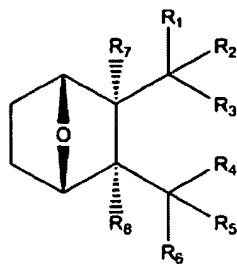
com um composto que possui a estrutura:



5 para formar um composto que possui a estrutura a seguir:



b. reação de um composto que possui a estrutura acima com hidrogênio na presença de um catalisador para  
10 formar:

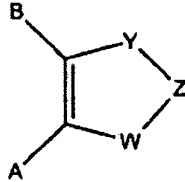


46. PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM COMPOSTO, que possui a estrutura conforme definida na reivindicação 38, caracterizado pelo fato de compreender:

15 a. reação de um composto que possui a estrutura:

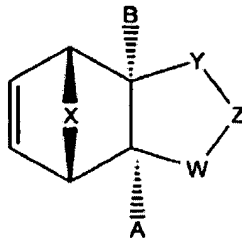


com um composto que possui a estrutura:

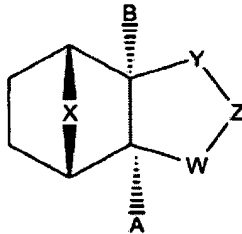


para formar um composto que possui a estrutura a

5 seguir:

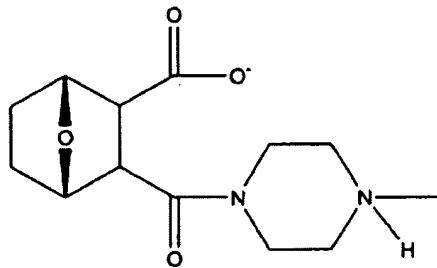


b. reação de um composto que possui a estrutura acima com hidrogênio na presença de um catalisador para formar:



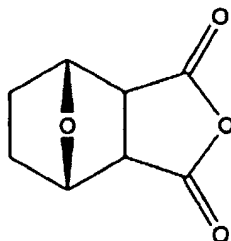
10

47. PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM COMPOSTO, que possui a estrutura:

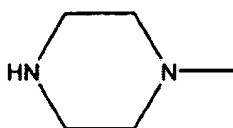


caracterizado pelo fato de compreender:

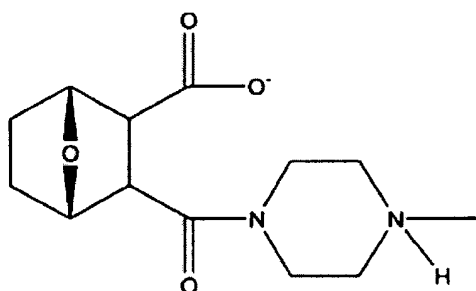
a dissolução de um composto que possui a estrutura a seguir:



em benzeno e adição de um composto que possui a  
5 estrutura:



para produzir um composto que possui a estrutura:



b. recristalização do composto após a etapa a, para  
10 produzir o composto.

48. PROCESSO, conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que o solvente é dimetilformamida.

49. MÉTODO DE CONTROLE DE VEGETAÇÃO INDESEJADA,  
15 caracterizado por compreender o contato da vegetação ou seu ambiente com uma quantidade eficaz como herbicida dos compostos conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 37.

50. MÉTODO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE  
20 VEGETAL, caracterizado por compreender o contato da planta ou seu ambiente com uma quantidade eficaz como herbicida dos

compostos conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 37.

51. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 ou 50, caracterizado pelo fato de que o composto é o Composto 100, 100E, 101, 101E, 102, 102E, 103, 103E, 104, 104E, 105, 105E, 106, 106E, 107, 107E, 108 ou 111.

52. MÉTODO DE PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DE UMA INFECÇÃO FÚNGICA EM UM PACIENTE, que compreende a administração ao paciente de uma quantidade eficaz dos compostos conforme definido em qualquer das reivindicações 1 a 37 para tratar a infecção fúngica, de forma a tratar a infecção fúngica.

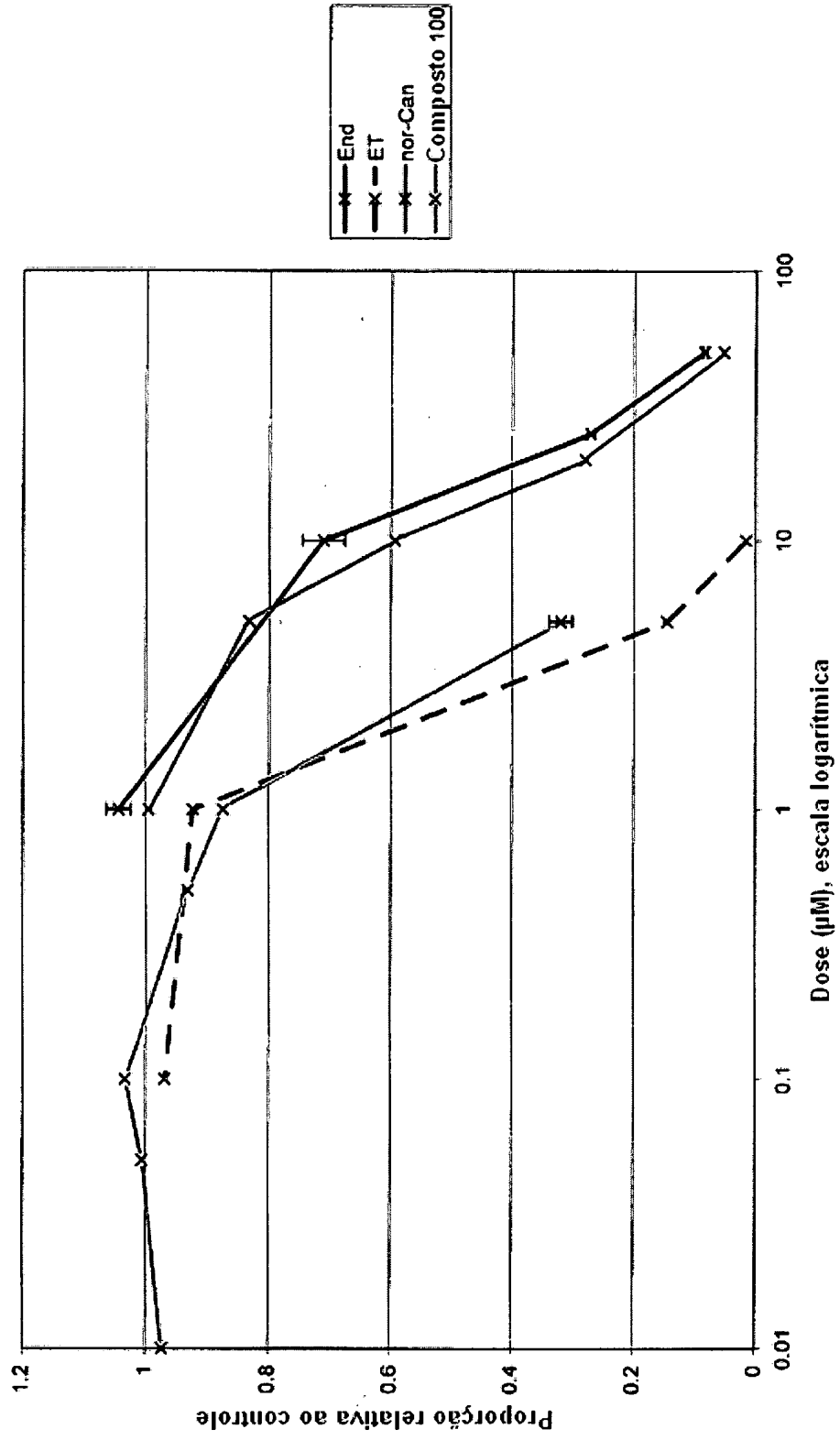
53. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que o composto é o Composto 100, 100E, 101, 101E, 102, 102E, 103, 103E, 104, 104E, 105, 105E, 106, 106E, 107, 107E, 108 ou 111.

54. MÉTODO DE TRATAMENTO DE PACIENTES QUE SOFREM DE CÂNCER, sendo este câncer de mama, câncer do cólon, câncer do pulmão de células grandes, adenocarcinoma do pulmão, câncer do pulmão de células pequenas, câncer do estômago, câncer do fígado, adenocarcinoma do ovário, carcinoma do pâncreas, carcinoma da próstata, leucemia promielocítica, leucemia mielocítica crônica ou leucemia linfocítica aguda que compreende a administração ao paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz dos compostos conforme definido em qualquer das reivindicações 1 a 37, de forma a tratar o paciente.

55. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que o composto é 100, 100E, 101, 101E, 102, 102E, 103, 103E, 104, 104E, 105, 105E, 106, 106E, 107, 107E, 108 ou 111.

Fig. 1

Inibição de U373 por Quatro Análogos de Cantaridina



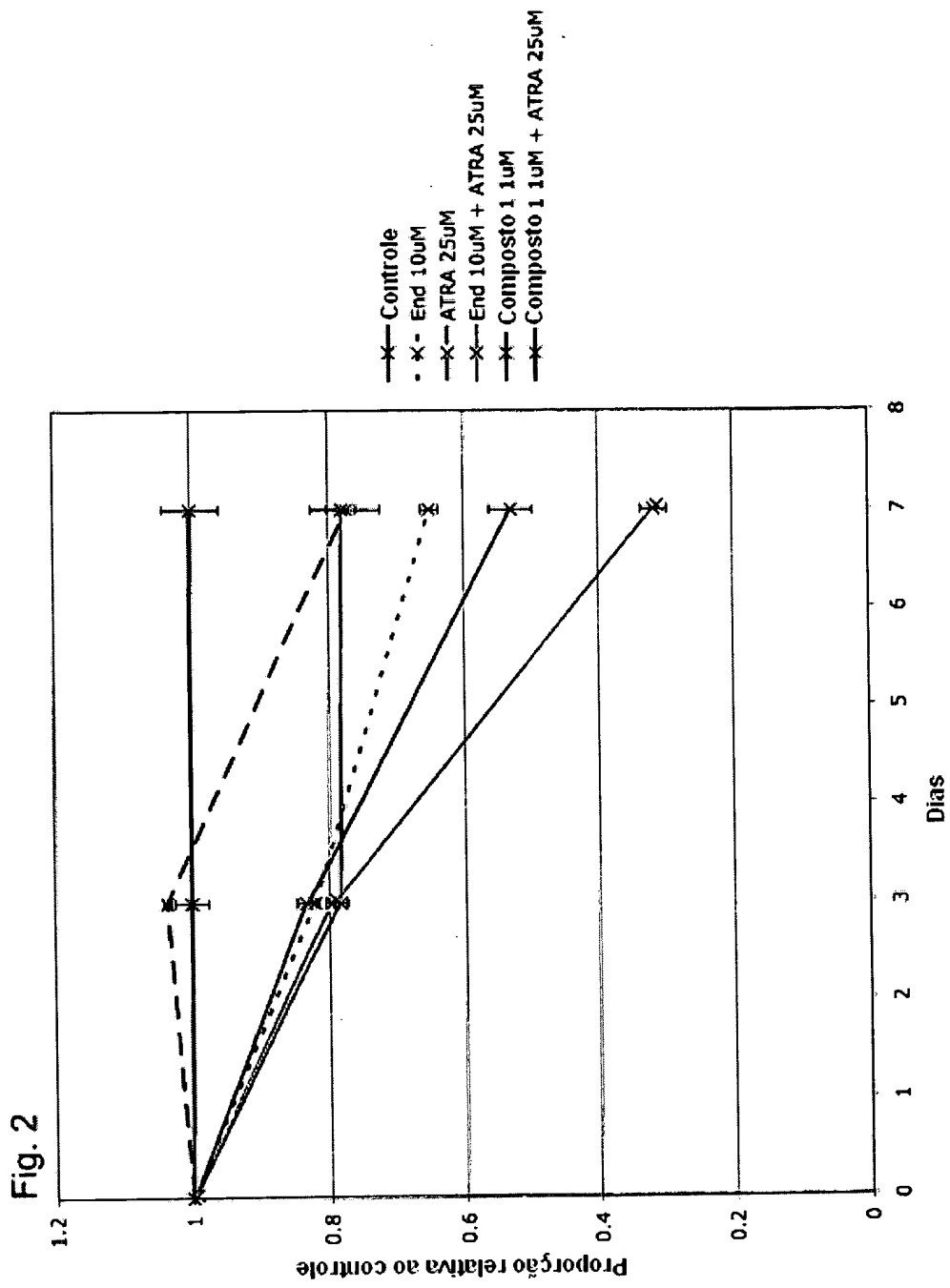
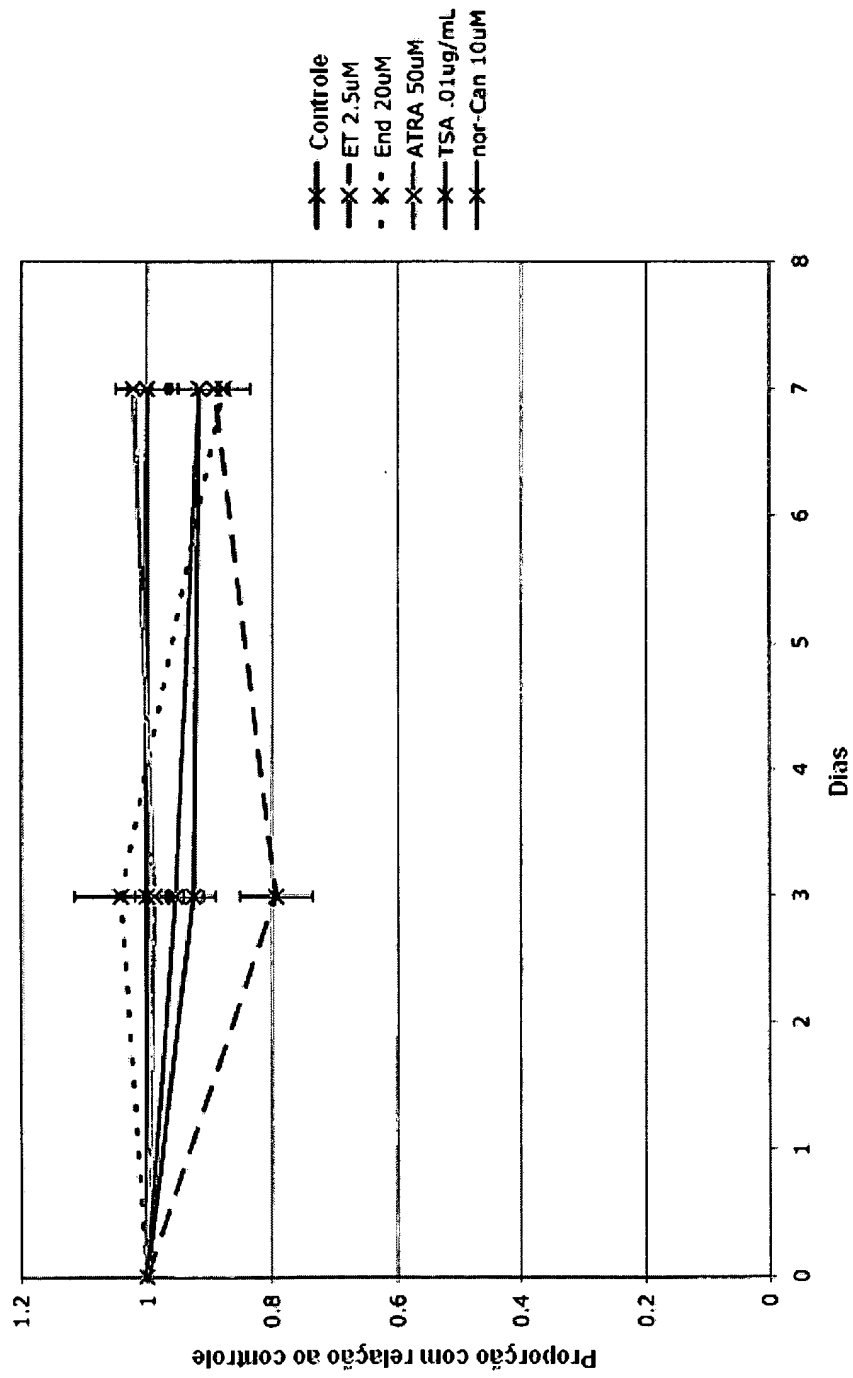
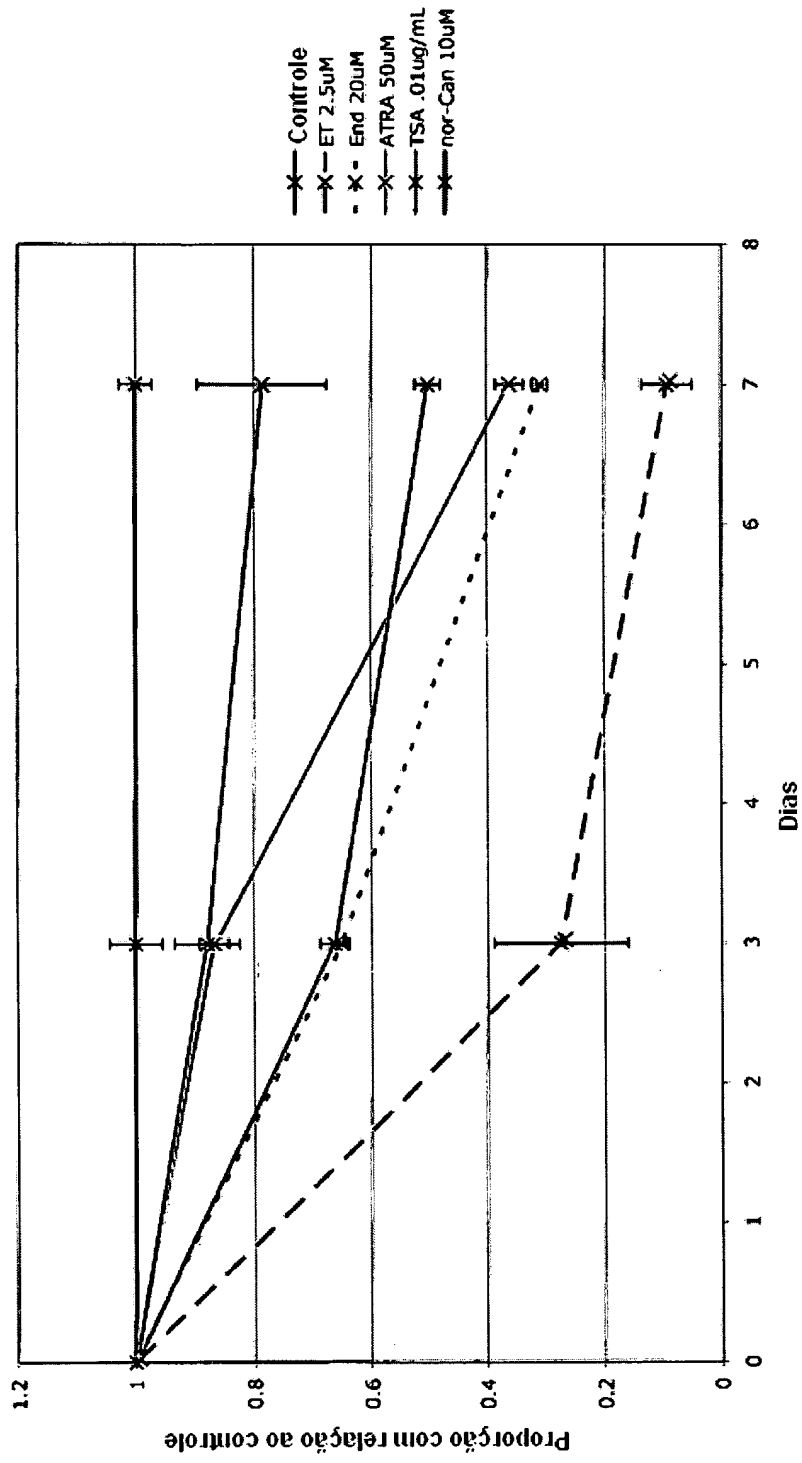


Fig. 3 Inibição da Linhagem de Células de Câncer Renal, UMRC



**Fig. 4** Inibição da Linhagem de Células de Glioma, U373



**Fig. 5** Inibição de Linhagens de Células de Câncer de Mama, MCF-7

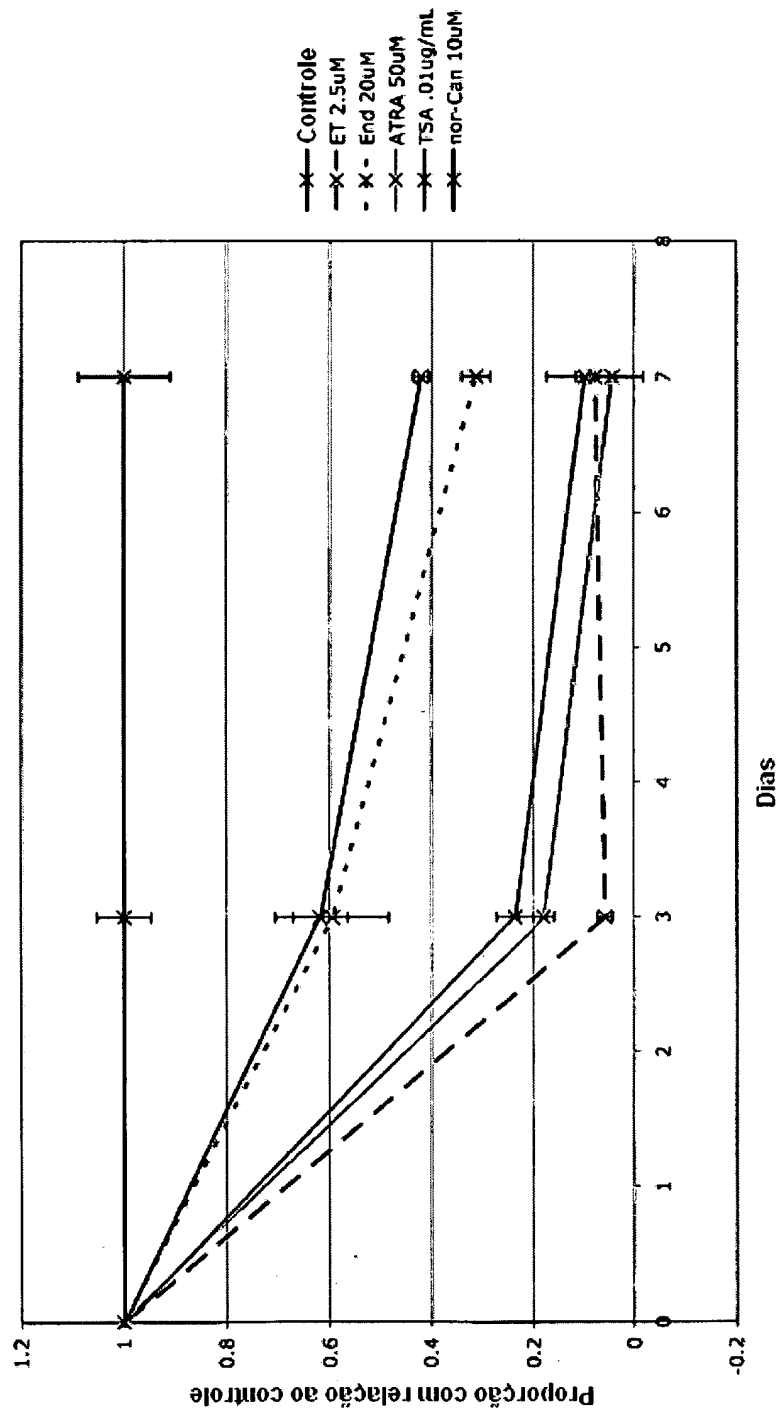


Fig. 6 Glioblastoma multiforme: linhagem U373

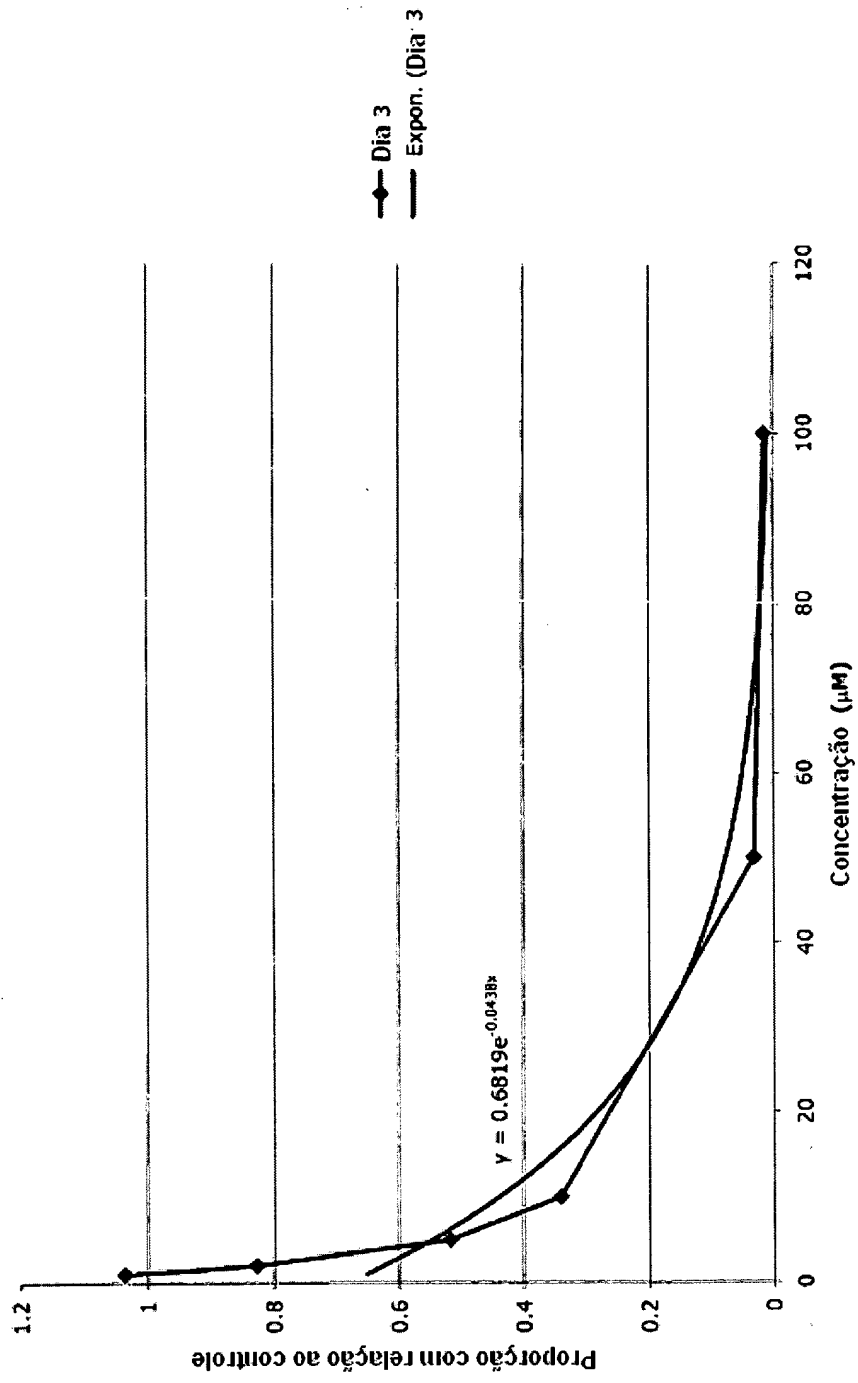


Fig. 7 Glioblastoma multiforme: Linhagem U373

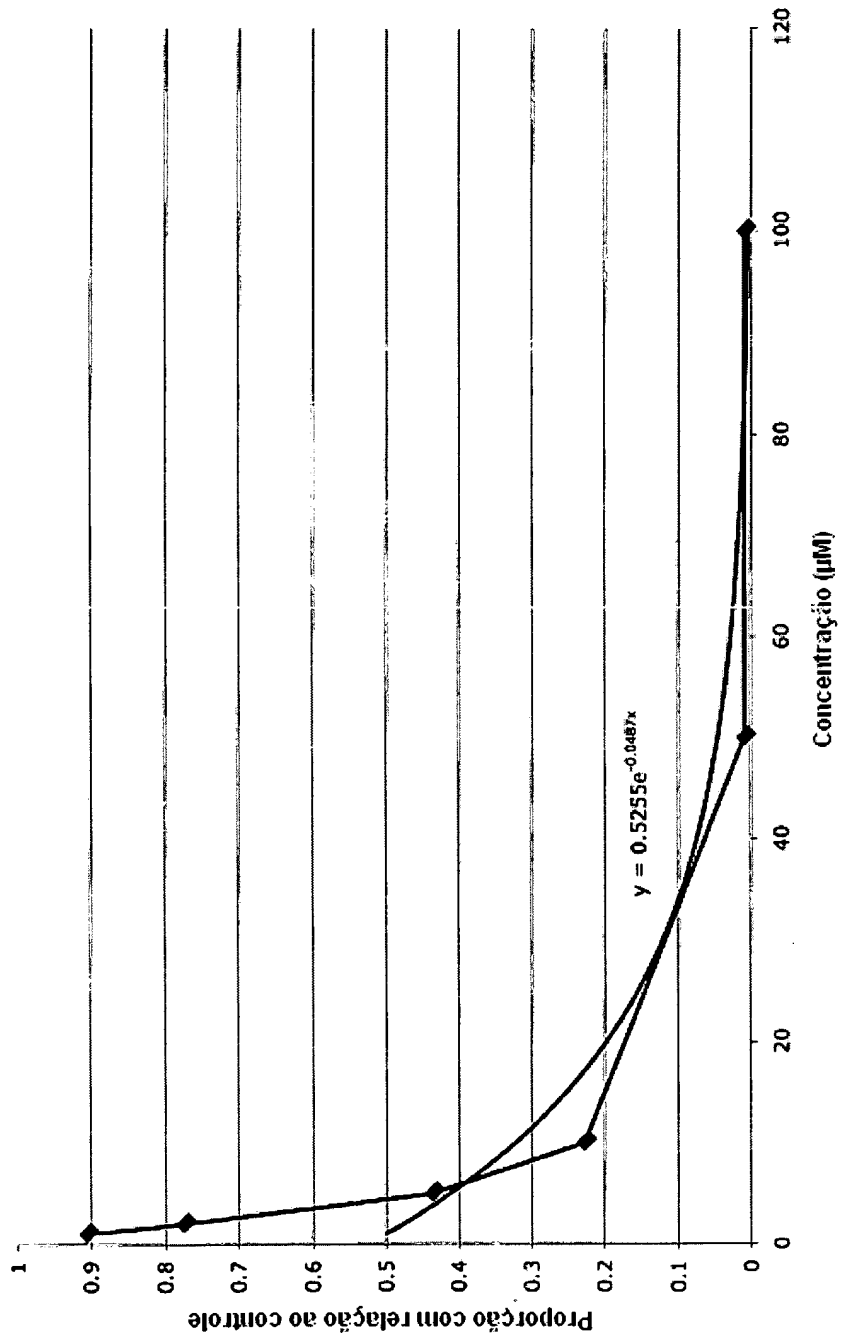


Fig. 8

Glioblastoma multiforme: Linhagem U373

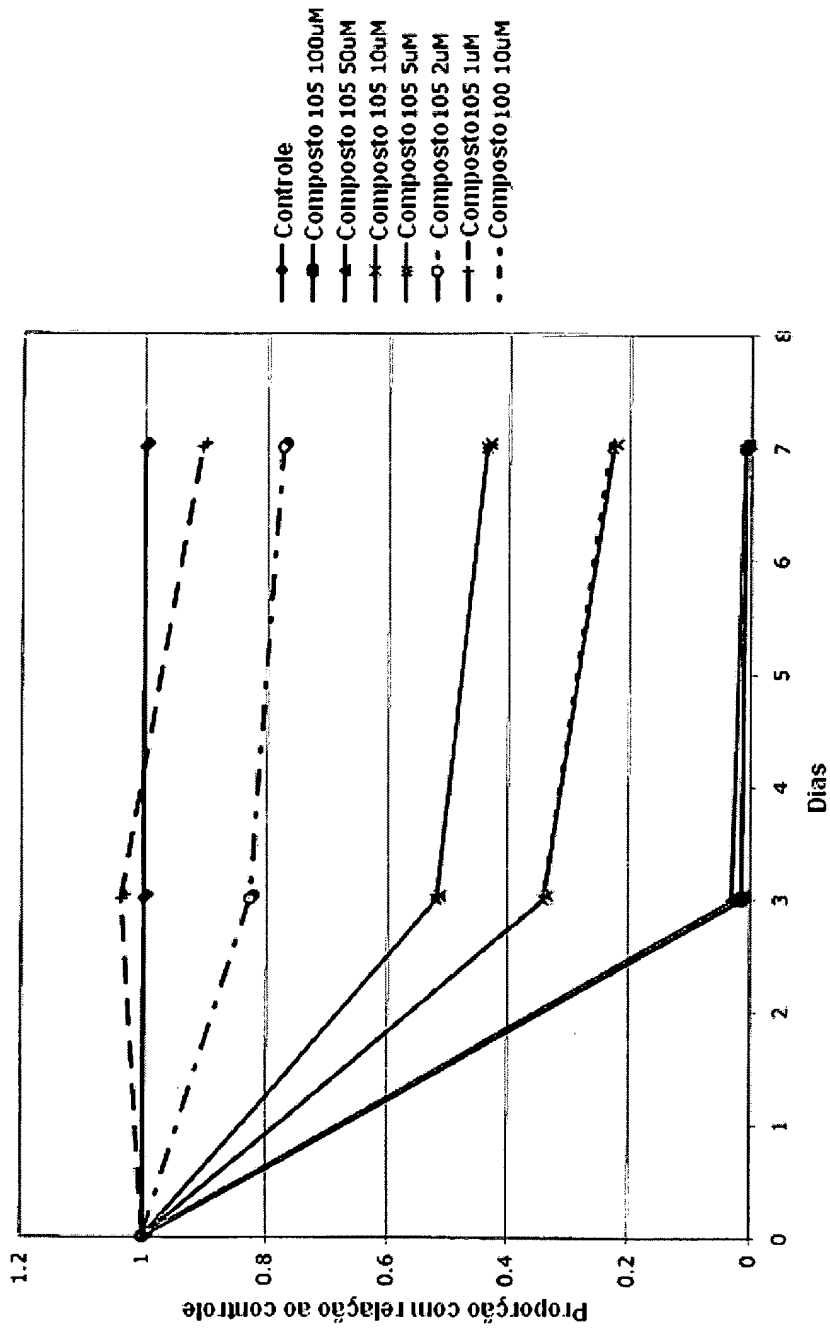


Fig. 9

Glioblastoma multiforme: Linha U373

Reação de Dosagem ao Composto 105 em Comparação com o Composto 100 a 10 µM

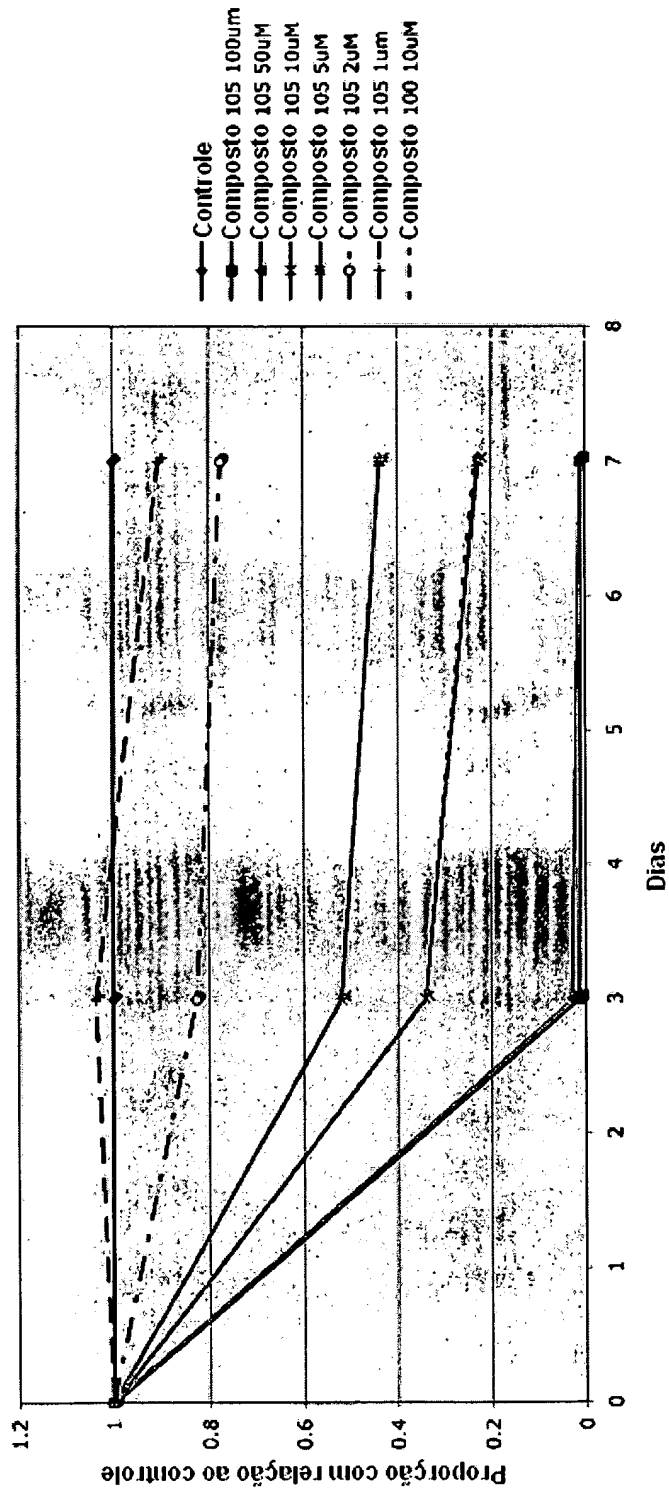


Fig. 10 Glioblastoma multiforme: Linhagem U373

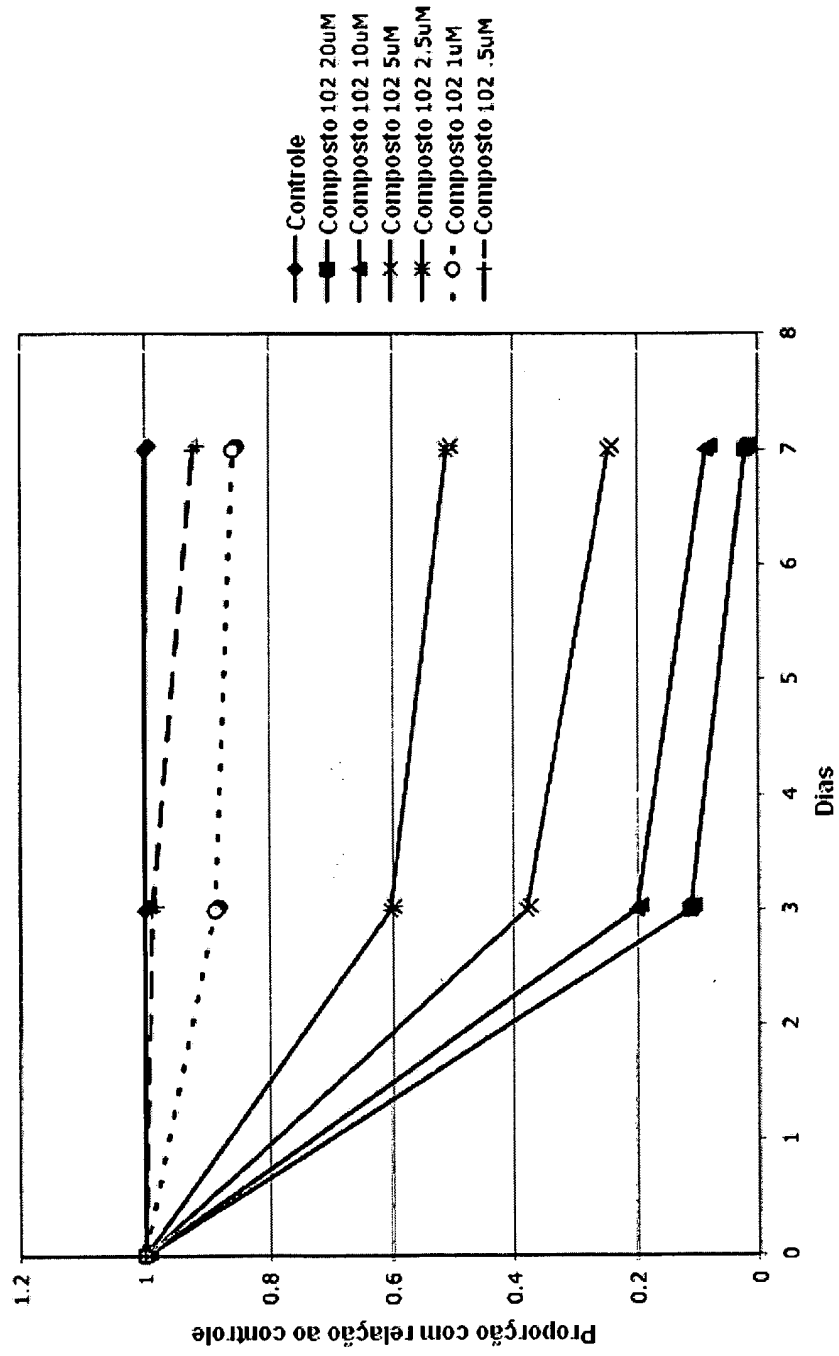


Fig. 11 Glioblastoma multiforme: Linhagem U373

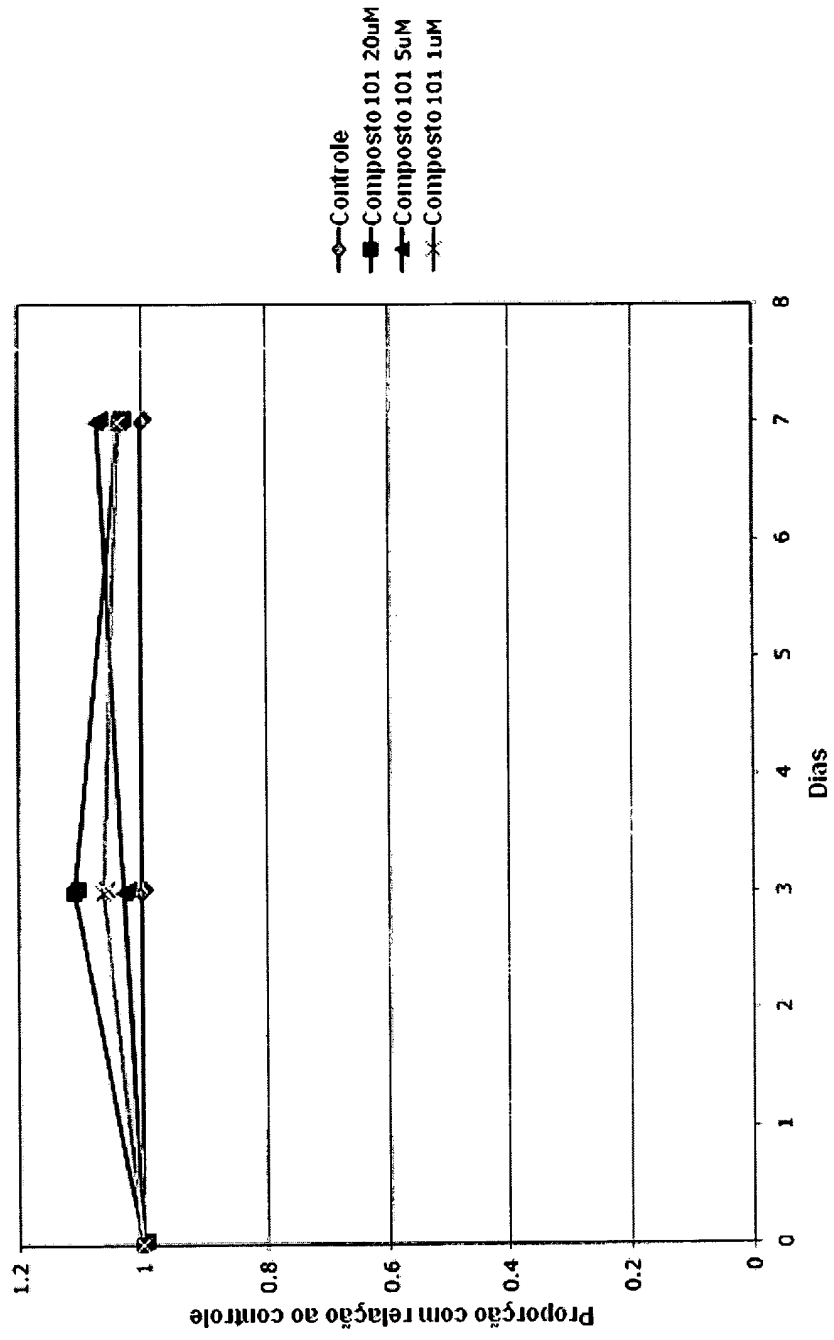


Fig. 12  
Glioblastoma multiforme: Linhagem U373

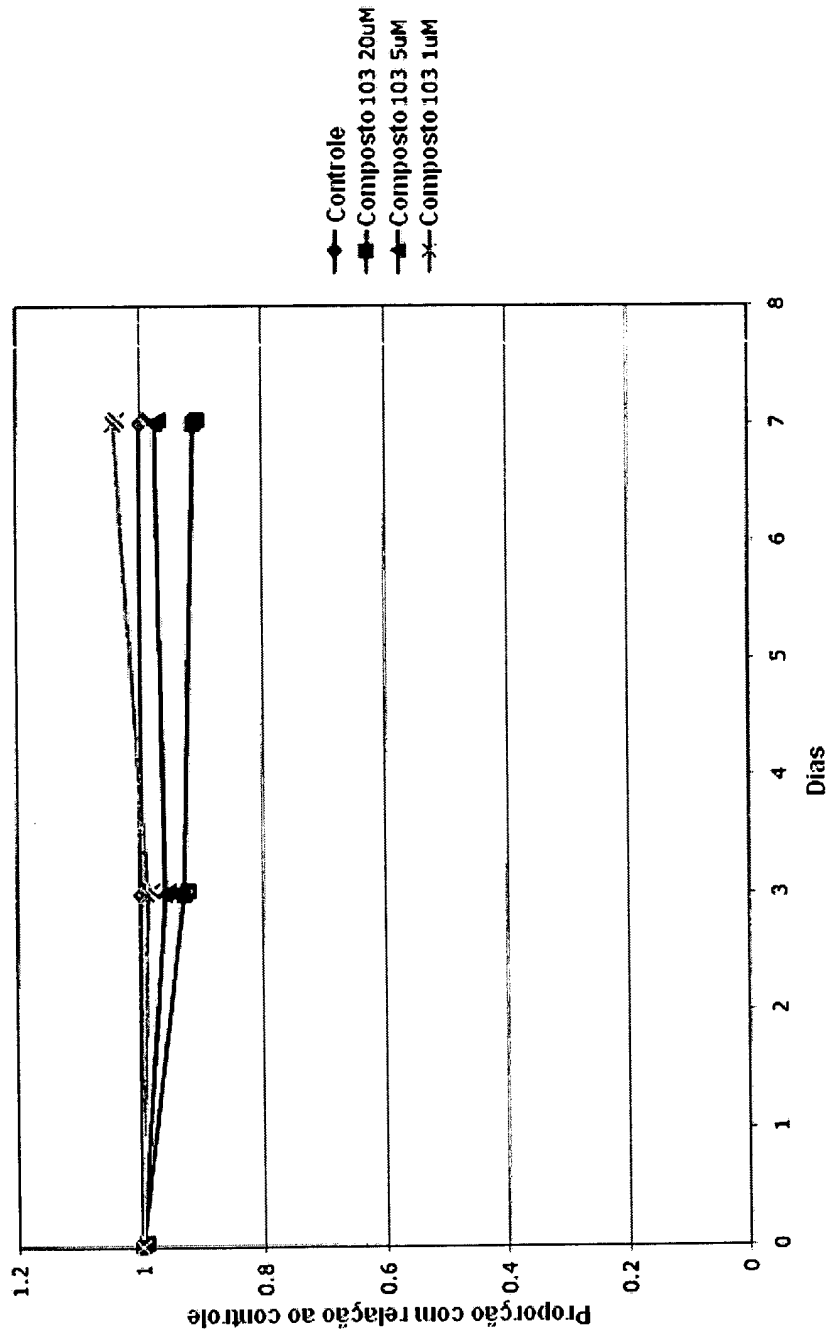


Fig. 13 Glioblastoma multiforme: Linhagem U373

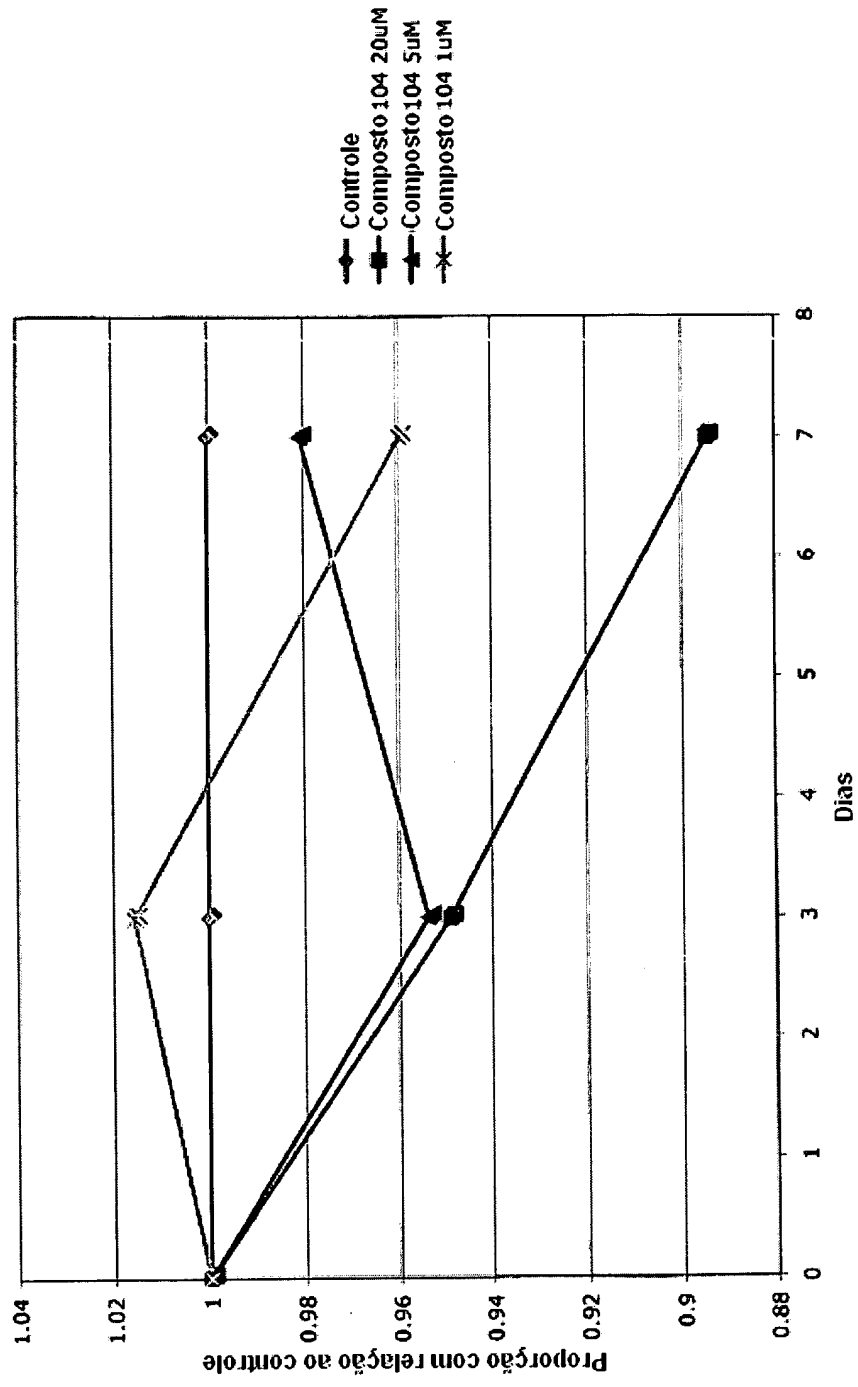


Fig. 14 Glioblastoma multiforme: Linhagem U373

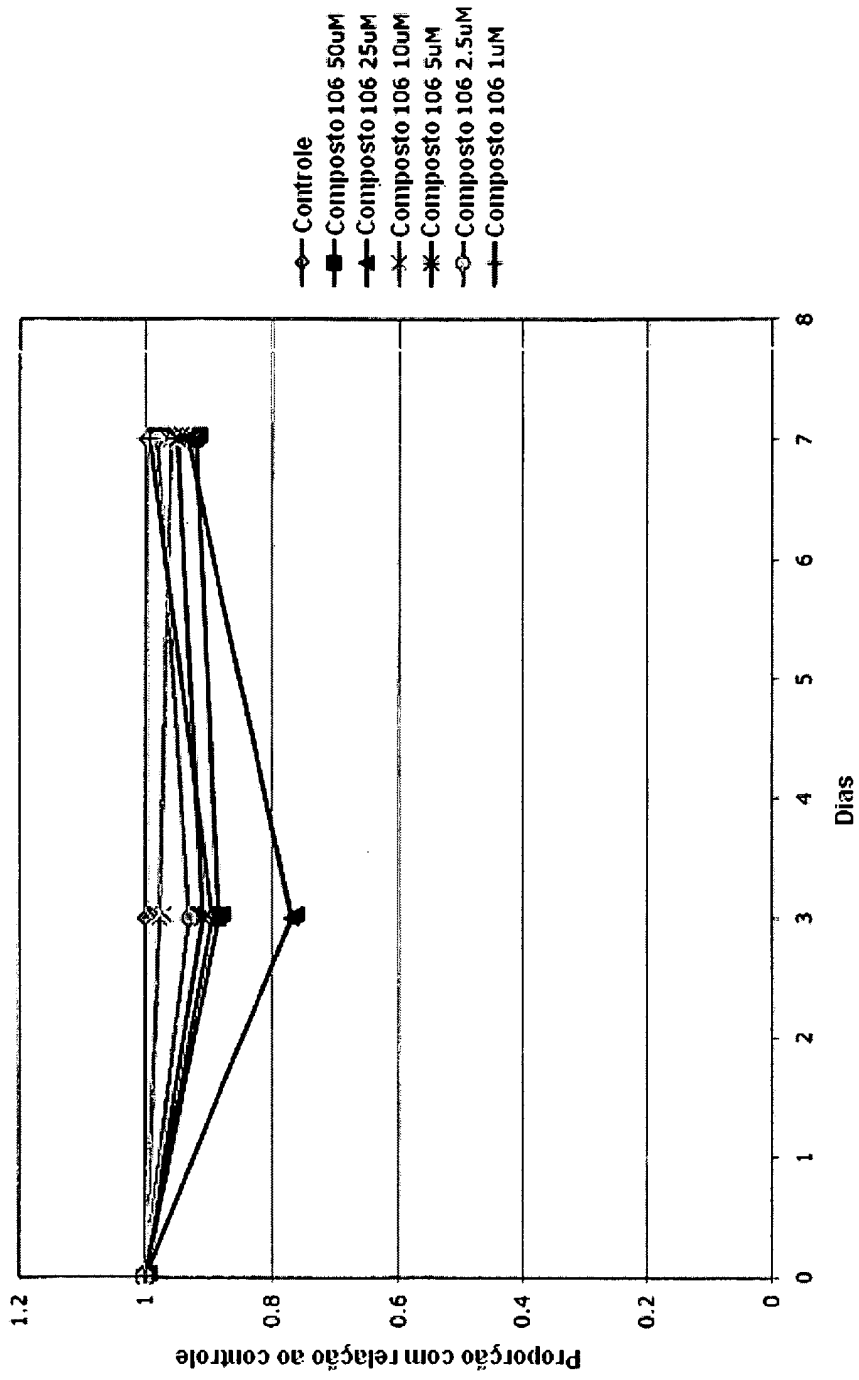


Fig. 15 Glioblastoma multiforme: Linhagem U373

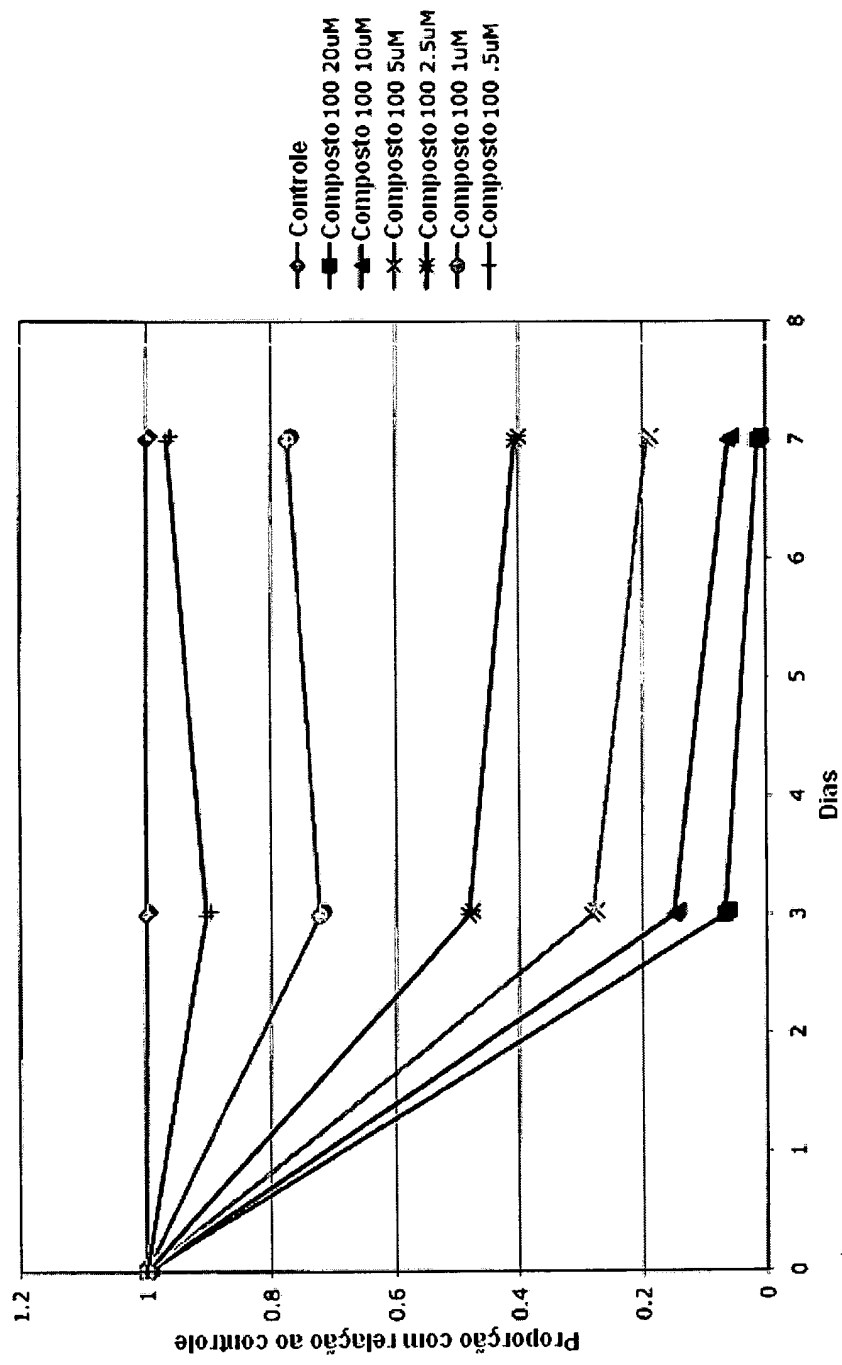


Fig. 16  
Medulloblastoma: Linhagem DAOY

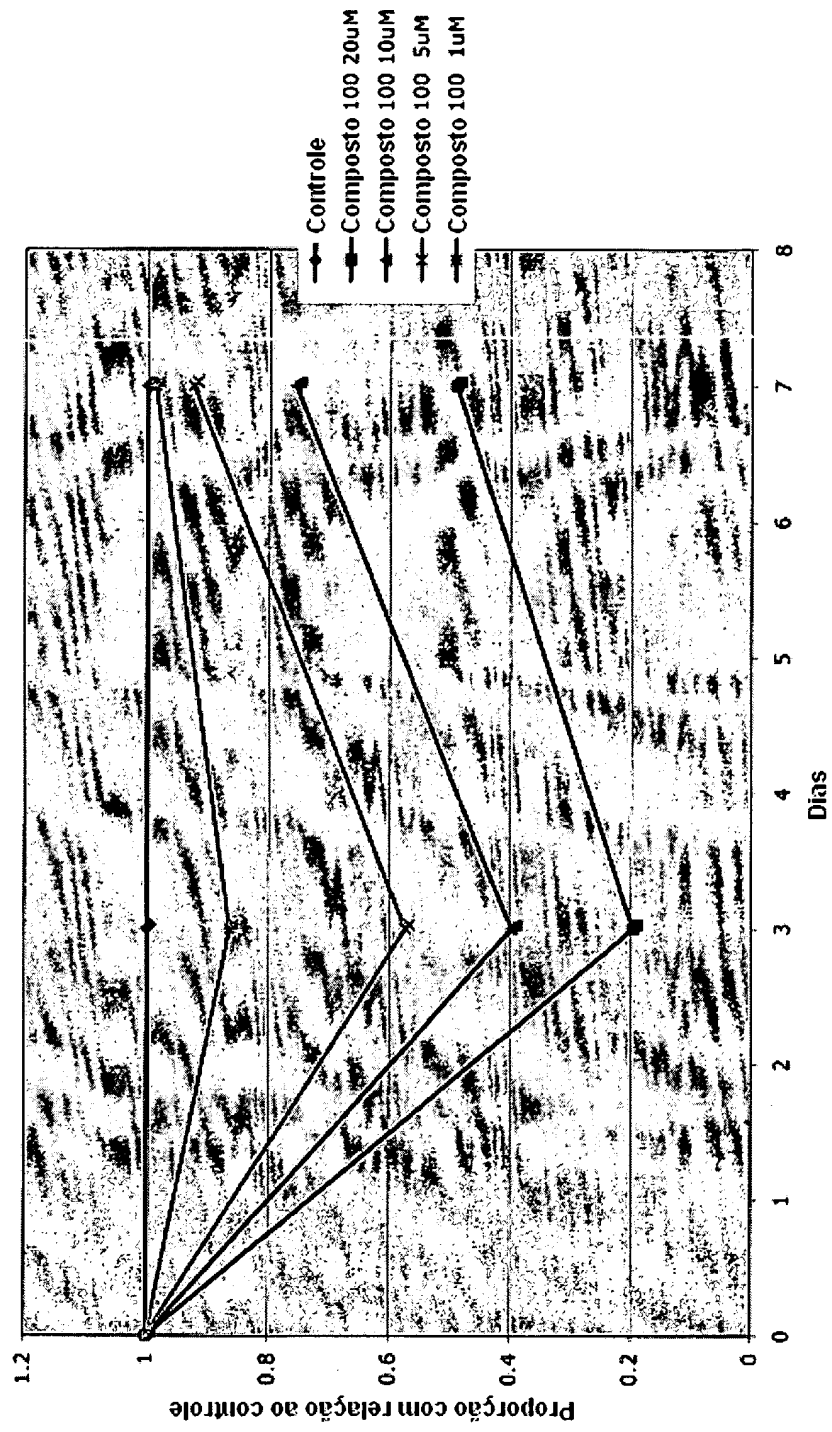


Fig. 17

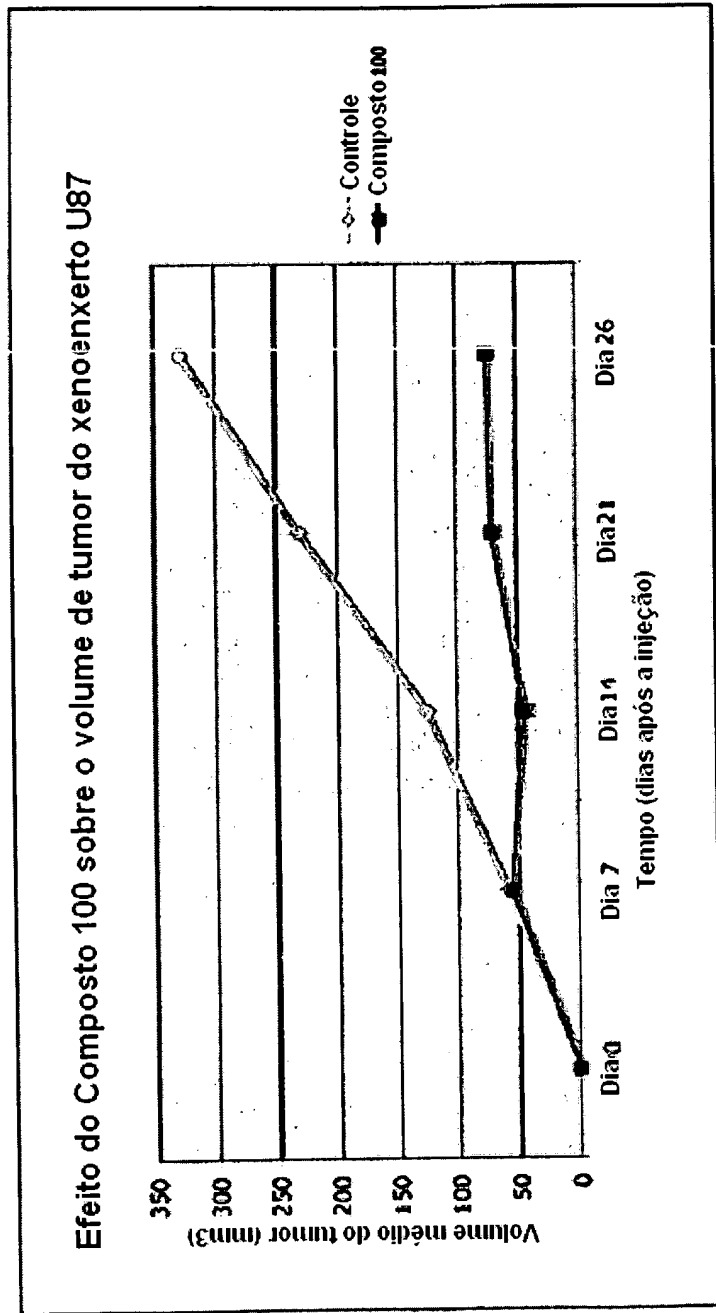


Fig. 18

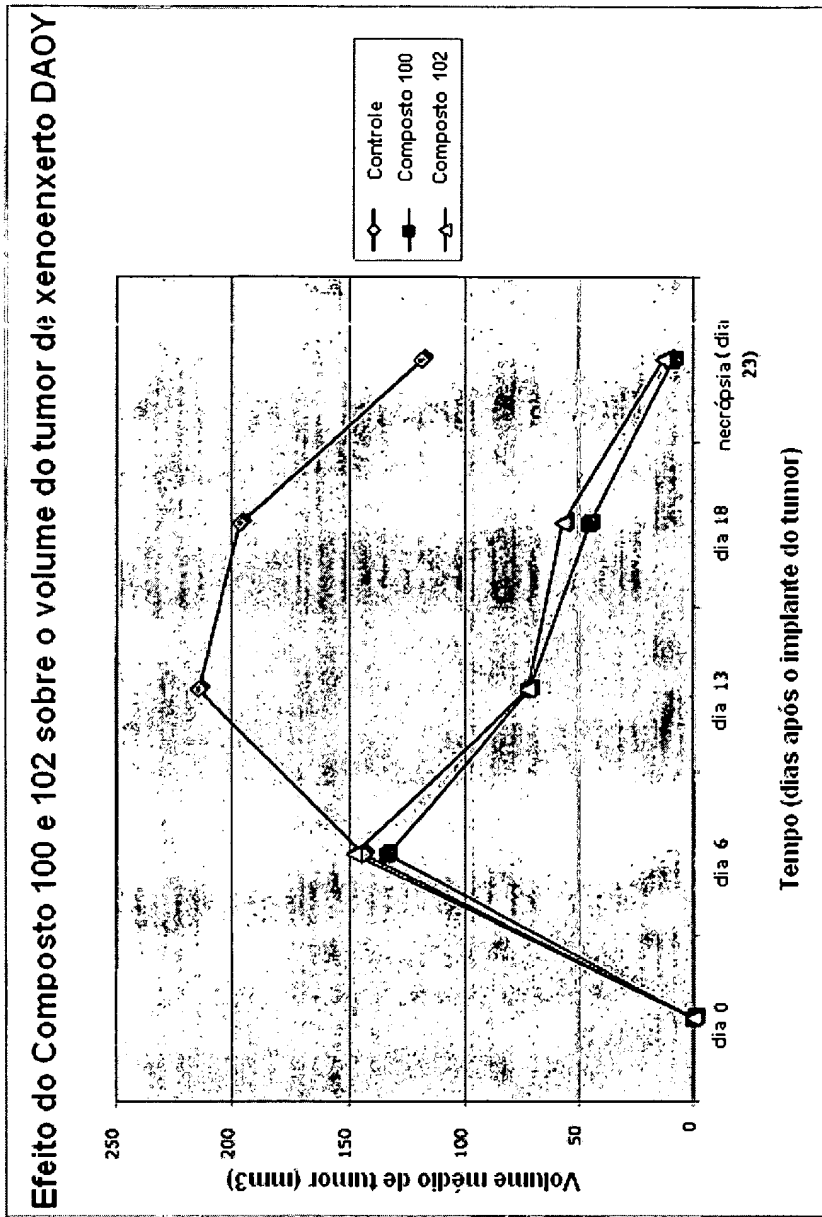
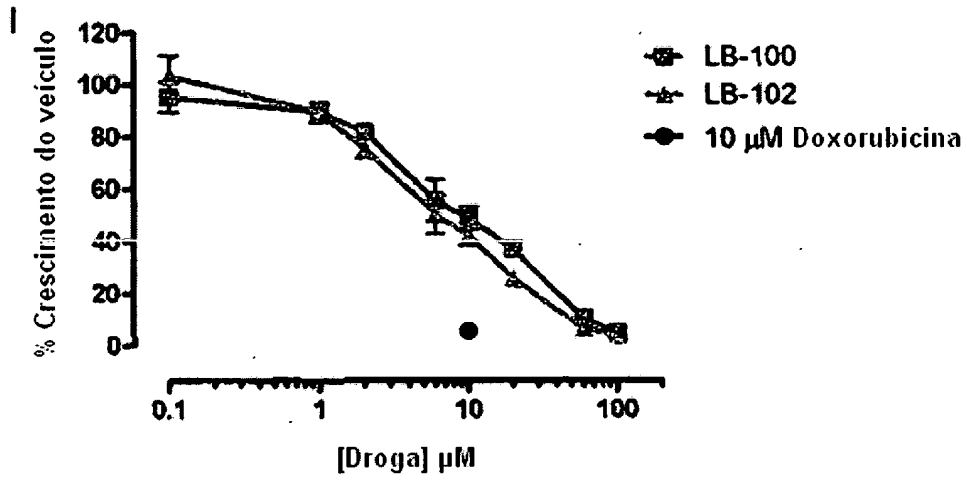


Fig. 19A



II

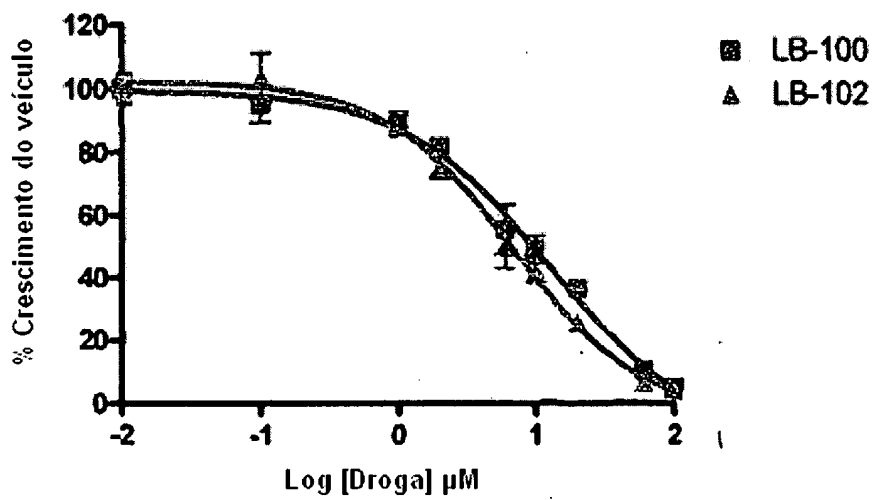


Fig. 19B

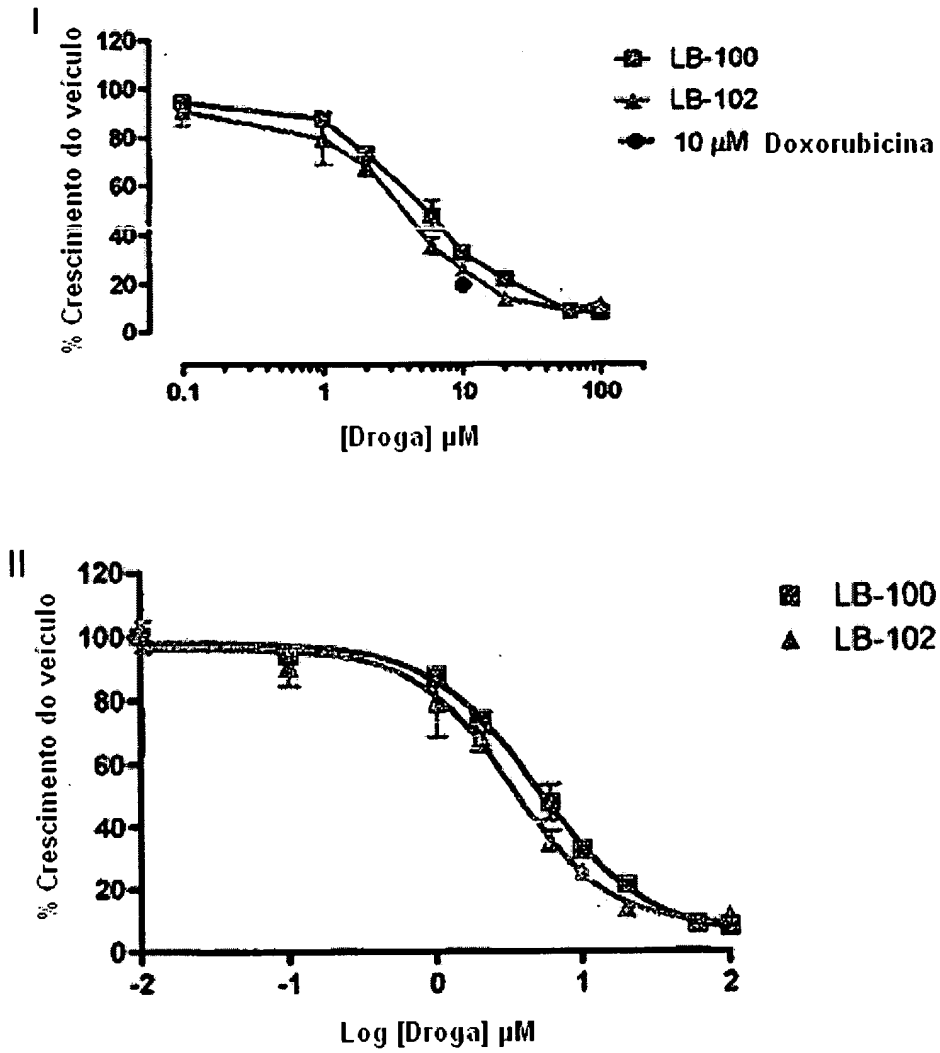


Fig. 19C

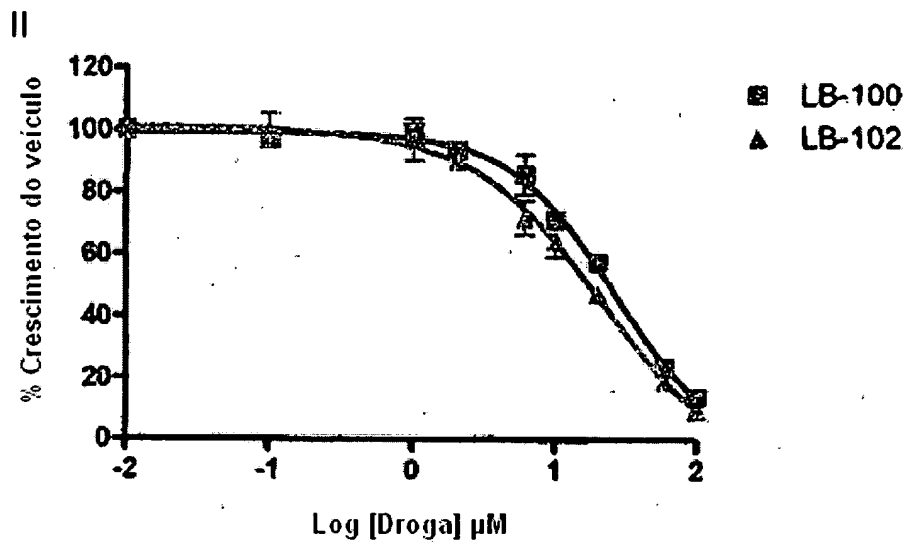
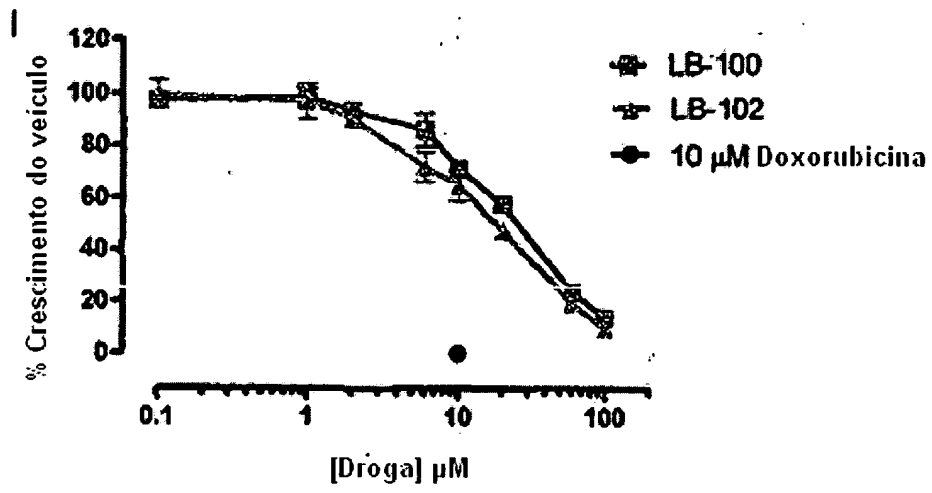
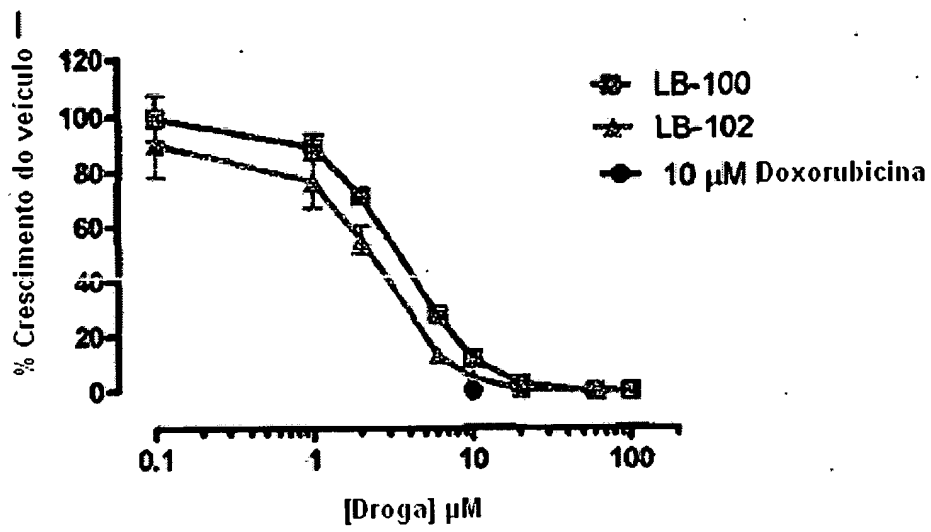
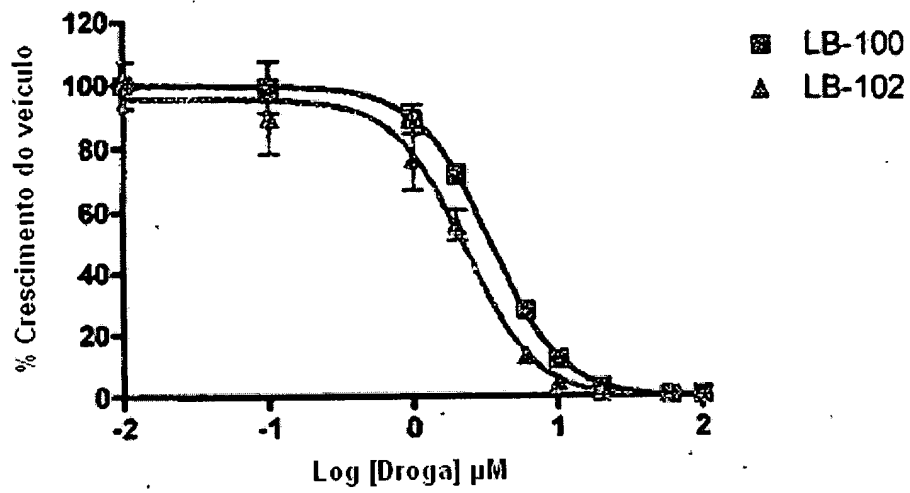


Fig. 19D



II



RESUMO

COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE  
PREPARAÇÃO DE UM COMPOSTO, MÉTODO DE CONTROLE DE VEGETAÇÃO  
INDESEJADA, MÉTODO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE  
5 VEGETAL, USO DO COMPOSTO

A presente invenção fornece compostos que possuem a  
estrutura que pode ser utilizada para o tratamento de  
tumores.