

(11) Número de Publicação: **PT 1567490 E**

(51) Classificação Internacional:

C07D 207/30 (2011.01) **C07D 307/34** (2011.01)
A61K 31/34 (2011.01) **A61K 31/40** (2011.01)
A61K 31/381 (2011.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2003.12.03**

(30) Prioridade(s): **2002.12.04 US 430681 P**
2003.10.17 US 511671 P
2003.10.20 US 512187 P

(43) Data de publicação do pedido: **2005.08.31**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.10.05**
234/2011

(73) Titular(es):

VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY
800 E. LEIGH STREET, SUITE 113 RICHMOND,
VA 23298 **US**

(72) Inventor(es):

MARTIN K. SAFO **US**
RICHMOND DANSO-DANQUAH **US**
SAMUEL NOKURI **US**
FAIK, N. MUSAYEV **US**
S GAJANAN JOSHI **US**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **AGENTES CONTRA A FALCIFORMAÇÃO**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PRESENTE PROPORCIONA COMPOSTOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DAS CÉLULAS FALCIFORMES. EM ESPECIAL, A INVENÇÃO PROPORCIONA AGENTES HETEROCÍCLICOS DE CINCO MEMBROS CONTRA A FALCIFORMAÇÃO, QUE SÃO MUITO EFICAZES E NÃO TÓXICOS, BEM COMO OS MÉTODOS PARA A SUA UTILIZAÇÃO. OS COMPOSTOS INCLUEM ANÁLOGOS E DERIVADOS DE 5-HIDROXIMETIL-2-FURFURALDEÍDO, 5-ETIL-2-FURFURALDEÍDO, 5-METIL-2-FURFURALDEÍDO E 2-FURFURALDEÍDO DE OCORRÊNCIA NATURAL E FORMAS DE PRÓFÁRMACO DO COMPOSTO.

RESUMO

"Agentes contra a falciformação"

A invenção presente proporciona compostos para o tratamento da doença das células falciformes. Em especial, a invenção proporciona agentes heterocíclicos de cinco membros contra a falciformação, que são muito eficazes e não tóxicos, bem como os métodos para a sua utilização. Os compostos incluem análogos e derivados de 5-hidroximetil-2-furfuraldeído, 5-etil-2-furfuraldeído, 5-metil-2-furfuraldeído e 2-furfuraldeído de ocorrência natural e formas de pró-fármaco do composto.

DESCRIÇÃO

"Agentes contra a falciformação"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da invenção

A invenção refere-se de um modo geral a agentes para o tratamento da doença das células falciformes. Em especial, a invenção proporciona a utilização de agentes heterocíclicos de cinco membros contra a falciformação, que são muito eficazes e não tóxicos, para o fabrico de um medicamento.

Antecedentes da invenção

A doença das células falciformes é um dos distúrbios genéticos hematológicos de maior prevalência mundial (Ingram, 1956; Pauling, et al. 1949), que ocorre como resultado de uma mutação pontual da Glu6 na Hb para a Val6 na hemoglobina falciforme (HbS). São conhecidas duas estruturas quaternárias da Hb, a conformação desoxi (tensa) e a conformação oxigenada (relaxada). Quando o equilíbrio alostérico é deslocado no sentido do estado relaxado, obtém-se uma Hb de alta afinidade, que rapidamente se liga e retém o oxigénio, enquanto o inverso é verdadeiro para o estado de tensão. Perutz (1970) e Baldwin e Chothia (1979) elucidaram com resolução atómica as estruturas tetraméricas das formas tensa (T) e relaxada (R) da Hb. O tetrâmero é composto por dois dímeros $\alpha\beta$, que estão dispostos em torno de um eixo duplo de simetria. Este arranjo produz uma cavidade central de água, com duas aberturas: as fendas α e β . A tensão do estado T é devida a pontes salinas cruzadas com pontes de hidrogénio entre as subunidades, bem como à ligação preferencial de um efector alostérico nativo da Hb, o 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), que estabiliza o estado T formando pontes salinas entre as duas subunidades β (Arnone, 1992). A transição de T para R ocorre como resultado da incorporação de oxigénio, que leva à quebra de muitas das

interacções entre as subunidades do estado T, bem como à expulsão do 2,3-DPG. A transição alostérica resulta numa rotação de 12–15° do dímero $\alpha_1\beta_1$ relativamente ao dímero $\alpha_2\beta_2$ (Baldwin e Chothia, 1979). A estrutura do estado R tem uma menor cavidade central de água, bem como menos pontes salinas e pontes de hidrogénio entre as subunidades. Durante muito tempo acreditou-se que o equilíbrio alostérico da Hb inerente ao modelo MWC de dois estados (Monod, et al., 1965) envolvia apenas a transição de T para R e que a estrutura quaternária do estado T era a única conformação relaxada. No entanto, estudos cristalográficos recentes e outros revelaram a existência de múltiplos estados relaxados da Hb, incluindo o R2 e outros que existem em solução com o estado R (Silva, et al. 1992; Smith, et al., 1991. Mueser, et al., 2000). Existe ainda uma controvérsia sobre a importância fisiológica de todos estes estados relaxados e como estes se relacionam entre si na alosteria da Hb. Silva et al., (1992) e Smith et al., (1991) sugeriram que a estrutura quaternária R2 é um intermediário entre as estruturas T e R. Uma nova análise mostrou que o estado R2 não é um intermediário na transição de T para R, mas sim outra estrutura relaxada de estado final (Janin e Wodak, 1993; Doyle, et al., 1992). Srinivasan e Rosa (1994) sugeriram ainda que o estado R2 pode ser o estado final fisiologicamente relevante e que a estrutura R é uma estrutura intermediária presa entre os estados R2 e T devido a condições de cristalização de sal elevado. Por outro lado, crê-se que a formação da estrutura R2 é favorecida por condições de sal baixo, que reproduzem as condições *in vivo* (Silva et al., 1992; Srinivasan e Rose, 1994).

A Hb e a HbS têm posições quase idênticas em todos os aminoácidos, mesmo na hélice A das cadeias onde ocorre a mutação. A presença da Val6 resulta numa interacção hidrofóbica entre a região de mutação de uma molécula de Hb e uma região definida pela Phe85 e pela Leu88 no grupo heme da outra molécula de Hb. Esta interacção ocorre apenas na HbS desoxigenada (desoxiHbS) e induz a polimerização das moléculas desoxiHbS para a forma de fibras. A formação de polímeros de HbS faz com que os normalmente flexíveis eritrócitos adoptem

as formas rígidas do tipo foice que bloqueiam os pequenos vasos capilares e causam danos ao tecido local e muita dor. A doença caracteriza-se também por outros sintomas, incluindo hemólise, que dá origem a anemia e icterícia, a elevação do nível de bilirrubina, que conduz a incidência alta de pedras na vesícula, e ao comprometimento da função excretora hepática. Outras características clínicas incluem ulceração nas pernas, pneumonia, aumento do fígado e do baço. Estudos sobre a gelificação da desoxiHbS e diversas variantes da Hb também forneceram informações essenciais sobre outros pontos de contacto na Hb que são importantes para estabilizar as fibras da HbS (Adachi e Asakura, 1980; Bunn, et al., 1986). Existem várias estratégias terapêuticas para tratar a doença das células falciformes (DCF), incluindo as seguintes: (1) *Modulação farmacológica da hemoglobina fetal (HbF)*. Foi demonstrado que a HbF diminui a polimerização da HbS e conhecem-se vários agentes que induzem a formação de HbF possivelmente pela reactivação do interruptor genético da HbF (Olivieri e Weatherall, 1998). Entre os exemplos de tais agentes constam a 5-azacitidina, hidroxiureia e citosina arabinosido (Mehanna, 2001). Infelizmente, esta terapia a doses e frequências de administração elevadas resulta em graves efeitos colaterais tóxicos (Edelstein, 1985). (2) *Transplante de medula óssea*. O transplante de medula óssea tem também sido utilizado como terapia de substituição total de genes da HbS em casos extremos (Hillery, 1998, Johnson, 1985). Esta abordagem é muito cara e tem as suas próprias toxicidades e riscos inerentes (Hillery, 1998). (3) *Transfusão de sangue*. Esta é uma das mais comuns terapias da DCF, no entanto, transfusões de sangue repetidas estão associadas ao risco de doenças infecciosas, sobrecarga em ferro e reacções alérgicas (Ballas, 1999). (4) *Opióides analgésicos*. Esta terapia é necessária para tratar crises de dor, no entanto, a terapia opióide resulta frequentemente em dependência e/ou convulsões e/ou depressão, (Ballas, 1999). (5) *Agentes que actuam na membrana eritrocítica*. Uma vez que o processo de falciformação depende parcialmente da concentração intracelular de Hb falciforme, os agentes que induzem o aumento do volume celular (Asakura, 1980) ou inibem a desidratação celular (Orringer e

Berkwitz, 1986) poderão diminuir a concentração de HbS e ajudar a retardar o processo de polimerização. (6) Agentes anti-gelificação ou modificadores da HbS. Estes compostos interferem com o mecanismo de polimerização através da ligação directa ao(s) local(is) de contacto da desoxiHbS ou próximo deste(s), inibindo o processo de polimerização, ou actuam directamente na HbS, deslocando o equilíbrio alostérico no sentido da mais solúvel HbS de alta afinidade.

No sangue, a Hb está em equilíbrio entre os estados T e R. A Hb fornece oxigénio através de um mecanismo alostérico e a capacidade da Hb para libertar ou incorporar o oxigénio pode ser regulada por efectores alostéricos. O equilíbrio alostérico entre os estados T e R (Figura 1) mostra uma curva do equilíbrio oxigénio-hemoglobina (OEC) típica da Hb, ou seja, um gráfico da percentagem de oxigénio ligado à Hb em função da pressão parcial de oxigénio. Quando o equilíbrio alostérico é desviado no sentido do estado relaxado (desvio da curva para a esquerda), obtém-se uma Hb de alta afinidade, que mais rapidamente se liga e retém o oxigénio, ao passo que um desvio no sentido do estado T (desvio da curva para a direita) resulta numa Hb de baixa afinidade, que mais facilmente liberta o oxigénio. Um aumento no efector alostérico de ocorrência natural, o 2,3 DPG, nos eritrócitos desloca a OEC para a direita, tal como sucede com um aumento de temperatura e uma diminuição de pH (Reeves, 1980). Um aumento de pH e uma diminuição de temperatura e dos níveis de DPG desviam a OEC para a esquerda. O grau de desvio da OEC é expresso como um aumento ou diminuição da P_{50} (pressão parcial de oxigénio em 50% de saturação de Hb). O controlo do equilíbrio alostérico no sentido da conformação relaxada tem sido de interesse na medicina. Em especial, compostos não tóxicos que se ligam eficientemente a HbS e produzem HbS de alta afinidade que não polimeriza foram avaliados clinicamente como agentes contra a falciformação para tratar a DCF. Verifica-se actualmente uma necessidade de identificar compostos destes, para serem utilizados como agentes contra a falciformação no tratamento da doença das células falciformes (anemia falciforme). Ver, por exemplo, o uso de vanilina (Abraham, 1991), 12C79

(Fitzharris, 1985), furfural (Zaugg, et al., 1997) e isotiocianatos substituídos (Park, et al. 2003).

Entre as várias outras técnicas anteriores, Lee et al., Kor. J. Herbology, Vol. 2-17, pp. 145-149 (2002) revelam a determinação quantitativa de 5-hidroxi-2-furaldeído (5-HMF) de "Rehmanniae Radix Preparata" (extracto da raiz da dedaleira chinesa) de acordo com vários métodos de processamento.

De igual modo, Hwang et al., Kor. J. Pharmacogn., vol. 32(2), pp. 116-120 (2001) divulgam que o 5-HMF de "Rehmanniae Radix Preparata" foi isolado da fracção de EtOAc e identificado em várias fases de processamento, revelando que as amostras processadas menos do que uma a nove vezes de cozedura mostram tendência de aumento do teor de 5-HMF.

Entre outras técnicas da arte prévia, JP 92-16821 A divulga um agente para melhoria do fluxo sanguíneo com um efeito farmacêutico estável, utilizando um derivado de 5-hidroximetilfurano específico para curar doenças causadas por deficiências na circulação periférica.

Entre outras técnicas da arte anterior, em US 6 521 927 B1 são revelados métodos para o tratamento da anemia falciforme por meio de um aldeído orgânico protegido, onde é melhorada a biodisponibilidade do aldeído terapêutico administrado por via oral.

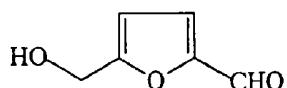
Entre outras técnicas da arte prévia, CN 1302657 A divulga um medicamento chinês contendo "Radix Rehmanniae Preparata" para o tratamento de tumores do sistema hemopoiético, como leucemia, beta-talassemia e anemia falciforme.

RESUMO DA INVENÇÃO

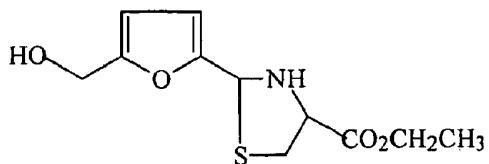
A presente invenção proporciona a utilização de compostos que são agentes contra a falciformação extremamente eficazes, específicos e não tóxicos, entre os quais consta o 5-

hidroximetil-2-furfuraldeído de ocorrência natural (5HMF ou AMS-13) e um seu pró-fármaco.

De acordo com a invenção, o composto é seleccionado de



e o seu pró-fármaco de



A invenção prevê a utilização dos compostos atrás referidos no fabrico de um medicamento para tratamento dos sintomas de pacientes que sofrem de anemia falciforme, tais como icterícia e níveis elevados de bilirrubina.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1. Os efeitos da temperatura, pH e níveis de DPG na curva de equilíbrio oxigénio-Hb.

Figura 2. Estruturas de alguns compostos furânicos, bem como de outros avaliados no presente pedido.

Figura 3. Curvas de saturação de oxigénio em suspensões de células SS na ausência (1) e na presença de vanilina 5 mM (2), FUF (3) e 5HMF (4). Note-se o desvio significativo para a esquerda causado pela adição de 5HMF.

Figura 4. Estudos por HPLC de permuta catiónica do hemolisado de células SS após reacção com 5HMF. O pico 1 corresponde a HbS normal, enquanto o pico 3 corresponde a HbS modificada. O pico 2 representa HbS1, um componente menor que se separa e é eluído antes do pico maior da HbS.

Figura 5. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier do controlo e na presença de 5HMF (AMS-13) - ratos transgénicos portadores de doença das células falciformes tratados.

Figura 6. Tempo de sobrevivência médio do controlo e com 5HMF (AMS-13) - ratos transgénicos portadores de doença das células falciformes tratados.

Figura 7. O efeito de 5HMF (AMS-13) na percentagem de células falciformes no sangue arterial de ratos transgénicos portadores de DCF tratados que foram expostos a severa hipoxia (5% de oxigénio). Sem tratamento (controlo), a percentagem de células falciformes aumentou consideravelmente e o animal morreu num espaço de 15 min. O tratamento prévio dos ratos com 5HMF prolongou o tempo de sobrevivência significativamente. O fármaco reduziu igualmente a percentagem de células falciformes.

DESCRICAÇÃO PORMENORIZADA DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona agentes contra a falciformação. Os agentes são compostos heterocíclicos de cinco membros à base da substância de ocorrência natural 5HMF.

Os compostos da invenção presente exibem uma actividade anti-falciformação elevada, especificidade e toxicidade muito baixa.

A invenção proporciona ainda a utilização de um pró-fármaco de 5HMF, de acordo com a reivindicação 1 e conforme especificado na página 6, no fabrico de um medicamento para o tratamento da doença das células falciformes. Um "pró-fármaco" geralmente significa uma forma de um composto que contém pelo menos um grupo químico "protector", cuja presença protege o grupo, por exemplo, a porção aldeído de um composto contra o metabolismo/degradação, até o pró-fármaco se encontrar num ambiente adequado para remoção do(s) grupo(s) protector(es) e "libertar" a forma activa do composto. O efeito geral do grupo de protecção é aumentar a biodisponibilidade de, por exemplo,

o composto activo aldeídico, uma vez que o composto é revertido ao aldeído.

A presente invenção proporciona a utilização de acordo com a reivindicação 1 para o tratamento da doença das células falciformes.

Os compostos da invenção presente são potentes agentes contra a falciformação. Os peritos na especialidade reconhecerão que a quantidade de um tal agente que pode ser administrada a um paciente dependerá vários factores, incluindo mas não lhes estando limitados, o volume de sangue, hematórito, idade do paciente, sexo, peso, saúde física geral, presença de outros estados clínicos, o específico composto administrado e afins. No entanto, de uma maneira geral, a quantidade varia no intervalo de cerca de 50 a cerca de 1000 mg/kg e mais preferivelmente no intervalo de cerca de 100 a cerca de 750 mg/kg. Por exemplo, um doente adulto portador da doença das células falciformes, com um volume de sangue de 4 L e um hematórito de 25%, necessitará de cerca de 378 a 630 mg/kg do composto mais potente, o 5HMF, e mais preferivelmente a dose situa-se no intervalo 200 a 630 mg/kg.

Os compostos da invenção presente podem ser administrados por qualquer via adequada para a entrega de uma quantidade activa do composto ao paciente a ser tratado. A título de exemplo, o composto pode ser administrado na forma de cápsulas ou comprimidos sólidos, líquidos para administração oral, formulações injectáveis, etc. Os compostos podem ser fornecidos isoladamente ou em combinação com outros constituintes, na forma pura ou de sal (por exemplo, sais inorgânicos ou orgânicos, etc.). Além disso, os compostos podem ser formulados com transportadores, tais como transportadores aquosos ou à base de óleo, e podem ser acompanhados de conservantes (por exemplo, metilparabeno ou cloreto de benzilalcónio), tensioactivos, (por exemplo, o ácido oleico), solventes, elixires, agentes para dar sabor (no caso de administração oral), amido e outros materiais (de preferência, os materiais geralmente reconhecidos como seguros

(G.R.A.S.)). Numa concretização preferida, o composto é administrado como uma preparação para administração oral, num transportador aquoso ou à base de álcool.

De igual modo, o método de administração pode ser qualquer um entre uma grande diversidade de métodos bem conhecidos pelos peritos na especialidade, nomeadamente injecção pelas vias intravenosa, intradérmica, subcutânea, intramuscular e intraperitoneal; administração oral, rectal e bucal; administração transdérmica; inalação; etc. O método de administração pode ser por via oral. Além disso, os compostos da invenção presente podem ser administrados em conjunto com outros tratamentos conhecidos da doença das células falciformes, ou tratamentos de estados clínicos relacionados ou independentes (por exemplo, tratamento de anemia) e com outros regimes auxiliares benéficos, tais como suplementos dietéticos, regimes de exercício e afins.

Embora uma das utilizações principais dos agentes contra a falciformação da invenção presente seja tratar a doença das células falciformes, estes também podem ser usados noutras aplicações que beneficiem da desestabilização dos estados tensos (T) da hemoglobina e do desvio do equilíbrio alostérico a favor da Hb de alta afinidade, sob a forma de Hb no estado R2. Este aspecto da invenção será melhor ilustrado no Exemplo 5 adiante. Um ou mais compostos são administrados a um paciente em quantidade suficiente para alterar a capacidade de incorporação de oxigénio do sangue para um estado benéfico à erradicação do cancro. Além disso, tal como nos métodos descritos na Patente U.S. 5 705 521 de Abraham, os compostos desta invenção podem ser administrados a um paciente que está a ser ou será submetido a radioterapia, para aumentar a eficácia da radiação na destruição do cancro.

Os compostos podem igualmente ser utilizados para fins de investigação. Em especial, os compostos genéricos podem servir como estruturas de partida para a concepção racional de derivados e análogos. Entre os exemplos constam, mas não lhes estando limitados, outras formas de compostos mais ou menos

activas, ou mais ou menos estáveis, com propriedades de solubilidade modificadas, ou que tenham porções úteis para direcccionar os compostos para um local desejado, por exemplo, através da membrana celular. Como alternativa, os compostos aqui proporcionados podem servir como estruturas iniciais para a concepção de outras formas de pró-fármacos.

Um dos compostos utilizados na prática da invenção presente é o 5-hidroximetil-2-furfuraldeído de ocorrência natural (5HMF ou AMS-13). O 5HMF está presente em muitos alimentos, tais como batata-doce, frutas, mel, leite, cerveja, produtos de tomate, fumo de cigarro e café, onde a concentração é por vezes superior a 6 g/kg. Comercialmente, o 5HMF é preparado a partir da porção de frutose do açúcar.

Os métodos para sintetizar o composto pró-fármaco da invenção presente também se encontram aqui descritos, sendo esquemas sintéticos típicos dados no Exemplo 4 adiante. Estes métodos de síntese orgânica que envolvem a protecção de aldeídos são bem conhecidos pelos peritos na especialidade.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1 - Base estrutural para o potente efeito anti-falciformação de uma nova classe de compostos aldeídicos heterocíclicos de cinco membros: testes *in vitro* e estudos por cristalografia de raios X de compostos furânicos, 5HMF, 5MF, 5EF e FUF.

As estruturas químicas de 5HMF, 5MF, 5EF e FUF estão apresentadas na Figura 2.

O controlo do equilíbrio alostérico da Hb no sentido da conformação relaxada tem sido de interesse na área da medicina, porque os compostos que se ligam a HbS, produzindo HbS de alta afinidade e que não polimerizam foram avaliados clinicamente como agentes contra a falciformação para tratar a anemia falciforme. Dois desses compostos são a vanilina (Abraham, et al., 1991) e o 12C79 (Beddell, et al., 1984;

Fitzharris, et al., 1985; Orringer, et al., 1986). Ambos os compostos são aldeídos e formam aductos de base de Schiff com a Hb. Estudos clínicos com 12C79 (Figura 2) mostraram que a perfusão intravenosa deste composto (40 mg/kg) em pacientes com DCF resultou na formação de aductos composto-Hb a níveis superiores a 30%, sem quaisquer efeitos adversos (Orringer, et al., 1988). A vanilina (Figura 2) é um composto para dar sabor aos alimentos e, uma vez que é relativamente não tóxico, torna-se um agente terapêutico muito atraente para a DCF. Uma estrutura de baixa resolução da Hb do estado T complexada com vanilina mostrou que o composto se liga em dois locais diferentes: um local principal perto de His103, Cys104 e Gln131 e um local secundário entre His116 e 117His (Abraham, et al., 1991). Com base em resultados de análises cristalográficas por raios X e estudos funcionais, Abraham, et al., (1991) sugeriu que a vanilina actua com vista a diminuir a polimerização da HbS, através do desvio do equilíbrio alostérico no sentido da molécula de HbS de alta afinidade na forma do estado R, bem como através da inibição estereoespecífica da polimerização da HbS no estado T. Outros estudos com vários análogos da vanilina por Abraham, et al., (1995) e Boyiri, et al., (1995) mostraram que estes compostos, ao contrário da vanilina, ligam-se à Vall N-terminal da Hb no estado T e, inesperadamente, desviam a curva de equilíbrio no sentido oposto. Agentes como o ácido 5-formilsalicílico (FSA, Figura 2), que criam interacções de bases de Schiff com o azoto da Vall N-terminal e que proporcionam grupos para as pontes de sal e de hidrogénio com o dímero oposto (transversalmente ao eixo duplo da Hb), deslocam a curva de equilíbrio para a direita. Em contraste, agentes como o 3,5-dimetil-4-hidroxibenzoaldeído (DMHB, Figura 2), que também se ligam ao resíduo Val N-terminal da Hb no estado T, de maneira semelhante ao FSA sem quaisquer interacções de pontes salinas com o dímero oposto, deslocam a curva de equilíbrio para a esquerda.

Nos estudos presentes, combinámos a utilização de modificadores covalentes aldeídicos da Hb com o nosso conhecimento sobre o controlo molecular do equilíbrio

alostérico, para produzir compostos contra a falciformação potentes que deverão ser clinicamente seguros. Mais concretamente, avaliou-se o 5-hidroximetil-2-furfural (5HMF) e, para fins comparativos, vários dos seus análogos, incluindo o furfural (FUF), o 5-metil-2-furfural (5MF) e o 5-etil-2-furfural (5EF) (apresentados na Figura 2) quanto às suas propriedades anti-falciformação. Verificou-se que estes compostos deslocam significativamente o equilíbrio alostérico no sentido da Hb de alta afinidade e actuam também como potentes inibidores da falciformação de eritrócitos falciformes homozigóticos (SS). O 5HMF modifica a HbS em 70%, em comparação com 15% para a vanilina. O 5HMF também inibe *in vitro* a falciformação de células SS em 90%, ou seja, quatro vezes mais do que a vanilina. Além disso, estudos anti-falciformação *in vivo* com ratos transgénicos portadores da DCF mostraram que o 5HMF prolonga a vida dos ratos hipóxicos cerca de quatro vezes mais do que o controlo. O 5HMF é encontrado nos alimentos diários e possui uma DL₅₀ de 2,5-5,0 g/kg (US EPA, 1992), em comparação com 1,58 g/kg para a vanilina. Por conseguinte, temos agora um composto que é seguro, mais potente do que qualquer agente aldeídico contra a falciformação conhecido, capaz de atravessar os eritrócitos para reagir com a HbS e modificá-la. Além disso, o 5HMF constitui um ponto de partida ideal para o desenvolvimento de compostos mais potentes e seguros.

Estudos de cristalografia de raios X da Hb complexada com estes compostos indicam a presença de aductos de bases de Schiff de forma simétrica aos azotos da α Vall N-terminal da Hb. Notavelmente, dois tipos de co-cristais foram isolados durante estes testes: um tipo de cristal era composto pela estrutura quaternária da Hb no estado tenso ou de baixa afinidade em complexo com os compostos, e o outro tipo de cristal era composto de Hb de alta afinidade ou no estado relaxado (com uma estrutura quaternária R2) em complexo com os compostos. Além disso, constatou-se que os aldeídos heterocíclicos avaliados ligavam-se fortemente ao estado R2, mas fracamente ao estado T. A cristalização dos mesmos compostos com Hb ligada resultou apenas em cristais do estado

relaxado, o que é um indício da ligação fraca dos compostos. Estes resultados sugerem que os aldeídos heterocíclicos avaliados impedem a polimerização da hemoglobina falciforme (HbS) e inibem a falciformação dos eritrócitos SS através da estabilização da HbS no estado R2 de alta afinidade. Comparando as estruturas cristalinas de alta resolução do 5HMF e da vanilina ligados a Hb, pode ver-se que o 5HMF liga-se mais fortemente, uma indicação de que o 5HMF permanecerá mais tempo do local de ligação. Isso explica por que motivo o 5HMF é muito mais potente do que a vanilina. Mais importante ainda é o facto de a ligação mais forte do 5HMF à Hb se poder traduzir numa semi-vida ainda mais prolongada e numa maior biodisponibilidade do 5HMF relativamente à vanilina, com uma diminuição concomitante na dose terapêutica necessária. Os estudos biológicos e cristalográficos dos compostos furânicos revelarem pela primeira vez o mecanismo molecular exacto que explica os efeitos anti-falciformação dos aldeídos covalentemente modificados que se ligam aos azotos da α Vall N-terminal da Hb. Os compostos avaliados também representam uma nova classe de agentes potencialmente terapêuticos para o tratamento da doença das células falciformes.

Procedimento experimental

Materiais e procedimentos gerais. Os compostos vanilina, FUF, 5MF, 5EF e 5HMF foram obtidos de Aldrich Chemical Company. Eritrócitos normais (AA) foram recolhidas de doadores adultos. Células SS foram obtidas de pacientes com DCF. Hb purificada de ser humano adulto em tampão Bis Tris 50 mM, pH 6,8, foi preparada a partir de sangue humano descartado conforme descrito anteriormente (Safo e Abraham, 2003).

Estudos de saturação de oxigénio com sangue total normal. Amostras de sangue normal (hematócrito de 40%) na presença de FUF, 5MF, 5EF, 5HMF e vanilina 5 mM, (solubilizados em DMSO) foram equilibradas a 37 °C durante 1 hora. As amostras foram, em seguida, incubadas em tonómetros IL 237 (Instrumentation Laboratories, Inc. Lexington, MA) durante cerca de 10 min a 37 °C e deixadas a equilibrar a tensões de oxigénio de 7, 20 e

60 mmHg. As amostras foram aspiradas para um analisador automático de gases no sangue IL 1420 e para um CO-oxímetro IL 482 ou IL 682 (Instrumentation Laboratories) para determinar o pH, pCO_2 , pO_2 e os valores de saturação em oxigénio da Hb (sO_2). Os valores de pO_2 e sO_2 em cada nível de saturação de oxigénio foram então submetidos a uma análise de regressão não linear com o programa Scientist (Micromath, Salt Lake City, UT) para determinação dos valores do coeficiente de Hill (n_{50}) e de P_{50} . P_{50} é a pressão de oxigénio em mmHg à qual a Hb está 50% saturada com oxigénio. Um estudo de dose-resposta com 5HMF foi levado a cabo em concentrações de composto finais de 1 e 2 mM.

Estudos de saturação de oxigénio com eritrócitos falciformes homozigóticos. Células SS foram suspensas em PBS obtendo-se um hematórito final de 10%. Vanilina, FUF, 5HMF (solubilizados em DMSO) foram adicionados a esta suspensão em concentrações finais de 5 mM e incubou-se a 37 °C durante 1 hora. Uma alíquota de 40 uL da suspensão foi acrescentada a 4 mL de tampão Hemox e analisada quanto à saturação em oxigénio (37 °C) com um analisador Hemox (TCS Scientific Corp., Southampton, PA) (Asakura, 1979).

Transporte através da membrana de eritrócitos falciformes homozigóticos e a reacção com HbS. As células SS tratadas com o composto obtidas na experiência anterior (estudos de saturação de oxigénio com células SS) foram hemolisadas pela adição de 5 volumes de tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,4, contendo EDTA 0,5 mM. Após centrifugação, o hemolisado foi submetido a estudos de saturação de oxigénio com um analisador Hemox e a análise por HPLC de permuta catiónica com equipamento Hitachi (modelo: série D-7000) e uma coluna Swift WCX (PEEK WCX-SwiftTm: 50 mm x 4,6 mm, Isco, Inc., Lincoln, NE). A coluna foi operada com um gradiente linear da fase B desde 25% até 90% a 410 nm (fase móvel A: Bis-Tris 40 mM, EDTA 5 mM, pH 6,5. Fase B: Bis-Tris 40 mM, EDTA 5 mM, cloreto de sódio 0,2 M, pH 6,5). Os valores de formação do aducto de HbS (modificação da HbS) foram expressos em percentagens, usando a seguinte fórmula:

$$HbS\ modif.\ (\%) = \frac{\text{Área pico da Hb modificada}}{\text{Área pico Hb modificada} + \text{Área pico Hb não modificada}} \times 100$$

Estudos de anti-falciformação com eritrócitos homozigóticos falciformes. Os efeitos da vanilina e do FUF (testes comparativos) e do 5HMF (presente invenção) na inibição da falciformação de células SS foram avaliados como descrito anteriormente (Asakura e Mayberry, 1984). Resumidamente, células SS suspensas em solução salina tamponada, pH 7,4 (hematócrito de 10%) foram incubadas a 37 °C, com 4% de oxigénio e na presença de composto 5 mM. Aliquotas (10 ul) das suspensões foram obtidas volvidas 5 horas e fixadas com solução de glutaraldeído a 2% sem exposição ao ar. Análises de morfologia e da percentagem de células SS não falciformadas foram levadas a cabo por meio de um sistema de análise de imagens assistido por computador conforme descrito na literatura (Hijiya, 1991). Estudos de dose-resposta com FUF e 5HMF em concentrações de 1 e 2 mM foram também realizados.

O efeito de compostos no tamanho dos eritrócitos homozigóticos falciformes. Para estudar o efeito dos compostos no grau de hidratação/desidratação das células SS, as células SS tratadas com compostos obtidas na experiência anterior (estudos de anti-falciformação com células SS) foram avaliadas com um analisador de células Hemavet para determinar o volume corpuscular médio (VCM).

Testes de cristalização. Testes de cristalização para obter cristais nos estados T e R foram conduzidos com FUF e 5HMF. Os testes envolveram um excesso de 4-25 molar dos compostos em relação à Hb (tetrâmero). Para o teste de cristalização do estado T, os compostos solubilizados em DMSO foram incubados com desoxiHb (proteína de 60 mg/mL) durante pelo menos 1 hora para formar o aducto de base de Schiff. Cianoboro-hidreto de sódio, num excesso de 4-25 molar em relação à Hb, foi adicionado para reduzir o reversível aducto de base de Schiff à correspondente ligação covalente de

alquilamina. A cristalização subsequente de soluções do complexo composto-desoxiHb em tubos de ensaio de 10 mL, usando precipitante de sulfato/fosfato 3,2-3,6 M (pH 6,5) foi executada numa caixa de luvas sob atmosfera de azoto como descrito anteriormente (Safo, et al., 2003; Perutz, 1968) para obtenção de cristais do estado T em condições de sal elevado. É necessário reduzir o aducto de base de Schiff para se poder observar por cristalografia o composto ligado (Boyiri, et al., 1995). Inesperadamente, o teste resultou em dois cristais diferentes - um cristal rectangular (grupo espacial P₂₁), que é isomórfico ao cristal nativo do estado T, e num cristal trigonal (grupo espacial P₃₂1), que posteriormente veio a revelar uma conformação de estado relaxado sob a forma da estrutura quaternária R2. Os cristais do estado T cresceram entre 2 a 10 dias, enquanto os cristais do estado R2 cresceram entre 7 a 30 dias.

Foi desenvolvido outro teste para cristalizar os complexos composto-Hb no estado R utilizando monoxi-hemoglobina (COHb), segundo um procedimento descrito anteriormente (Safo, et al., 2003; Perutz, 1968). Solução de Hb oxigenada foi submetida a vácuo durante cerca de 10 minutos, e a resultante solução de desoxiHb foi totalmente saturada com CO para gerar COHb. Os compostos solubilizados em DMSO foram feitos reagir com a COHb, seguido por adição de cianoboro-hidreto de sódio para reduzir o aducto da base de Schiff. A cristalização foi realizada com uma solução de proteína de 30-50 mg/mL, fosfato de Na⁺/K⁺ 3,4-3,4 M, pH 6,4 e duas gotas de tolueno em tubos de ensaio de 10 ml. Os procedimentos experimentais foram levados a cabo em condições aeróbicas e obtiveram-se co-cristais (4-30 dias) isomórficos aos cristais nativos no estado R (grupo espacial P₄₁2₁2).

Recolha e processamento de dados, e refinamento de estrutura. Conjuntos de dados de difracção de raios X para os co-cristais nos estados R, R2 e T foram recolhidos a 100 K utilizando um sistema de refrigeração criogénica X-STREAM da Molecular Structure Corporation (MSC, The Woodlands, TX), um detector de placas de imagem R-Axis II equipado com espelhos

OSMIC é um gerador Rigaku RU-200 operando a 50 kV e a 100 mA. Antes da difracção, os cristais foram primeiro lavados numa solução crioprotectora contendo 50 µL de águas-mães e 10-12 µL de glicerol. Os conjuntos de dados foram processados através do programa de software MSC BIOTEX. Todos os refinamentos de estrutura e mapas OMIT foram realizados com o programa CNS (Brunger, et. al., 1998). O desenvolvimento e correcção de modelos foram realizados utilizando o programa gráfico TOM (Cambillau e Horjales, 1987).

Determinações e refinamentos de estrutura das estruturas dos complexos no estado R2. A estrutura do complexo FUF-Hb no cristal do estado R2 foi a primeira a ser determinada pelo método de substituição molecular (Navaza, 1994) usando a estrutura nativa da Hb no estado R2 $\alpha 1\beta 1-\alpha 2\beta 2$ (código PDB: 1BBB) como modelo. A função de translação utilizando o grupo espacial P3₂1 deu uma solução de um tetrâmero na unidade assimétrica com um coeficiente de correlação final de 69,2 e um Rfactor de 35,5% para valores entre 8,0-4,0 Å. Antes de utilizar a estrutura R2 como modelo, foi assumido para o cristal uma Hb no estado T sob outra forma de cristal. No entanto, o uso de uma estrutura no estado T (código PDB: D2H2B) como modelo não resultou numa solução clara. Uma pesquisa semelhante com uma estrutura no estado R (código PDB: 1AJ9) também não originou uma solução clara. O modelo de substituição molecular foi submetido a um refinamento de corpo rígido, seguido de minimização pelo método do gradiente conjugado e *simulated annealing*. Foram identificadas densidades fortes e claras para as duas moléculas de FUF ligadas aos resíduos α Vall N-terminais. O sítio de ligação da α Vall N-terminal localiza-se na cavidade de água central da Hb próxima da saída do domínio α . A densidade electrónica do composto ligado sobreponha-se à do azoto da α Vall, sugerindo uma interacção covalente entre FUF e o azoto. O mapa de densidade electrónica revelou igualmente ligação dos quatro átomos de Fe do grupo heme e ligantes de água foram ajustados à densidade. O ajuste alternativo de ligantes de O₂ resultou numa geometria distorcida das ligações e do ângulo em Fe-O-O. Vários ciclos alternados de minimização pelo método do

gradiente conjugado, *simulated annealing*, refinamentos individuais do factor B e a adição de 7 aníões sulfato e 297 moléculas de água, com correções manuais ao modelo, resultou num Rfactor final de 21,7% e um Rfree de 27,4% a uma resolução de 2,25 Å. Os dados cristalográficos da estrutura estão resumidos na Tabela 1.

O modelo inicial para o refinamento da estrutura do complexo 5HMF-Hb foi a estrutura FUF-Hb – após eliminação do FUF, moléculas de água e aníões sulfato. Um ciclo de corpo rígido, minimização por gradiente conjugado e refinamentos com *simulated annealing* também revelaram dois 5HMF ligados aos dois azotos da α Vall N-terminal relacionados por simetria. Em contraste com a estrutura FUF-Hb, moléculas de O₂ estavam ligadas aos átomos de Fe. Vários ciclos alternados de minimização pelo método do gradiente conjugado, *simulated annealing*, refinamentos individuais do factor B e a adição de 7 aníões sulfato e 538 moléculas de água, com correções manuais intermitentes ao modelo, resultou num Rfactor final de 18,3% e num Rfree de 22,3% a uma resolução de 1,85 Å. Os dados cristalográficos da estrutura 5HMF-Hb estão resumidos na Tabela 1. As coordenadas atómicas e os factores estruturais foram depositados no banco de dados de proteínas RCSB com os códigos de acesso 1QXD e 1 QXE para as estruturas de FUF-Hb e 5HMF-Hb, respectivamente.

Determinações e refinamentos de estrutura das estruturas dos complexo no estado T. O modelo inicial para o refinamento da estrutura de 5HMF-Hb no estado T foi a estrutura nativa isomórfica do estado T α 1 β 1- α 2 β 2 (código PDB: 2HHB). Após refinamento de corpo rígido e subsequente minimização por gradiente conjugado e *simulated annealing* os mapas de densidade electrónica, ao contrário das estruturas do complexo no estado R2, revelaram apenas densidades fracas e indefinidas nos locais de ligação da α Vall N-terminal. Repetidos ciclos de refinamentos, adição de moléculas de água e desenvolvimento de modelos não apresentaram maior densidade no local de ligação de forma a modelar com sucesso o 5HMF. Não eram aparentes outros locais de ligação. O Rfactor e o Rfree finais para as

estruturas 5HMF-Hb eram 16,3% e 20,7% respectivamente, a uma resolução de 1,86 Å. Outros dados estatísticos do cristal estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Dados cristalográficos, recolha de dados e parâmetros do refinamento das estruturas dos complexos com Hb				
	FUF (estado R2)	5HMF (estado R2)	5HMF (estado T)	FUF (estado R)
Recolha de dados				
Grupo espacial	P3 ₂ 1	P3 ₂ 1	P2 ₁	P4 ₁ 2 ₁ 2
Dimensões da célula (Å)	91,40	91,86	62,61	53,46
	91,40	91,86	82,47	53,46
	142,00	143,53	53,46	192,88
			99,52	
Mol/unidade assimétrica	1 tetrâmero	1 tetrâmero	1 tetrâmero	1 dímero
Resolução (Å)	69,1-2,25	69,6-1,85	82,5-1,86	84,0-2,0
Nº refl. medidas	124853	286747	108495	105005
Reflexões únicas	32647	56802	41917	18357
I/sigma I	7,0	12,5	15,8	13,2
Completado (%)	97,0	93,1	90,7	92,0
Rmerge (%) ^{um}	7,5	6,9	6,5	6,9
Refinamento				
Resolução (Å)	69,1-2,25	69,6-1,85	52,7-1,86	51,5-2,0
Sigma limite (F)	0,0	0,0	0,0	0,0
Nº refl. medidas	32645	56780	41895	18316
RFactor (%)	21,7	18,4	16,3	21,3
Rfree (%) ^b	27,4	22,3	20,7	26,3
DRQM geometria				
Comprimentos de ligação (Å)	0,011	0,013	0,015	0,012
Ângulos de ligação (°)	1,87	1,89	1,72	1,90

Tabela 1: Dados cristalográficos, recolha de dados e parâmetros do refinamento das estruturas dos complexos com Hb

	FUF (estado R2)	5HMF (estado R2)	5HMF (estado T)	FUF (estado R)
Ângulos diedros				
Regiões mais favorecidas	91,4	92,8	93,6	92,8
Regiões adicionais	8,6	7,2	6,4	7,2

^{um} Rmerge = $\Sigma(\langle I \rangle - I) / \Sigma I$. ^b5% da reflexão utilizada no cálculo de

Rfree foi excluída do refinamento.

A estrutura de 5HMF-Hb, sem água ou ligantes, foi utilizada como modelo inicial para o refinamento da estrutura FUF-Hb. Tal como com a estrutura 5HMF-Hb, os refinamentos da estrutura FUF-Hb não originaram qualquer densidade interpretável na cavidade de ligação. A estrutura não foi refinada totalmente e por isso a Tabela 1 não apresenta dados estatísticos pormenorizados do cristal.

Determinações e refinamentos de estrutura das estruturas dos complexos no estado R. A estrutura no estado R do dímero $\alpha_1\beta_1$ isomórfico (1LJW) após a eliminação de moléculas de água e aníões de fosfato foi utilizada como modelo inicial para refinar a estrutura FUF-Hb. Tal como com os complexos no estado T, repetidos refinamentos da estrutura FUF-Hb com desenvolvimento de modelos revelaram apenas densidades fracas e não interpretáveis na cavidade de ligação da α Vall N-terminal. O Rfactor e o Rfree finais eram 21,3 e 26,3 respectivamente, a uma resolução de 2,0 Å, e na Tabela 1 estão apresentados pormenores estatísticos do cristal.

A estrutura de FUF-Hb, sem água ou ligantes, foi utilizada como modelo inicial para o refinamento da estrutura

5HMF-Hb. Tal como com o cristal de FUF, os refinamentos também revelaram uma densidade não interpretável na cavidade de ligação e o refinamento foi anulado. Como tal, a Tabela 1 não apresenta estatísticas pormenorizadas relativas ao cristal.

Resultados

A vanilina foi testada clinicamente como terapia para a DCF e foi estudada com os aldeídos heterocíclicos avaliados, também conhecidos como compostos furânicos. As propriedades funcionais e de anti-falciformação da vanilina foram publicadas por nós, no passado (Abraham, et al., 1991). Além disso, utilizaram-se concentrações de compostos relativamente altas (5-10 mM) para garantir, nos presentes estudos, uma reacção completa com a Hb. Tal é necessário, porque a concentração de Hb nos eritrócitos é cerca de 5 mmol/L e, a um hematórito de 25% e um volume de sangue de 4 L, é necessário 10 mmol/L de composto para produzir um aducto composto-Hb 2:1. Existem dois locais de ligação idênticos na Hb porque esta possui um eixo de simetria duplo.

Estudos de saturação de oxigénio com sangue normal. Na Tabela 2 estão resumidos os efeitos de quatro compostos furânicos e da vanilina (em concentrações de 5 mM) em células AA. Efectores alostéricos que aumentam a afinidade da Hb pelo oxigénio diminuem a P_{50} (desvio para a esquerda da OEC) relativamente ao controlo. Isso resulta num valor de ΔP_{50} negativo. O composto mais potente é o 5HMF ($\Delta P_{50} = -17,52$ mmHg), seguido por 5MF ($\Delta P_{50} = -16,16$ mmHg), 5EF ($\Delta P_{50} = -15,71$ mmHg) e FUF ($\Delta P_{50} = -11,35$ mmHg). O composto que provoca o menor desvio para a esquerda é a vanilina ($\Delta P_{50} = -6,78$ mmHg). A Tabela 2 também mostra que o 5HMF desvia a OEC para a esquerda de uma maneira dose-dependente. Os coeficientes de Hill das Hbs modificadas, com excepção das modificadas com FUF, são inferiores aos das células AA isoladamente.

Tabela 2: Estudos de saturação com oxigénio e sangue total normal^{um}

Compostos ^b	P ₅₀ (mmHg) ^c	ΔP ₅₀ (mmHg) ^d	n ₅₀ ^e
Controlo	25,84 ± 0,01	-	2,27 ± 0,20
Vanilina ^e 5 mM *)	19,06 ± 1,98	-6,78	1,98 ± 0,23
FUF 5 mM*)	14,49 ± 0,06	-11,35	2,30 ± 0,01
5MF 5 mM*)	9,68 ± 0,24	-16,16	1,70 ± 0,06
5EF 5 mM*)	10,13 ± 0,75	-15,71	1,77 ± 0,14
5HMF 1 mM	19,19 ± 1,51	-6,65	2,08 ± 0,14
5HMF 2 mM	15,04 ± 0,51	-10,80	1,98 ± 0,08
5HMF 5 mM	8,32 ± 0,40	-17,52	1,88 ± 0,06
^{um} Os resultados são a média ± erro padrão de duas medições. ^b O rácio de composto para Hb a concentrações de compostos de 1 mM, 2mM e 5 mM são 0,8, 1,6 e 4, respectivamente. ^c P ₅₀ é a pressão de oxigénio à qual as células AA (hematócrito de 40%), na ausência ou presença de composto, estão 50% saturadas em oxigénio. ^d ΔP ₅₀ é a P ₅₀ de células AA tratadas com os compostos - P ₅₀ é a pressão de controlo. ^e n ₅₀ é o coeficiente de Hill a uma saturação de 50% de oxigénio.			
*) Para fins comparativos apenas			

Estudos de saturação de oxigénio com eritrócitos falciformes homozigóticos. Na Tabela 3 (colunas 2 e 3) constam as alterações na P₅₀ e na ΔP₅₀ para células SS tratadas com vanilina, FUF e 5HMF, a uma concentração de 5 mM. Todos os compostos desviam a OEC para a esquerda, e tal como observado em estudos de saturação de oxigénio com células AA, o 5HMF é alostericamente o composto mais potente (ΔP₅₀ = -25,2 mmHg) seguido por FUF (ΔP₅₀ = -15,8 mmHg) e por último vanilina (ΔP₅₀ = -13,5 mmHg). A Figura 3 mostra a curva OEC para os três compostos a uma concentração de 5 mM e pode-se ver que a OEC do 5HMF é a mais significativamente desviada para a esquerda em comparação com a OEC da FUF e da vanilina. Como observado anteriormente para a vanilina tanto com células AA como SS (Abraham, et al., 1991), concentrações elevadas dos compostos avaliados deram origem a uma curva OEC de forma mais hiperbólica do que a curva normal em forma sigmoidal.

Tabela 3: Estudos de saturação de oxigénio e da formação de aductos com eritrócitos falciformes homozigóticos^a

Composto	Células SS P_{50} (mmHg) ^b	Células SS ΔP_{50} (mmHg) ^c	Hemolisado P_{50} (mmHg)	Hemolisado ΔP_{50} (mmHg) ^d	Aducto HbS (%) ^e
Controlo*)	31,2 ± 1,0	-	11,2 ± 0,2	-	-
Vanilina*)	17,7 ± 2,2	-13,5	8,1 ± 1,1	-3,1	15 ± 3,6
FUF*)	15,4 ± 1,7	-15,8	5,3 ± 0,6	-5,9	24 ± 5,7
5HMF	6,0 ± 1,2	-25,2	1,8 ± 0,3	-9,4	70 ± 10,0

^aOs resultados são a média ± erro padrão de duas medições. ^b P_{50} é a pressão de oxigénio à qual as células SS (hematócrito de 10%) ou o hemolisado (na ausência ou presença de composto solubilizado em DMSO) estão 50% saturados em oxigénio. ^c ΔP_{50} é a P_{50} de células SS tratadas com os compostos ou a P_{50} de controlo do hemolisado.

^dValores de P_{50} obtidos com hemolisado após a incubação de compostos com células SS. ^eValores do aducto com HbS obtidos de padrões de eluição por HPLC de hemolisado após incubação de compostos com células SS.

*) Para fins comparativos apenas

Transporte através da membrana de eritrócitos falciformes homozigóticos e reacção com HbS. Estes testes foram realizados para determinar se o desvio para a esquerda observado no caso de células SS tratadas com composto é o resultado de uma interacção directa do composto com HbS. Pretendeu-se também determinar se as alterações na P_{50} observadas em células SS tratadas com os compostos de teste podiam ser atribuídas à formação de diferentes níveis de aducto composto-HbS. Os resultados estão resumidos na Tabela 3 (colunas 4-6). Cada um dos compostos avaliados produz um novo pico de HbS modificada que elui antes do pico da HbS original, indicando a formação de aductos de HbS covalentemente modificada. O 5HMF modificou a HbS em maior grau (70%), seguido pelo FUF (24%) e, por último, a vanilina (15%). A Figura 4 ilustra estudos por HPLC de permuta catiónica do hemolisado de células SS após reacção com 5HMF, a uma concentração de 5 mM. Os compostos também desviaram a OEC do hemolisado para a esquerda. Estes desvios seguem a mesma tendência observada durante os estudos com

sangue total normal. O 5HMF provoca o maior desvio para a esquerda da Hb ($\Delta P_{50} = -9,4$ mmHg), seguido por FUF ($\Delta P_{50} = -5,9$ mmHg) e por último a vanilina ($\Delta P_{50} = 3,1$ mmHg).

Estudos de anti-falciformação dos compostos com eritrócitos falciformes homozigóticos. Após exposição de suspensões de células SS a 4% de oxigénio e na ausência dos compostos de teste, todas as células sofreram falciformação. Na presença de vanilina, FUF e 5HMF (em concentrações de 5 mM) a percentagem de células SS diminuiu 20, 30 e 90%, respectivamente (Tabela 4, colunas 2 e 3). O 5HMF inibiu a falciformação em maior grau, seguido pelo FUF e a vanilina. Estes resultados seguem a tendência observada no desvio para a esquerda da OEC, assim como a formação de aductos composto-HbS. A Tabela 4 mostra também os resultados do efeito anti-falciformação dose-dependente de FUF e 5HMF. Diferentes concentrações destes compostos diminuíram a formação de células SS de forma dose-dependente. No entanto, ao contrário do 5HMF, o FUF não inibiu a falciformação celular a concentrações mais baixas de composto (1 e 2 mM).

Tabela 4: Estudos de anti-falciformação com eritrócitos falciformes homozigóticos^b

Composto	Falciformação de células SS (%)	Inibição da falciformação de células SS (%)	VCM ^c (fl)
Controlo	100	0	61,5
Vani 5 mM*)	80	20 ± 6,5	61,0
FUF 1 mM*)	100	0	60,3
FUF 2 mM*)	100	0	60,0
FUF 5 mM*)	70	30 ± 7,0	62,8
5HMF 1 mM	87	13	62,5
5HMF 2 mM	58	42 ± 1,0	61,0
5HMF 5 mM	10	90 ± 5,0	61,4

^{um} Os resultados são a média ± erro padrão de duas medições. ^bEstudos de anti-falciformação com células SS (hematócrito de 10%) e oxigénio inferior a 4%. ^cVCM é o volume corpuscular médio.

*) Apenas para fins comparativos

O efeito de compostos no tamanho de eritrócitos falciformes homozigóticos - Conforme se pode ver na Tabela 4 (coluna 4), a incubação de células SS com FUF ou 5HMF 1, 2 e 5 mM não provocou alterações nos volumes celulares.

Estudos de cristalização. Hb desoxigenada complexada com FUF ou 5HMF cristalizados em ambas conformações de estados, T e R2. O estado T co-cristalizado com FUF e 5HMF revela apenas uma fraca ligação destes compostos, enquanto o estado R2 co-cristalizado com estes compostos mostra uma ligação muito forte. Com razões de composto para Hb de 4:1, observámos cristais de ambos os estados, T e R2, nos mesmos tubos de cristalização. Curiosamente, para o 5HMF, foram sempre observados mais cristais no estado R2 do que no estado T; para o FUF, o oposto era geralmente verdadeiro. No entanto, quando um grande excesso de composto é utilizado (≥ 10 excesso molar), quase todos os testes de co-cristalização com FUF e 5HMF deram origem apenas a cristais no estado R2. Estes

resultados sugerem que o 5HMF é alostericamente mais potente do que o FUF, o que é consistente com os resultados biológicos.

Cristais nativos no estado R2 estado foram previamente cristalizados em condições de sal baixo (Silva, et al., 1992), mas não em condições de sal elevado. As estruturas que resultaram dos co-cristais no estado R2, como já referido, possuem moléculas de água ou de O₂ (complexos de Hb com FUF e com 5HMF, respectivamente) coordenadas aos átomos de Fe. Na realidade, pensa-se que os ligantes são uma mistura de O₂, CO e água, uma vez que a análise dos complexos no estado R2 revelou a presença de COHb, metHb e oxiHb (60-85%), em comparação com cerca de 16% de co-cristais no estado T. A presença de ligantes nos co-cristais do estado R2 pode ser devida ao facto de a câmara anaeróbica utilizada nestas experiências não ter sido talvez completamente desprovida de oxigénio durante a preparação da cristalização. Curiosamente, os co-cristais no estado T que ocorreram nas mesmas soluções que os co-cristais no estado R2 não apresentavam qualquer densidade residual para a ligação de ligantes ao Fe. Estas constatações demonstram a natureza de alta afinidade do estado relaxado da Hb em relação ao seu estado tenso. Estes resultados também mostram claramente que a estrutura quaternária do estado R2 é fisiologicamente importante como anteriormente indicado (Srinivasan e Rose, 1994).

Ao contrário dos resultados de cristalização dos estados T e R2, e de forma bastante significativa, testes repetidos de cristalização do estado R não resultaram em quaisquer co-cristais, especialmente a concentrações elevadas dos compostos (≥ 5 molar de excesso em relação ao tetrâmero de Hb). No entanto, na presença de baixas concentrações dos compostos (4 molar de excesso em relação ao tetrâmero de Hb), foram observados muito poucos co-cristais no estado R, tanto para o FUF como para o 5HMF, com a maioria dos complexos ficando em solução. É necessário salientar que foi fácil obter cristais nativos no estado R (teste controlo, sem adição de qualquer composto) nestas mesmas condições de cristalização.

Descrições das estruturas dos complexos no estado R2. As estruturas dos complexos FUF-Hb e 5HMF-Hb contêm um tetrâmero $\alpha_1\beta_1-\alpha_2\beta_2$ na unidade assimétrica. Os complexos no estado R2 e o estado nativo R2 têm essencialmente as mesmas estruturas quaternárias da Hb (desvio da raiz quadrada média (drqm) $\sim 0,4 \text{ \AA}$). No entanto, a comparação das estruturas dos complexos no estado R2 com Hb nativa nos estados R (código PDB: 1AJ9) e T (código PDB: 2HHB), mostram diferenças estruturais quaternárias muito significativas, com desvios drqm $\sim 1,8 \text{ \AA}$ e $\sim 3,3 \text{ \AA}$, respectivamente. Como anteriormente analisado e divulgado por Silva et al., (1992) para as estruturas de Hb nativa nos estados R, T e R2, as transições alostéricas entre as estruturas complexas de R2 e as estruturas de R e T mostram extensa reorganização das interfaces $\alpha_1\beta_2$, $\alpha_1\alpha_2$ e $\beta_1\beta_2$ dos três estados da Hb. As estruturas foram sobrepostas utilizando o dímero $\alpha_1\beta_1$ invariante (resíduos C α) no sistema BGH (*BGH frame*), conforme definido por Baldwin e Chothia (1979).

Seguem-se descrições pormenorizadas das interacções entre o estado R2 da Hb e os dois compostos, FUF e 5HMF. Estes dois compostos furânicos são bem ordenados, com ocupações de aproximadamente 100%. Os compostos ligam-se de acordo com a simetria na fenda α às duas α Vall N-terminais, com o grupo funcional aldeído formando uma ligação covalente com o azoto livre da valina. As interacções específicas entre os compostos e a proteína serão analisadas apenas em relação ao local de ligação de α 1Vall, uma vez que a outra molécula relacionada com a simetria participa de forma semelhante, mas em interacções opostas, no local de ligação de α 2Vall. Uma interacção covalente entre o aldeído e o azoto de α 1Vall dirige o anel de furano dos compostos em direcção à cavidade central de água. Na estrutura FUF-Hb, o composto ligado parece ter duas conformações alternativas, que diferem em quase 180 °. O oxigénio aromático participa numa ponte de hidrogénio muito fraca entre as subunidades com α 2Ser138 OG (3,6 \AA), que serve para unir as duas subunidades α . Curiosamente, quando o composto é girado para a sua conformação alternativa, o

oxigénio fica frente-a-frente à cavidade de água e participa numa ponte de hidrogénio intra-subunidades fraca com $\alpha 1\text{Ser}131\text{OG}$ ($3,5\text{ \AA}$). Há muito poucas interacções hidrofóbicas ($< 3,8\text{ \AA}$) entre o anel furano e os resíduos $\text{Lys}127$ e $\text{Ala}130$.

Ao contrário do FUF, não se comprova a rotação do composto no caso da molécula de 5HMF ligada, e é assumida uma conformação com o oxigénio do anel que fica frente-a-frente à cavidade de água. A interacção observada entre FUF e $\alpha 1\text{Ser}138\text{OG}$ está, portanto, ausente na estrutura do complexo 5HMF-Hb. Tal como com o FUF, o oxigénio do anel do 5HMF participa numa ponte de hidrogénio intra-subunidades mais forte com $\alpha 1\text{Ser}131\text{OG}$ ($3,1\text{ \AA}$), do que o FUF. Além disso, o substituinte 5-hidroximetilo do 5HMF também estabelece uma forte interacção de pontes de hidrogénio intra-subunidades com a $\alpha 1\text{Thr}134\text{OGI}$ ($2,6\text{ \AA}$); esta interacção está ausente na estrutura do complexo FUF-Hb. Enquanto o FUF une as duas subunidades α , estabelecendo uma ponte de hidrogénio fraca entre as subunidades com $\alpha 2\text{Ser}138\text{OG}$, as duas moléculas de 5HMF são unidas por uma forte rede de seis pontes de hidrogénio mediadas por água, através do hidroxilo e do oxigénio do anel que unem as duas subunidades α . Algumas destas moléculas de água são conservadas na cavidade de ligação do FUF, mas são móveis e não estabelecem contacto através de pontes de hidrogénio com as moléculas FUF. Tal como a estrutura de FUF-Hb, existem muito poucas interacções hidrofóbicas ($< 3,8\text{ \AA}$) entre o 5HMF e a Hb. O aumento do número de interacções entre o 5HMF e os resíduos de proteínas (em comparação com o FUF), bem como as pontes de hidrogénio fortes mediadas por água laços que unem as duas subunidades α na estrutura do complexo com 5HMF, podem explicar em parte por que razão o 5HMF é alstericamente mais potente do que o FUF.

Descrições das estruturas dos complexos do estado T. As estruturas dos complexos FUF-Hb e 5HMF-Hb contêm um tetrâmero de $\alpha 1\beta 1-\alpha 2\beta 2$ na unidade assimétrica. Ao contrário das estruturas dos complexos do estado R2, os complexos do estado T não mostram claramente uma ligação ao composto. Alguns co-cristais examinados apresentavam uma maior densidade em

composto do que outros; no entanto várias tentativas de desenvolvimento de modelos para melhorar a densidade em composto não foram suficientemente bem-sucedidas para permitir um ajuste fiável do composto. Os complexos do estado T e o estado T nativo possuem essencialmente as mesmas estruturas quaternárias da Hb ($d_{RQM} \sim 0,4 \text{ \AA}$). A sobreposição dos locais de ligação de α Vall também revela muito poucas diferenças estruturais. Além disso, devemos salientar que no nosso laboratório conseguimos isolar facilmente estruturas do estado T com compostos ligados covalentemente, com uma densidade electrónica claramente definidas na α Vall N-terminal, usando as mesmas condições de cristalização do estado T, conforme descrito atrás (Abraham, et al. 1995; Boyiri, et al., 1995).

Descrições das estruturas dos complexos no estado R: Ambas as estruturas dos complexos FUF-Hb e 5HMF-Hb contêm um dímero $\alpha 1\beta 1$ na unidade assimétrica. Surpreendentemente, alguns cristais do estado R obtidos nestes testes apresentam apenas uma densidade esparsa nos locais de ligação da α Vall N-terminal. Embora os complexos do estado R e as estruturas quaternárias nativas sejam indistinguíveis ($d_{RQM} \sim 0,4 \text{ \AA}$), o terminal C (os resíduos Trp140 e Argy41) exibem diferenças posicionais significativas. Nas estruturas complexas, estes resíduos giraram na α Lys139, deslocando a α Arg141 quase 180° da sua posição na estrutura nativa, enquanto a α Tyr140 afastou-se $\sim 2 \text{ \AA}$. O OH da α Tyr140 participa agora em pontes de hidrogénio com o N da α Val93 e da α Pro95 nas estruturas do complexo, em vez das pontes de hidrogénio do estado R nativo com o N e o O da α Val93. A reorientação do terminal C levou a uma fenda de ligação muito maior nas estruturas dos complexos do estado R de forma a permitir a ligação do composto, embora fraca. Isto contrasta com a estrutura nativa, onde os resíduos C-terminais impedem estericamente este sítio de ligação.

Discussão

Estes estudos identificaram derivados baseados em furano, que ocorrem naturalmente em alguns alimentos, como potenciais

novas terapias para tratar a DCF. Os resultados destes estudos indicam claramente que estes compostos possuem a capacidade de: (1) atravessar membranas de eritrócitos falciformes homozigóticos; (2) reagir com a HbS; e (3) alostericamente desviar a OEC da Hb para o estado de alta afinidade, que não forma polímeros de HbS. Além disso, determinámos que a mudança na afinidade pelo oxigénio das suspensões de células SS causada por estes compostos depende do grau de ligação à HbS; o 5HMF revelou a quantidade mais elevada de aducto composto-HbS e, como esperado, foi o mais potente em termos de desvio para a esquerda da OEC. Além disso, os resultados apontam claramente que a substituição, assim como o tipo de substituição na posição 5 do anel central de furano são importantes para as actividades biológicas. O 5HMF, que possui um álcool alquilo na posição 5 do anel furano, é mais potente do que o 5MF ou o 5EF (Figura 2), os quais possuem porções hidrofóbicas nesta posição. O FUF sem uma substituição é o menos potente. Isto é consistente com os resultados cristalográficas, que indicam que o grupo hidroxilo do 5HMF está intimamente envolvido em interacções que estabilizam o estado relaxado. Os coeficientes de Hill da HbS modificada são relativamente inferiores aos da Hb não modificada, sugerindo uma diminuição na cooperatividade. Isso era esperado devido ao aparente enfraquecimento das interacções entre dímeros pela ligação dos compostos ao estado T, conduzindo a uma maior afinidade pelo oxigénio, cooperatividade reduzida e um desvio para a Hb alta afinidade.

Actividade anti-falciformação dos compostos furânicos. Os resultados da avaliação do FUF (teste comparativo) e do 5HMF (presente invenção) com células SS mostram que estes compostos têm fortes propriedades de anti-falciformação, mais fortes do que outros aldeídos com conhecidas propriedades de anti-falciformação. A uma concentração de 5 mM, o 5HMF inibiu a falciformação de células aproximadamente 4 e 2,5 vezes mais do que a vanilina e o FUF, respectivamente. Notavelmente, mesmo à concentração de 2 mM, o 5HMF reduz a falciformação de células em 42%, o dobro da vanilina a uma concentração de 5 mM. O 5HMF, que modifica a HbS em maior grau, é o mais potente

composto em termos de desvio para a esquerda da OEC, bem como o mais potente agente contra a falciformação; o inverso é verdadeiro para a vanilina. Assim, a acção de anti-falciformação destes compostos parece resultar da sua capacidade para se ligarem à HbS e desviar a OEC para a esquerda, em direcção ao estado de alta afinidade. E embora as actividades de anti-falciformação do 5MF e do 5EF (Figura 2) não tenham sido determinadas, com base na relação estrutura-actividade, prevemos que ambos compostos apresentem uma actividade anti-falciformação entre as actividades do FUF e do 5HMF.

É também significativo o facto de que os compostos não desidratam as células SS. A polimerização da HbS e a falciformação das células SS estão relacionadas com concentração intracelular de HbS, portanto, qualquer agente que cause desidratação dos eritrócitos aumentará a concentração molar de HbS e presumivelmente aumentará a formação de polímero. Além disso, embora não tenha sido referido, os compostos não promoveram a formação de metHb ou da Hb desnaturada associada à membrana.

Mecanismo da actividade de anti-falciformação dos compostos furânicos. Os resultados destes estudos mostram claramente que os compostos furânicos ligam-se covalentemente ao estado T da HbS desestabilizando-o e/ou ao estado R estabilizando-o. Como resultado, o equilíbrio alostérico é desviado para a esquerda em direcção à HbS mais solúvel e de alta afinidade, sob a forma da conformação R2. Tanto quanto sabemos, esta é a primeira constatação deste tipo na literatura, que mostra que um composto induziu uma alteração conformacional da Hb do estado T para a Hb do estado R2, conduzindo à formação de co-cristais do estado R2, em solução de desoxiHb. Foi sugerido que esta seria a causa subjacente para as actividades de anti-falciformação observadas. Para entender a nível atómico o mecanismo subjacente às actividades biológicas dos compostos, referimos duas publicações fundamentais pelo grupo de Abraham (Abraham, et al., 1995; Boyiri, et al., 1995), nas quais os autores sugerem que

agentes como a FSA (Figura 2), que formam aductos de base de Schiff com o azoto da α Vall N-terminal do estado T e fornecem grupos para as pontes salinas e de hidrogénio com o dímero oposto (transversalmente ao eixo duplo), aumentam as restrições ao estado T. Estas restrições adicionais desviam o equilíbrio alostérico em direcção ao estado T de baixa afinidade. Por outro lado, agentes como DMHB (Figura 2), que se ligam ao estado T de modo semelhante mas que não participam em quaisquer interacções de pontes salinas ou de hidrogénio com o dímero oposto, desviam a OEC para a esquerda. Sugere-se que estes agentes rompem a ligação mediada por água entre a α Vall N-terminal e a α Arg141 C-terminal do dímero oposto, o que leva à desestabilização do estado T, e como resultado o equilíbrio alostérico é deslocado em direcção ao estado R de alta afinidade. Ao contrário do FSA, os compostos furânicos não têm um substituinte de carboxilato que participe em interacções estabilizadoras entre as subunidades quando estão ligados ao estado T. O que não é claro é a forma como estes compostos se ligam ao estado T, uma vez que os estudos cristalográficas mostram apenas uma densidade em composto fraca e indefinida. No entanto, se supusermos que os compostos se ligam com a mesma orientação observada nas estruturas dos complexos do estado R2, um ajuste hipotético do 5HMF ao local de ligação da α Vall N-terminal no estado T (com a ajuda da fraca densidade de composto) mostra este composto a participar apenas em interacções intra-subunidades com α Thr134 OG1 e α Ser131a OG. Assim, parece que os compostos furânicos se ligam ao sítio da α Vall N-terminal do estado T, rompem a ponte de hidrogénio nativa mediada por água entre α Vall e aArg141 e desestabilizam o estado T. O resultado desta desestabilização é uma mudança alostérica para a Hb de alta afinidade e relaxada, sob a forma do estado R2. Este mecanismo é consistente com os seguintes factos: (1) os cristais do estado R2 foram formados a partir de uma solução de desoxiHb/composto furânico e (2) a cristalização do estado T na ausência de composto furânico não resultou em cristais no estado R2. Na verdade, todos os cristais do estado T que foram isolados em conjunto com os cristais do estado R2 tinham apenas de fraca densidade de composto - claramente estes cristais do estado T

não tinham suficiente composto ligado para efectuar a mudança alostérica. Coerente com esta observação é o facto de que a adição de um grande excesso de compostos furânicos resultou na formação de 100% de co-cristais no estado R2 a partir da solução de desoxiHb complexada - devido à saturação do sítio de ligação das moléculas de desoxiHb.

Os resultados funcionais e cristalográficas observados, bem como o mecanismo proposto, suscitam a questão interessante sobre a razão por que se formam cristais no estado R2 e não cristais no estado R durante o teste de cristalização do estado T. Análises visuais e estudos de *docking* molecular das cavidades de ligação da α Vall N-terminal de conhecidas estruturas nativas de Hb nos estados T, R e R2 podem lançar luz sobre esta questão. Sobrepuaram-se estruturas nativas utilizando o dímero α 1 β 1 invariante (resíduos C α) no sistema BGH (Baldwin e Chothia, 1979). Em ambos os estados T e R2, as cavidades de ligação da Hb são surpreendentemente maiores do que no estado R. Estudos de *docking* mostraram que o 5HMF pode ser facilmente ajustado às cavidades de ligação dos estados T e R2 sem interferência estérica; por outro lado, a cavidade de ligação da α Vall N-terminal da Hb nativa no estado R está esteticamente preenchida devido à presença dos resíduos C-terminais Tyr140 e Arg141. Assim, para o 5HMF poder ligar-se ao estado R terá de haver reorganização dos resíduos nas cavidades de ligação. Isto é exactamente o que ocorre nas estruturas dos complexos no estado R, que exibem cavidades de ligação maiores do que a estrutura nativa. Parece razoável que a reorganização dos resíduos nas cavidades de ligação no estado R retarde consideravelmente a incorporação do composto no local de ligação (em comparação com os estados T e R2). Estas observações podem explicar em parte por que razão a ligação dos compostos furânicos à desoxiHb desestabiliza esta proteína para o estado R2 e não para o estado R. Além disso, podemos razoavelmente supor que estes compostos se ligam directamente e com maior afinidade ao estado R2 em comparação com o estado R, e os aductos composto-HbS observados durante as análises por HPLC das células SS são principalmente devido à incorporação dos compostos no estado R2. Devemos salientar

que não há nenhuma explicação óbvia para o facto de não se observarem cristais do estado R2 na cristalização aeróbica da solução de composto-CO₂Hb. No entanto, é bem possível que o complexo no estado R2 exista em solução mas não consiga cristalizar. Isso é consistente com o facto de que quase nenhum dos testes de cristalização aeróbica deu origem a cristais e os poucos que o fizeram, produziram apenas alguns cristais do estado R, com a maioria das espécies complexadas permanecendo em solução.

Com base nos resultados, sugere-se que as diferenças observadas nas actividades biológicas dos compostos furânicos avaliados são devidas aos seus modos de ligação ao estado T e ao estado R2. Nas estruturas dos complexos no estado R2, o 5HMF possui a capacidade de estabilizar a conformação relaxada em maior grau do que o FUF (como referido atrás). A modelação dos dois compostos ao estado T indica também que o 5HMF se ligaria mais firmemente ao estado T do que FUF. Portanto, na ausência de interacções de pontes salinas entre as subunidades por estes compostos no estado T, espera-se que o 5HMF desestabilize o estado T, mais do que o FUF.

Estudos por Abraham *et al.* com vanilina (1991), Johnson *et al.* com piridoxal (1985) e Park *et al.* com isotiocianatos substituídos, (2003) sugerem que os efeitos de anti-falciformação destes compostos são devidos à inibição directa da formação de polímeros no estado T e/ou à maior formação de moléculas no estado R. Estes estudos pressupõem a formação de Hb no estado R com base na capacidade dos compostos para desviarem a OEC para a esquerda. Claramente, os nossos estudos mostram inequivocamente que é o estado R2, e não estado R, que se forma quando a OEC é desviada para a Hb de alta afinidade. Assim, o modo de acção dos compostos furânicos parece ser diferente dos outros compostos com propriedades de anti-falciformação.

Conclusões. Uma HbS na forma homozigótica, com um volume de sangue de 4 L e um hematócrito de 25%, tem aproximadamente 5 mmol de HbS. Para a completa modificação de HbS com 5HMF (pm

= 126), 10 mmole serão necessárias, uma vez que duas moléculas ligam-se a Hb, traduzindo-se em 1,26 g de composto. Uma vez que uma modificação de 30% da HbS será suficiente, em princípio, para se obterem benefícios clínicos, seria necessário administrar apenas 378 mg deste composto (assumindo que o fármaco tem apenas HbS como alvo). Para um composto como o 5HMF, que é não tóxico, uma dose larga pode ser aceitável, uma vez que certos alimentos consumidos diariamente, tais como o café e produtos de caramelo possuem concentrações de 5HMF que, por vezes, excedem 6 g/kg (Janzowski, 2000). Em ratos, a DL₅₀ aguda oral de 5HMF é 2,5 g/kg para os machos e 2,5-5,0 g/kg para as fêmeas (US EPA, 1992). Em comparação, a vanilina, que é considerada não tóxica, tem uma DL₅₀ aguda oral de 1,58 g/kg. Os outros compostos furânicos também ocorrem na natureza e, com exceção da FUF, não há nenhum relatório sobre eventuais efeitos adversos do MF e do EF. Os agentes contra a falciformação, a vanilina e o 12C79, também se ligam covalentemente a Hb e ambos demonstraram ser clinicamente não tóxicos (Fitzharris, et al., 1985; Orringer, et al., 1988). Notavelmente, o 5HMF é quatro vezes mais eficaz do que a vanilina, que se encontra actualmente em estudos clínicos para o tratamento da DCF. Assim, os compostos furânicos também podem ser moléculas de fármacos viáveis. Os resultados deste estudo também apresentam uma visão coerente das potências de anti-falciformação e os mecanismos a nível atómico de novos agentes contra a falciformação. Com esses dados, será possível a realização de estudos de estrutura-actividade que irão resultar no desenvolvimento de análogos com maior potência.

Exemplo 2. O efeito anti-falciformação *in vivo* do 5-HMF

O efeito anti-falciformação *in vivo* do 5-HMF foi investigado com ratos transgénicos (Tg) que produzem HbS humana. Uma vez que o sangue de rato do tipo selvagem tem uma OEC extremamente deslocada para a direita (P₅₀ do sangue de rato: 40-44 mm Hg) em comparação com a OEC do sangue humano (P₅₀ das células AA: 26,5 mm Hg; P₅₀ das células SS: 32 mm Hg), neste estudo utilizaram-se ratos transgénicos portadores de DCF que produzem aproximadamente a mesma quantidade de β-

globina humana e de rato e 100% de β^s -globina humana. A P_{50} desses ratos situa-se entre 26 e 34 mm Hg, dependendo da percentagem da β -globina de rato. Foi utilizado 5% de oxigénio (5% O₂, 95% N₂), porque os ratos desenvolvem sequestro broncopulmonar quase imediatamente após exposição a 5% de O₂. Embora alterações semelhantes ocorram sob pressões de oxigénio entre 6 e 10 mm Hg, nem todos os ratos desenvolvem sequestro broncopulmonar induzido por hipoxia, indicando que é necessário um número elevado de ratos transgénicos portadores de DCF para se obter resultados estatisticamente significativos. Após a exposição à hipoxia, pode-se determinar a percentagem de células falciformes no sangue, bem como o tempo de sobrevivência. 5HMF (100 mg/kg de peso corporal) dissolvido num pequeno volume de DMSO foi diluído com solução salina antes de injecção i.p. Nos testes de hipoxia, os ratos transgénicos portadores de DCF foram expostos a hipoxia durante um período de até 1 hora; quaisquer ratos que sobreviviam ao fim de 1 hora foram sacrificados por deslocação cervical sob anestesia. Em todos os casos, os ratos foram imediatamente dissecados após a morte. O coração, pulmões, cérebro, fígado, baço e rins foram fixados em formol tamponado com fosfatos a 10%. Amostras de tecido foram incorporadas em parafina de acordo com métodos padrão. Secções foram cortadas e coradas com uma solução de hematoxilina-eosina para análise por microscopia de luz.

Resultados

A Figura 5 mostra o gráfico de sobrevivência de Kaplan-Meir para ratos controlo e ratos transgénicos portadores de DCF pré-tratados com 5HMF. Sem tratamento, os ratos transgénicos portadores de DCF expostos a 5% de oxigénio morrem num espaço de 15 min devido a sequestro pulmonar. Após tratamento prévio dos ratos transgénicos portadores de DCF com 5HMF, mais de metade dos ratos sobreviveu durante mais de 25 min. Como se mostra na Figura 6, o tempo de sobrevivência médio dos ratos de controlo foi de 9,6 min (N = 13), enquanto o tempo de sobrevivência médio dos ratos pré-tratados com 5HMF foi de 38,4 min (n = 8). Foi investigada a morfologia das

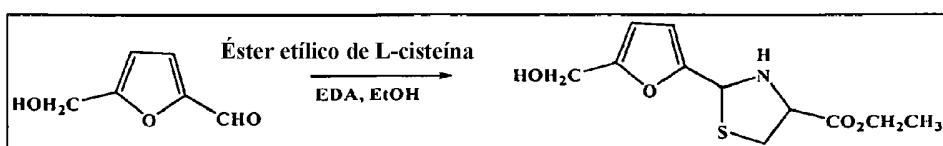
células SS no sangue arterial aos tempos 0, 10, 20, 30, 40, 55 e 60 min. A percentagem de células falciformes na artéria da cauda dos ratos de controlo e dos ratos tratados com 5HMF ao longo do tempo está apresentada na Figura 7. As alterações na percentagem de células falciformes no sangue arterial de um dos ratos transgénicos portadores de DCF que foram expostos a hipoxia (5% de oxigénio) foram investigadas. A percentagem num rato não tratado aumentou de quase zero para mais de 30% e o animal morreu em 15 min. Estudos histopatológicos revelaram que os capilares e os pequenos vasos sanguíneos dos pulmões desses ratos estavam cheios de células falciformes. A percentagem de células falciformes num dos ratos tratados com 5HMF (100 mg/kg de peso corporal) mostrou que embora a percentagem de células falciformes tenha aumentado, as células falciformes são as chamadas células falciformes parcialmente oxigenadas (POSCs) com extremidades rombas (Asakura, 1994). Estas células são flexíveis e podem passar em capilares. Após conversão das POSCs em células falciformes parcialmente desoxigenadas (PDSCs), aquelas ficam rígidas e presas nos capilares encontrados. O 5HMF não só reduziu a formação de POSCs, mas também impediu a conversão de POSCs flexíveis a PDSCs rígidas.

Conclusão Como se pode ver, testes *in vivo* com ratos transgénicos portadores de DCF que produzem Hb humano falciforme mostraram que o pré-tratamento dos ratos com 5HMF (administração intraperitoneal) prolonga significativamente o tempo de sobrevivência em condições hipóxicas severas (5% de oxigénio). Estes resultados indicam que o 5HMF é um novo agente contra a falciformação, que atravessa a membrana eritrocítica, forma aductos com a Hb e inibe a falciformação induzida por hipoxia das células SS.

EXEMPLO 4: Forma de pró-fármaco de um agente contra a falciformação heterocíclico de 5 membros para tratar a doença das células falciformes

Síntese do éster etílico do ácido 5-hidroximetil-2-furfural-tiazolidina-4-carboxílico (MSDD1), um pró-fármaco de 5-HMF

Foi sintetizada uma forma de pró-fármaco do 5HMF, o éster etílico do ácido 5-hidroximetil-2-furfural-tiazolidina-4-carboxílico (MSDD1). O MSDD1 tem a fracção nativa de aldeído protegida contra a metabolização no intestino para a forma do derivado inactivo de ácido. Essa protecção conduz a um aumento na biodisponibilidade e na semi-vida do 5HMF *in vivo*. Para a síntese, uma solução agitada de 5HMF (1,51 g, 12 mmole) em etanol absoluto (30 mL) foi adicionada a uma solução de cloridrato de éster etílico de L-cisteína (2,23 g, 12 mmol) e de N-etildiisopropilamina (2,55 g, 12 mmole) em etanol absoluto (30 mL). A mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. A mistura foi diluída com água (100 mL) e o produto foi extraído com acetato de etilo (3 x 50 mL). A fase orgânica foi seca, evaporada e o produto foi purificado por cromatografia *flash* em sílica gel para dar 2,77 g do produto.



C. Estudos da curva de saturação de oxigénio com MSDD1 em sangue total normal:

MSDD1 foi testado em sangue normal total de adulto em condições *in vitro* para determinar se o 5HMF, com o seu aldeído activo protegido por éster etílico de L-cisteína, teria um efeito sobre a OEC em sangue total, utilizando tonometria de múltiplos pontos. O teste foi realizado como descrito para 5HMF no Exemplo 1, subtítulo "*Estudos de saturação de oxigénio com sangue total normal*". Os estudos de

saturação de oxigénio com sangue total demonstraram que enquanto o 5HMF (com o seu aldeído activo livre desprotegido) desvia a OEC para a esquerda, o pró-fármaco de 5HMF (com o aldeído protegido) claramente não exerce qualquer efeito sobre a OEC. Isto sugere que o aldeído, que é o grupo funcional activo, ainda está protegido pelo grupo tiazolidina-4-éster e não hidrolisa durante o teste *in vitro*. Isto era de esperar, uma vez que as condições em que os estudos *in vitro* foram realizados não deveriam conduzir à hidrólise do grupo tiazolidina-4-éster para libertar o composto activo de 5HMF.

EXEMPLO 5. Métodos para aumentar a hipoxia dos tecidos para tratamento do cancro

Os compostos da invenção presente também são úteis para o tratamento do cancro. Os compostos aldeídicos heterocíclicos de 5 membros e os seus derivados aldeídicos protegidos ligam-se e desestabilizam a hemoglobina no estado tenso (T), resultando no desvio do equilíbrio alostérico para a Hb de alta afinidade, sob a forma de Hb no estado R2. A ligação a Hb, desloca a curva de saturação de oxigénio para a hemoglobina de alta afinidade do estado R2. Desta forma os compostos induzem tecido normal e hipoxia do tumor ao ligarem-se à hemoglobina, aumentando a sua afinidade pelo oxigénio e reduzindo assim a disponibilidade do oxigénio aos tecidos. Assim, estes compostos são de interesse como possíveis potenciadores de agentes bioreductores e/ou de hipertermia no tratamento do cancro.

A redução do oxigénio disponível aos tecidos também conduz à protecção contra danos por radiação durante a terapia de radiação de raios-X.

Os compostos utilizados de acordo com a presente invenção são mais potentes do que o 12C79 na estabilização da Hb de alta afinidade. Além disso, a base de alosterismo destes compostos é compreendida a nível molecular, tornando mais fácil criar efectores mais potentes. Assim, estes compostos

representam uma melhoria dos agentes hipóxicos aldeídicos conhecidos em termos de potência e eficácia.

Exemplo 6. Estudos de saturação de oxigénio *in vitro* com análogos de tiofeno dos agentes heterocíclicos de 5 membros contra a falciformação em sangue normal total*)

Os compostos seguintes: 5-bromo-2-tiofenocarboxialdeído, 4-bromo-2-tiofenocarboxialdeído e 3-metil-2-tiofenocarboxialdeído foram obtidos de Aldrich Chemical Company. Amostras de sangue normal (hematócrito de 40%) na presença de 5-bromo-2-tiofenocarboxialdeído, 4-bromo-2-tiofenocarboxialdeído e 3-metil-2-tiofenocarboxialdeído 5 mM e solubilizados em DMSO, foram equilibradas a 37 °C durante 1 hora. As amostras foram, em seguida, incubadas em tonómetros IL 237 (Instrumentation Laboratories, Inc. Lexington, MA) durante cerca de 10 min a 37 °C e deixadas a equilibrar a tensões de oxigénio de 7, 20 e 60 mmHg. As amostras foram aspiradas para um analisador automático de gases no sangue IL 1420 e para um CO-oxímetro IL 482 ou IL 682 (Instrumentation Laboratories) para determinar o pH, pCO₂, pO₂ e os valores de saturação em oxigénio da Hb (sO₂). Os valores de pO₂ e sO₂ em cada nível de saturação de oxigénio foram então submetidos a uma análise de regressão não linear com o programa Scientist (Micromath, Salt Lake City, UT) para determinação dos valores do coeficiente de Hill (n_{50}) e de P₅₀. P₅₀ é a pressão de oxigénio em mmHg à qual a Hb está 50% saturada em oxigénio.

Resultados: Conforme se mostra na Tabela 5, todos os três compostos de tiofeno desviam para a esquerda a curva OEC, de forma semelhante aos compostos furânicos estudados atrás. Estes estudos também indicam que os compostos de tiofeno (tal como os compostos furânicos) possuem a capacidade de: (1) atravessar membranas eritrocíticas; (2) reagir com a HbS; e (3) alostericamente desviar a OEC da Hb para o estado de alta afinidade, que não forma polímeros de HbS. Além disso, os resultados sugerem que a substituição, assim como o tipo de substituição no anel central do tiofeno é importante para as actividades biológicas. Estes estudos mostram que os análogos

de tiofeno também são potenciais agentes contra a falciformação.

*) apenas para fins comparativos

Tabela 5: Resultados de estudos *in vitro* com compostos aldeídicos de tiofeno em sangue total

Composto	P_{50C}	$2P_{50d}$	ΔP_{50}	n_{50}
	27,73 20,24	21,96	-6,63	2,35
5-Bromo-2-tiofenecarboxialdeído				
	27,73	16,85	-10,56	2,41
4-Bromo-2-tiofenecarboxialdeído		17,49		
	28,10	21,55	-7,01	2,35
3-Metil-2-tiofenecarboxialdeído		20,63		
As análises foram realizadas a uma concentração final de composto de 5 mM. Valor da P_{50C} de controlo, em mmHg, na ausência de composto. Valor de P_{50d} , em mmHg, na presença de composto. $\Delta P_{50} = (P_{50d} - P_{50C})$ em mmHg. O coeficiente de Hill a uma saturação de 50% (n_{50}) na presença de composto. Todas as medições foram repetidas pelo menos duas vezes.				

Referências

1. Abraham, D.J., Mehanna, A.S., Wireko, F.C., Whitney, J., Thomas, R.P., and Orringer, E.P. (1991) Vanillin, a potential agent for the treatment of sickle cell anemia, *Blood* 77, 1334.
2. Abraham, D. J., Safo, M. K., Boyiri, T., Danso Danquah, R., Kister, J., and Poyart, C. (1995) How allosteric effectors can bind to the same protein residue and produce opposite shifts in the allosteric equilibrium, *Biochemistry* 34, 15006.

3. Adachi, K., and Asakura, T. (1980) Polymerization of deoxyhemoglobin C Harlem (β 6Glu-Val, β 73Asp-Asn), J. Mol. Biol., 144, 467.
4. Arnone, A. (1992) X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin, Nature 237, 146.
5. Asakura, T. (1979) Automated method for determination of oxygen equilibrium curves of red cell suspensions under controlled buffer conditions and its clinical applications, Crit. Care Med. 7, 391.
6. Asakura, T., Ohnishi, S. T., Adachi, K., Ozgul, M., Hashimoto, M., Singer, M., Russell, M.O., Schwartz, E. (1980) Effect of cetiedil on erythrocyte sickling: new type of antisickling agent that may affect erythrocyte membranes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77, 2955.
7. Asakura, T., and Mayberry, J. (1984) Relationship between morphologic characteristics of sickle cells and method of deoxygenation, J. Lab Clin. Med. 104, 987.
8. Asakura T, Mattiello JA, Obata K, Asakura K, Reilly MP, Tomassini N, Schwartz E, Ohene-Frempong K. (1994) Partially oxygenated sickled cells: sickle-shaped red cells found in circulating blood of patients with sickle cell disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:12589.
9. Baldwin, J., and Chothia, C. (1979) Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism, J. Mol. Biol. 129, 175.
10. Ballas, S. K. (1999) Complications of sickle cell anemia in adults: guidelines for effective management. Clev. Clin. J Med., 66, 48.
11. Beddell, C.R., Goodford, P.J., Kneen, G., White, R.D., and Wilkinson, S., et al. (1984) Substituted benzaldehydes designed to increase the oxygen affinity of human haemoglobin and inhibit the sickling of sickled erythrocytes, Br. J. Pharmacol. 82, 397.
12. Boyiri, T., Safo, M. K., Danso Danquah, R., Kister, J., Poyart, C., and Abraham, D. J. (1995) Bisaldehyde allosteric effectors as molecular ratchets and probes, Biochemistry 34, 15021.

13. Brunger, A.T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., and Grosse-Kunstleve, R. W., et al. (1998) Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr.* D54, 905.
14. Bunn, H. F., and Forget, G. B. (1986) Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects, p 462, W. B. Saunders company.
15. Cambillau, C., and Horjales, E. (1987) TOM: A Frodo subpackage for protein-ligand fitting with interactive energy minimization, *J. Mol. Graph.* 5, 174.
16. Doyle, M.L., Lew, G, Turner, G.J., Rucknagel, D., and Ackers, GK. (1992) Regulation of oxygen affinity by quaternary enhancement: Does hemoglobin Ypsilanti represent an allosteric intermediate? *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 14, 351.
17. Edelstein, S.J. Chapter 25, Sickle Cell Anemia In *Ann. Reports in Med. Chem.* Bailey, D.M., Ed.; Academic Press, Inc. 20, 247, (1985).
18. Fitzharris, P., McLean, A.E., Sparks, R.G., Weatherley, B.C., White, R.D., and Wootton, R. (1985) The effects in volunteers of BW12C, a compound designed to left-shift the blood-oxygen saturation curve, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 19, 471.
19. Hijiya, N., Horiuchi, K., and Asakura, T. (1991) Morphology of sickle cells produced in solutions of varying osmolarities, *J. Lab. Clin. Med.* 117, 60
20. Hillery, C. A. (1998) Potential therapeutic approaches for the treatment of vaso-occlusion in sickle cell disease. *Curr. Opin. Hematol.*, 5, 151.
21. Ingram, V.M. (1956) A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin, *Nature* 178, 792.
22. Janin J, and Wodak S.J. (1993) The quaternary structure of carbonmonoxy Hb Ypsilanti, *Proteins* 15, 1.
23. Janzowski, C., Glaab, V., Samimi, E., Schlatter, J., and Eisenbrand, G. (2000) 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione, *Food Chem. Toxicol.* 38, 801.

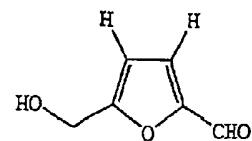
24. Johnson, R. M., Feo, C. J., Nossal, M. and Dobo, I. (1985) Evaluation of covalent antisickling compounds by PO₂ scan ektacytometry, *Blood* 66, 432.
25. Johnson, F.L. (1985) Bone marrow transplantation in the treatment of sickle cell anemia. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 7, 254.
26. Mehanna, A.S. Sickle cell anemia and antisickling agents then and now. (2001) *Curr. Med. Chem.* 8, 79.
27. Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J. -P. (1965) On the nature of allosteric transitions: A plausible model, *J. Mol. Biol.* 12, 88.
28. Mueser, T. M., Rogers, P. H., and Arnone, A. (2000) Interface sliding as illustrated by the multiple quaternary structures of liganded hemoglobin, *Biochemistry* 39, 15353.
29. Navaza, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement, *Acta Crystallogr. D50*, 157.
30. Olivieri, N.F., Weatherall, D.J. (1998). The therapeutic reactivation of fetal haemoglobin. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1655.
31. Orringer, E. P., Berkowitz, L. R. (1986) In Approaches to the therapy of sickle cell anemia, Beuzard, Y.; Charache, S., Galacteros, F., Eds.; Les Edition Inserm: Paris, 141, 301.
32. Orringer, E.P., Binder, E.A., Thomas, R.P., Blythe, D.S., and Bustrack, J.A., et al. (1988) Phase I study of BW 12C in sickle cell disease (SCD) patients not in crises, *Blood*, 72, 69, (suppl).
33. Pauling, L., Itano, H.A., Singer, S.J., and Wells, I.C. (1949) Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease, *Science* 110, 543.
34. Park, S., Hayes, B.L., Marankani, F., Mulhearn, D.C., Wanna, L., Mesecar, A.D., Santarsiero, B.D., Johnson, M.E., and Venton, D.L. (2003) Regioselective covalent modification of hemoglobin in search of antisickling agents, *J Med. Chem.* 46, 936.
35. Perutz, M.F. (1968) Preparation of Hb crystals, *J Crystal Growth* 2, 54.
36. Perutz, M.F. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin, *Nature* 228, 726-734.

37. Reeves, R. B. (1980) The effect of temperature on the oxygen equilibrium curve of human blood, *Respir. Physiol.*, 42, 317.
38. Safo, M.K., and Abraham, D.J. (2003) in Ronald L. Nagel, Ed., *Methods in Molecular Medicine: Hemoglobin Disorders, Molecular Methods and Protocols*, Vol. 82, p.1. Humana Press Inc, Totowa, NJ.
39. Silva, M.M., Rogers, P.H., and Arnone, A. (1992) A third quaternary structure of human Hb at 1.7 Å resolution, *J. Biol. Chem.* 267, 17248.
40. Smith, F.R., Lattman, E.E., and Carter, C.W.R. (1991) The mutation β99 Asp-Tyr stabilizes a new composite quaternary state of human Hb, *Proteins* 10, 81.
41. Srinivasan, R., and Rose, G.D. (1994) The T-to-R transformation in Hb: a re-valuation, *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 11113.
42. Zaugg, R.H, Walder, J. A, and Klotz, I. M. (1977) Schiff Base Adducts of Hemoglobin Modifications that inhibit erythrocyte sickling, *J. Biol. Chem.* 252, 8542.

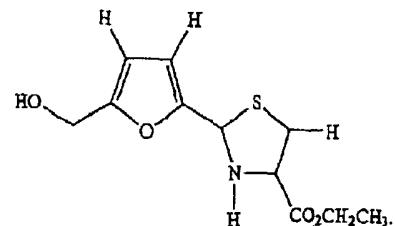
Lisboa, 2011-11-17

REIVINDICAÇÃO

1. Utilização de um composto da fórmula seleccionada de:



e



no fabrico de um medicamento para tratar a doença das células falciformes num paciente com sua necessidade.

Lisboa, 2011-11-17

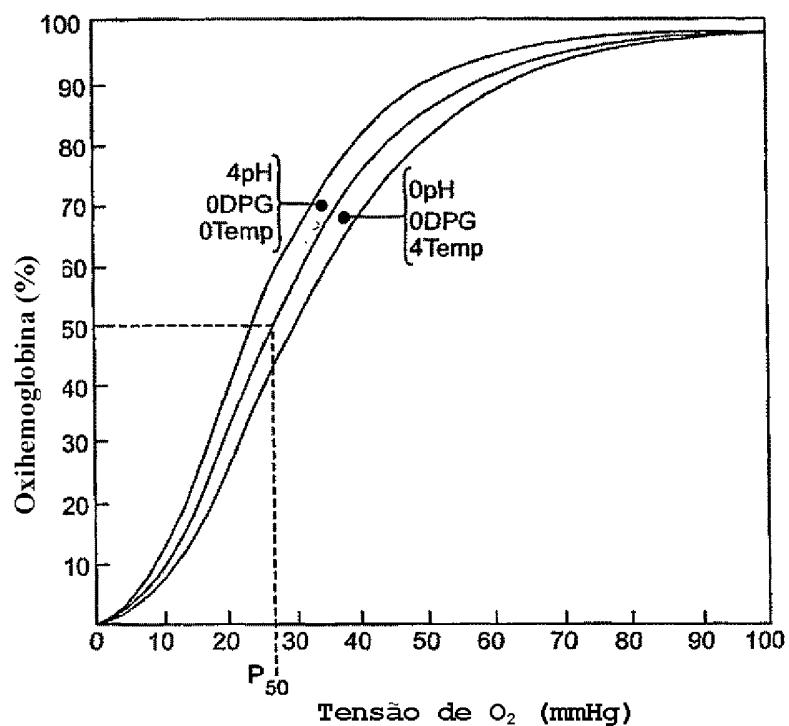


Figura 1

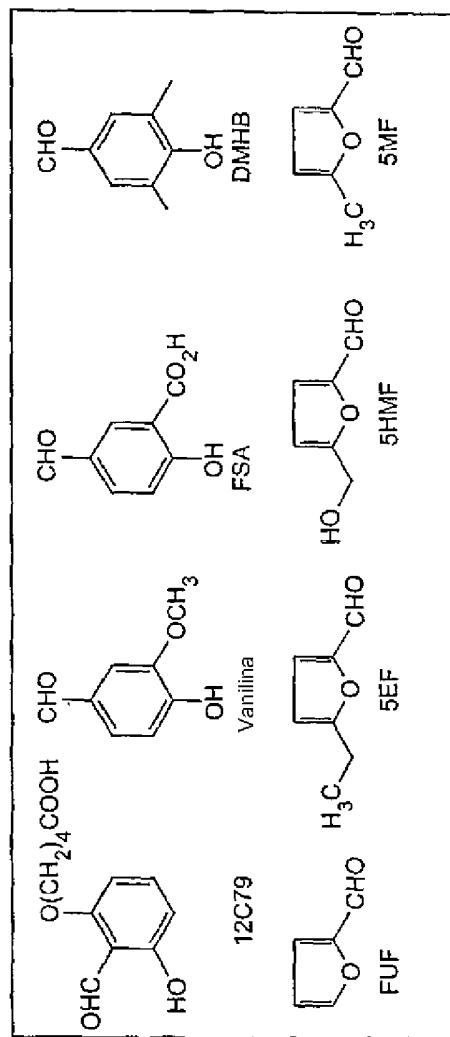


Figura 2

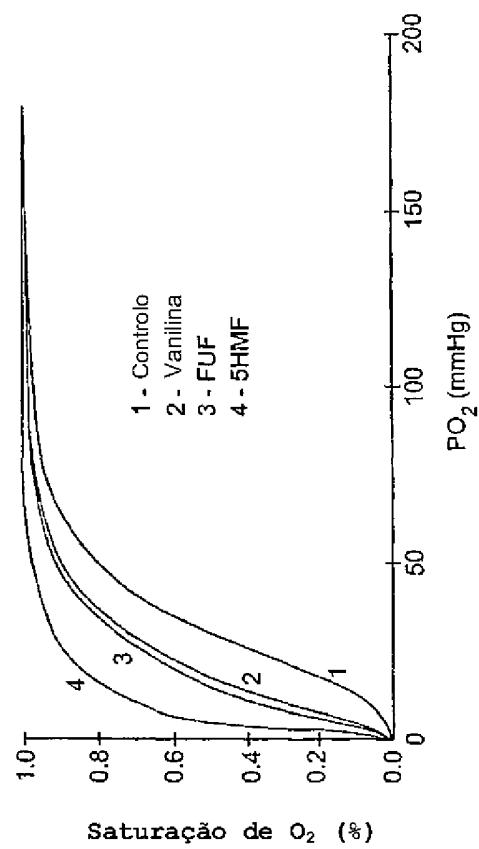


Figura 3

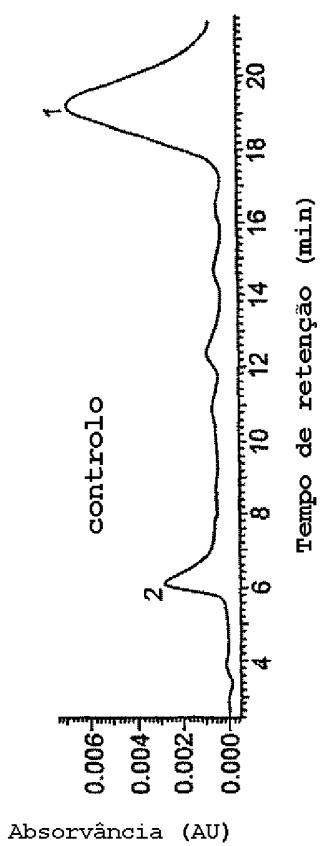


Figura 4A

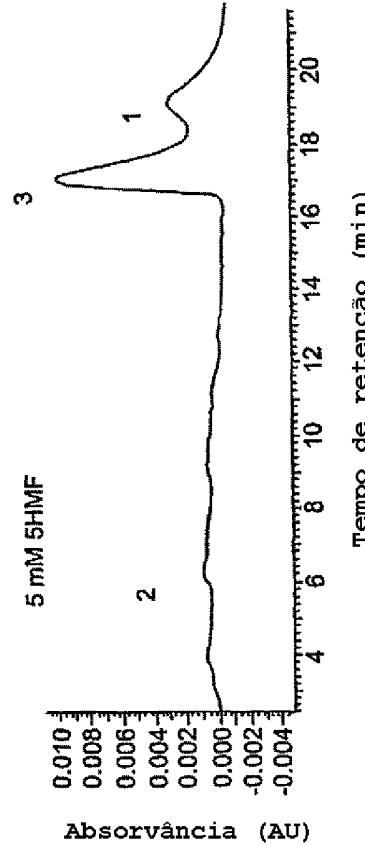


Figura 4B

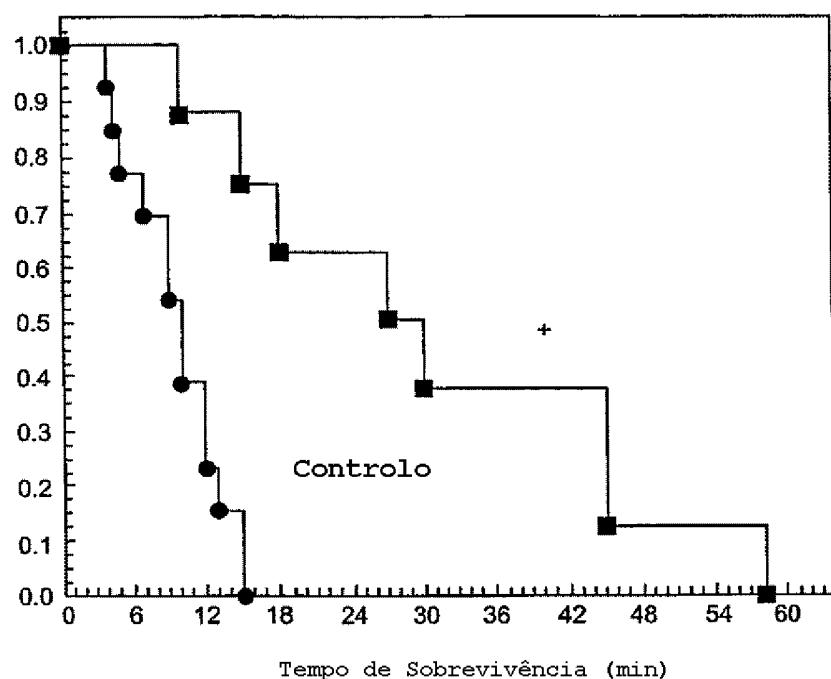


Figura 5

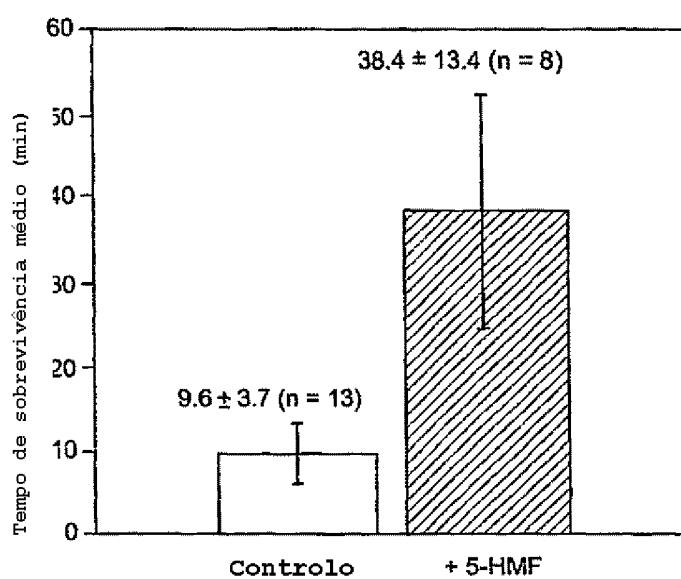


Figura 6

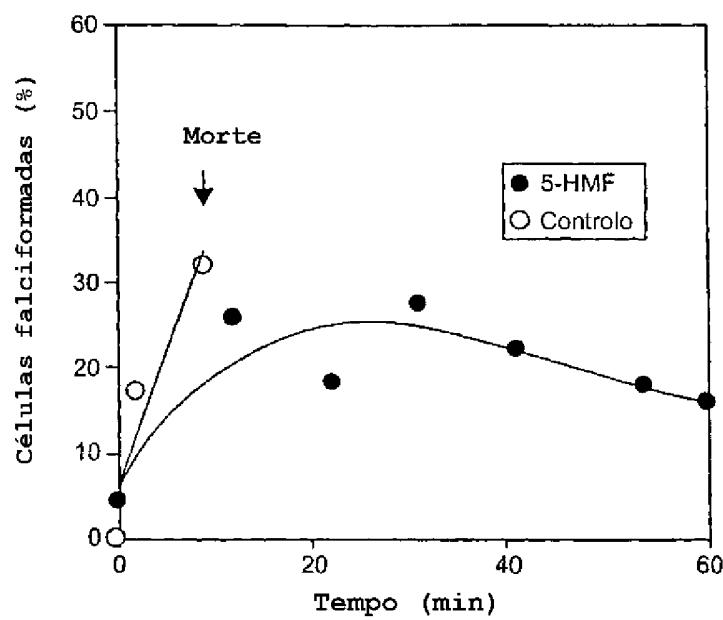


Figura 7