

(11) Número de Publicação: **PT 885229 E**

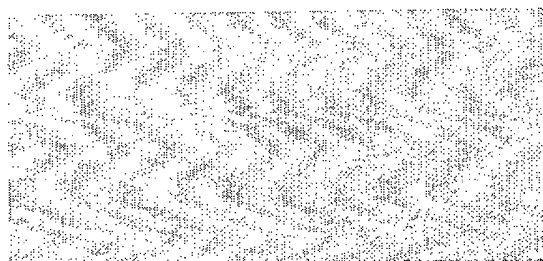
(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)
C07D491/14 A C07D495/14 B
C07D487/14 B C07D487/04 B
A61K031/40 B C07D491/14 C

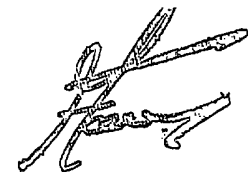
(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1997.02.20	(73) Titular(es): CEPHALON, INC. 145 BRANDYWINE PARKWAY WEST CHESTER, PA 19380 US
(30) Prioridade: 1996.02.21 US 604474	
(43) Data de publicação do pedido: 1998.12.23	(72) Inventor(es): ROBERT L. HUDKINS US JAMES L. DIEBOLD US ERNEST KNIGHT, JR. US
(45) Data e BPI da concessão: 2000.08.02	(74) Mandatário(s): ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) Epígrafe: PIRROLO[2,3]CARBAZOLO-6-ONAS CONDENSADAS QUE POTENCIAM A ACTIVIDADE DO INTERFERÃO GAMA

(57) Resumo:





DESCRIÇÃO

“Pirrolo[2,3-c]carbazolo-6-onas condensadas que potenciam a actividade do interferão gama”

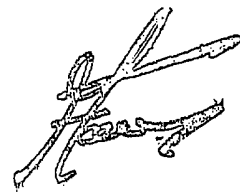
Campo do invento

Este invento está relacionado com compostos farmacêuticos que são referidos nesta patente como “pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-onas condensadas”. São também descritos métodos para a produção destes compostos e métodos para a utilização dos compostos.

Antecedentes do invento

O interferão gama humano (IFN- γ) é uma proteína imuno-reguladora natural humana. É considerada como um agente eficaz no tratamento de tumores e infecções virais em humanos. O mecanismo exacto através do qual IFN- γ inibe o desenvolvimento in vivo de vírus e de tumores permanece desconhecido. Existem provas de que o IFN- γ actua através de pelo menos um de dois mecanismos: (1) actuação directa na célula infectada pelo vírus e na célula tumoral e/ou (2) primeiro por activação das células do sistema imunitário, que depois destroem a célula infectada pelo vírus ou a célula tumoral [*Interferons and other Regulatory Cytokines*, E. De Maeyer e J. De Maeyer-Guignard, John Wiley & Sons. Nova Iorque (1988)].

Uma manifestação de um sistema imunitário estimulado é a expressão intensificada na superfície das células imunitárias das proteínas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). O MHC é constituído por genes da classe I, II e III que codificam as respectivas proteínas da classe I, II e III. As proteínas de classe I e II residem na superfície celular e estão envolvidas no controlo da resposta imunitária, ao passo que as proteínas da classe III surgem no soro e não estão envolvidas no controlo da resposta imunitária. As proteínas de classe I e II em células que apresentam antígenos, e.g. monócitos, linfócitos B, células dendríticas, apresentam linfócitos estranhos a linfócitos T com a destruição subsequente da célula contendo o antígeno estranho. A expressão intensificada das proteínas de classe I e II é essencial para que o sistema imunitário para livre um animal de células infectadas por vírus e para melhorar a produção de anticorpos específicos. O IFN- γ é um dos reguladores principais da resposta imunitária devido à sua capacidade para a intensificar a expressão de proteínas de classe I e II do MHC. Um exemplo do benefício do melhoramento do MHC I por IFN- γ consiste no aumento das proteínas da



classe I em células infectadas por vírus. As células infectadas por vírus apresentam antígenos virais sintetizados na sua superfície celular para o receptor de célula T em células T citotóxicas (células CD4) com a destruição subsequente da célula infectada por vírus, pela célula T citotóxica. Um exemplo do benefício do melhoramento de MHC II por IFN- γ consiste no aumento das proteínas da classe II em monócitos. Os monócitos podem ingerir microorganismos invasores e as proteínas de classe II na superfície do monócito apresentam péptidos derivados do microorganismo invasor. Estes péptidos mantidos pelas proteínas de classe II são apresentadas ao receptor de célula T em células T auxiliares (CD8) com a subsequente secreção de linfoquinas pela célula CD8. As linfoquinas segregadas originam a proliferação dos linfócitos B que segregam anticorpos que sintetizam grandes quantidades de anticorpos contra o microorganismo invasor.

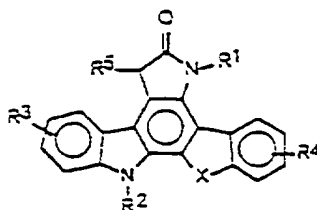
Verifica-se a partir dos exemplos anteriores que um composto que intensifique a indução por IFN- γ de moléculas de MHC, seria útil em combinação com IFN- γ para o tratamento de infecções por microorganismos. Este composto poderia permitir uma redução na dose de IFN- γ , originando deste modo, vantajosamente, o mesmo efeito terapêutico do IFN- γ sozinho, mas com menos efeitos secundários relacionados com o IFN- γ .

Existem pelo menos três referências de compostos que potenciam a expressão do MHC induzida por IFN- γ [Coutinho, G.C., Dudrieu-Trautmann, O., Strosberg, A.D. e Couraud, P.O., "Catecholamines Stimulate the IFN- γ -induced Class II MHC Expression on Bovine Brain Capillary Endothelial Cells", *J. Immunol.*, 147, 2525-2529 (1991); Zhu, J., Mix, E., Olsson, T. and Link, H. "Influence of Ion Channel Modulation of in Vitro Interferon- γ Induced MHC Class I and II Expression on Macrophages", *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 17, 109-136 (1995); Mothes, T., Bendix, U., Pfannschmidt, C. and Lehmann, I., "Effect of Gliadin and Other Food Peptides on Expression of MHC Class II Molecules by HT-29 Cells", *Gut*, 36, 548-552 (1995)].

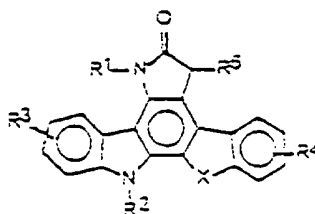
Sumário do invento

É aqui descrita uma nova classe de moléculas representadas pelas Fórmulas I e II, que referimos como pirrolo[2,3-c]carbazolo-6-onas condensadas.

Fórmula I



Fórmula II

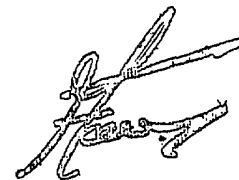


Os números dos constituintes são definidos infra. Métodos preferidos para a preparação destes compostos são descritos infra.

Verificámos que os nossos compostos de pirrolo[2,3-c]carbazolo-6-ona condensada (numeração tal como a considerada para K-252a e K-252c apresentada em Moody *et. al.*, *J. Org. Chem.*, 1992, 57, 2105) potenciam a actividade de IFN- γ humano na indução da expressão de MHC na superfície de células receptoras. Os compostos do invento apresentam capacidade para melhorar a eficiência do sistema imunitário e isto, por sua vez, proporciona, benéficamente, um melhoramento na inibição do desenvolvimento de vírus e/ou de tumores. Verificámos também que os compostos de pirrolo[2,3-c]carbazolo-6-ona condensada do invento são úteis para a potenciação, preferivelmente, da actividade neurotrofina-3 (NT-3).

Descrição detalhada

Descrevemos primeiro os desenhos.



I. Desenhos

A Figura 1 é um gráfico que apresenta a intensificação da expressão da molécula HLA-DR MHC II induzida por IFN- γ , pelas pirrolo[2,3-c]carbazolo-6-onas do invento.

A Figura 2 é um desenho esquemático resumindo a síntese química das pirrolo[2,3-c]carbazolo-6-onas de Fórmula I, Secção V (A)-(D).

A Figura 3 é um desenho esquemático apresentando a síntese de intermediários de pirrolo[2,3-c]carbazolo-6-onas.

A Figura 4 é um desenho esquemático apresentando uma síntese alternativa de intermediários de pirrolo[2,3-c]carbazolo-6-onas.

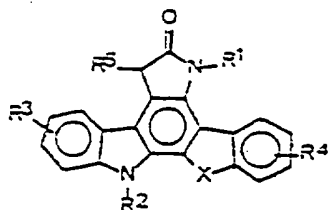
A Figura 5 é um desenho esquemático apresentando a síntese de pirrolo[2,3-c]carbazolo-6-onas de Fórmula II.

A Figura 6 é um desenho esquemático apresentando a síntese de pirrolo[2,3-c]carbazolo-6-onas nas quais X é C=O, a partir dos compostos correspondentes nos quais X é CH₂.

A Figura 7 é um desenho esquemático apresentando a síntese do intermediário 11 de pirrolo[2,3-c]carbazolo-6-onas.

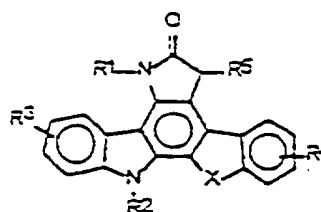
II. Pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-onas condensadas

Os novos compostos deste invento, que são referidos como derivados de pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-onas condensadas, são representados pelas Fórmulas seguintes:

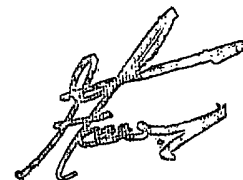


I

e



II



nas quais:

a) R^1 é seleccionado de entre o grupo consistindo em H, alquilo com 1-4 carbonos, grupos aromáticos monocíclicos e policíclicos, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo; $C(=O)R^9$, em que R^9 é alquilo com 1-4 carbonos ou um grupo aromático monocíclico ou policíclico; $(CH_2)_nOR^9$, em que n é um inteiro de 1-4; OR^{10} é H ou alquilo com 1-4 carbonos; $(CH_2)_nOR^{14}$, em que R^{14} é o resíduo de um aminoácido depois de o grupo hidroxilo do grupo carboxilo ter sido removido; OR^{14} , NR^7R^8 ; $(CH_2)_nNR^7R^8$ e $O(CH_2)_nNR^7R^8$; e ou

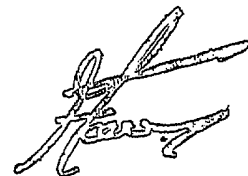
(1) R^7 e R^8 são, independentemente, H ou alquilo com 1-4 carbonos; ou

(2) R^7 e R^8 estão combinados para formarem um grupo de ligação de fórmula geral $-(CH_2)_2-X^1-(CH_2)_2-$, em que X^1 é O, S ou CH_2 ;

b) R^2 é seleccionado de entre o grupo consistindo em H, SO_2R^9 , CO_2R^9 , $C(=O)R^9$, alquilo, com 1-8 carbonos, alcenilo com até 8 carbonos, alcinilo com até 8 carbonos e um monossacárido com 5-7 carbonos, em que cada grupo hidroxilo do referido monossacárido é seleccionado independentemente de entre o grupo consistindo em hidroxilo não substituído e uma porção de substituição que substitui o referido grupo hidroxilo, seleccionada de entre o grupo consistindo em H, alquilo com 1-4 carbonos, alquilcarboniloxi com 2-5 carbonos e alcoxi com 1-4 carbonos; em que ou

1) cada alquilo com 1-8 carbonos, alcenilo com até 8 carbonos, ou alcinilo com até 8 carbonos não está substituído; ou

2) cada alquilo com 1-8 carbonos, alcenilo com até 8 carbonos, ou alcinilo com até 8 carbonos está, independentemente, substituído com 1-3 grupos seleccionados de entre o grupo consistindo em grupos aromáticos monocíclicos e policíclicos com 6-10 carbonos, heteroarilo, F, Cl, Br, I, CN, NO_2 , OH, OR^9 , $O(CH_2)_nNR^7R^8$, $OCOR^9$, $OCONHR^9$, O-tetra-hidropiraniolo, NH_2 , NR^7R^8 , $NR^{10}COR^9$, $NR^{10}CO_2R^9$, $NR^{10}CONR^7R^8$, $NHC(=NH)NH_2$, $NR^{10}SO_2R^9$; $S(O)_yR^{11}$, em que R^{11} é H, alquilo com 1-4 carbonos, um grupo aromático monocíclico ou policíclico com 6-10 carbonos, ou heteroarilo e y é 1 ou 2; SR^{11} , CO_2R^9 , $CONR^7R^8$, CHO, COR^9 , CH_2OR^7 , CH_2OR^9 , $CH=NNR^{11}R^{12}$, $CH=NOR^{11}$, $CH=NR^9$, $CH=NNHCH(N=NH)NH_2$; $SO_2NR^{12}R^{13}$; em que ou



(1a) R^{12} e R^{13} são, independentemente, H, alquilo com 1-4 carbonos, um grupo aromático monocíclico ou policíclico com 6-10 carbonos, ou heteroarilo; ou

(2a) R^{12} e R^{13} são combinados conjuntamente para formarem um grupo de ligação $-(CH_2)_2-X^1-(CH_2)_2$;

$PO(OR^{11})_2$, NHR^{14} , $NR^{10}R^{14}$, OR^{14} e um monossacárido com 5-7 carbonos em que cada grupo hidroxilo do referido monossacárido é seleccionado independentemente de entre o grupo consistindo em hidroxilo não substituído e uma porção de substituição que substitui o referido grupo hidroxilo, seleccionada de entre o grupo consistindo em H, alquilo com 1-4 carbonos, alquilcarboniloxi com 2-5 carbonos e alcoxi com 1-4 carbonos;

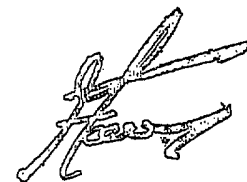
c) cada um de R^3 e R^4 é seleccionado, independentemente, de entre o grupo consistindo em H, grupos aromáticos monocíclicos e policíclicos com 6-10 carbonos, heteroarilo, F, Cl, Br, I, CN, CF_3 , NO_2 , OH, OR^9 , $O(CH_2)_nNR^7R^8$, $OCOR^9$, $CONHR^9$, NH_2 , $(CH_2)_nOR^9$, $(CH_2)_nOR^{10}$, $(CH_2)_nOR^{14}$, OR^{14} , NHR^{14} , NR^7R^8 , $NR^7(CH_2)_nNR^7R^8$, $NR^{10}COR^9$, $NR^{10}CONR^7R^8$, SR^{11} , $S(O)_yR^{11}$, CO_2R^9 , COR^9 , $CONR^7R^8$, CHO, $CH=NOR^{11}$, $CH=NR^9$, $CH=NNR^{11}R^{12}$, $(CH_2)_nSR^9$, $(CH_2)_nS(O)_yR^9$, CH_2SR^{15} , em que R^{15} é alquilo com 1-4 carbonos; $CH_2S(O)_yR^{14}$, $(CH_2)_nNR^7R^8$, $(CH_2)_nNHR^{14}$, alquilo com 1-8 carbonos, alcenilo com até 8 carbonos e alcinilo com até 8 carbonos; e ou

1) cada alquilo com 1-8 carbonos, alcenilo com até 8 carbonos ou alcinilo com até 8 carbonos não está substituído; ou

2) cada alquilo com 1-8 carbonos, alcenilo com até 8 carbonos ou alcinilo com até 8 carbonos está substituído independentemente tal como descrito anteriormente em b)2);

d) R^5 é seleccionado de entre o grupo consistindo em hidrogénio, alquilo com 1-8 carbonos, alcenilo com até 8 carbonos e alcinilo com até 8 carbonos; e ou

1) cada grupo alquilo, alcenilo ou alcinilo não está substituído; ou



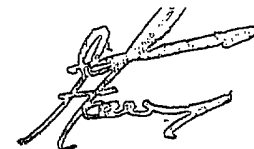
2) cada grupo alquilo, alcenilo ou alcinilo está substituído com 1-3 grupos seleccionados de entre o grupo consistindo em F, Cl, Br, I, CN, CF₃, NO₂, OH, OR⁹, O(CH₂)_nNR⁷R⁸, OCOR⁹, OCONHR⁹, NH₂, (CH₂)_nOR⁹, (CH₂)_nOR¹⁴, NR⁷R⁸, NR⁷(CH₂)_nNR⁷R⁸, NR¹⁰COR⁹, NR¹⁰CONR⁷R⁸, SR¹¹, S(O)_yR¹¹, CO₂R⁹, COR⁹, CONR⁷R⁸, CHO, CH=NOR¹¹, CH=NR⁹, CH=NNR¹¹R¹², (CH₂)_nSR⁹, (CH₂)_nS(O)_yR⁹, CH₂SR¹⁵, CH₂S(O)_yR¹⁴, (CH₂)_nNR⁷R⁸ e (CH₂)_nNHR¹⁴.

e) X é seleccionado de entre o grupo consistindo em -N-, -O-, -S-, -S(=O)-, -S(=O)₂-, alquilenos com 1-3 carbonos, -C(=O)-, -C(R³)=C(R³)-, -C(R³)₂-, -CH=CH-, -CH(OH)-CH(OH)-, -C(=NOR¹¹)-, -C(OR¹¹)(R¹¹)-, -C(=O)CH(R¹⁵)-, CH(R¹⁵)C(=O)-; -CH₂-Z-, -Z-CH₂-, -CH₂ZCH₂-, em que Z é seleccionado de entre o grupo consistindo em -C(OR¹¹)(R¹¹)-, O, S, C(=O), e NR¹¹; e alquilenos com 1-3 carbonos substituído com um grupo seleccionado de entre o grupo consistindo em um grupo substituinte R⁵, SR¹⁰, OR¹⁰, OR¹⁴, R¹⁵, fenilo, naftilo e arilalquilo com 7-14 carbonos.

Tal como aqui usado, o termo "arilo" significa grupos aromáticos monocíclicos e policíclicos incluindo por exemplo, grupos fenilo, naftilo, bifenilo e xililo. Os grupos arilo podem estar substituídos ou não substituídos com, por exemplo, grupos alquilo e halogéneo. Os halogéneos incluem flúor, cloro, bromo e iodo. São preferidos grupos arilo que contenham 6-10 carbonos. São particularmente preferidos grupos fenilo e naftilo.

Tal como aqui usado, o termo "heteroarilo" significa uma porção arilo que contém pelo menos um átomo de azoto básico e 0-4 heteroátomos seleccionados de entre O, S e N. Exemplos de grupos heteroarilo incluem pirrolilo, piranilo, tiopiranilo, furilo, imidazolilo, piridilo, tiazolilo, triazinilo, ftalimido, indolilo, purinilo e benzotiazolilo.

Tal como aqui usado relativamente à definição de R¹⁴, o termo "aminoácido" significa uma molécula que contém um grupo amino e um grupo carboxilo. Ele inclui um "α-aminoácido" que tem o seu significado habitual de um ácido carboxílico, que comporta uma funcionalidade amino no carbono adjacente ao grupo carboxilo. Os α-aminoácidos podem ser de ocorrência natural ou de ocorrência não natural. Os aminoácidos também incluem "dipéptidos" que são aqui definidos como dois aminoácidos que estão unidos por uma ligação peptídica amida. Assim, os constituintes dos dipéptidos não estão limitados a α-aminoácidos e podem ser qualquer molécula que contém um grupo amino e um grupo carboxilo. Os α-aminoácidos preferidos são dipéptidos tais como lisil-β-alanina e ácidos amino-alcanóicos com 2-8 carbonos, *e.g.*, ácido 3-dimetilaminobutírico.



Grupos "alquilo" preferidos contêm 1-4 átomos de carbono e grupos "alcenilo" e "alcinilo" preferidos contêm até 4 átomos de carbono.

Grupos R^1 preferidos incluem H, alquilo com 1-4 carbonos, fenilo substituído ou não substituído, OR^{10} e $O(CH_2)_nNR^7R^8$. Substituintes preferidos do fenilo incluem alquilo com 1-4 carbonos e halogéneo. O mais preferido é H.

Grupos R^2 preferidos incluem H, $C(=O)R^9$, alquilo com 1-8 átomos e alquilo com 1-8 carbonos, substituídos com um grupo OR^9 , OH, $OCOR^9$, NR^7R^8 , NH_2 , $NR^{10}COR^9$ ou $NR^{10}R^{14}$. O mais preferido é H.

Grupos R^3 e R^4 preferidos incluem H, halogéneo, CN, OH, OR^9 , OR^{14} , NH_2 , NR^7R^8 , $(CH_2)_nOR^{10}$, $(CH_2)_nOR^{14}$, COR^9 , $NR^{10}COR^9$, NHR^{14} e $O(CH_2)_nNR^7R^8$. O mais preferido é H.

Grupos R^5 preferidos incluem H e alquilo com 1-4 carbonos. O mais preferido é H.

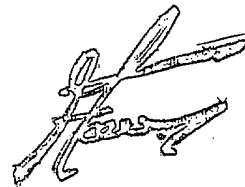
Grupos X preferidos incluem -N-, -O-, -S-, alquilenos com 1-3 carbonos, $-C=O-$, $-CH_2-Z-$ e $-Z-CH_2-$. Muito preferidos são -N-, -O-, -S- e grupos $-CH_2-$.

III. Utilidades das pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-onas condensadas

As nossas pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-onas condensadas evidenciaram uma panóplia de importantes actividades funcionais que têm utilidade numa variedade de cenários, incluindo as áreas da investigação e da terapêutica. Para facilidade de apresentação e de modo a não limitar a gama de utilidades para as quais estes compostos podem ser caracterizados, as actividades preferidas das pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-onas condensadas podem ser geralmente descritas como segue:

- A. Intensificação da indução por IFN- γ de moléculas do MHC;
- B. Potenciação da função e/ou da sobrevivência de células que respondem a factor trófico.

A intensificação da indução por IFN- γ de moléculas do MHC pode, preferivelmente, ser estabelecida utilizando uma linha de celular de monócito humano que responda a IFN- γ ; uma linha celular particularmente preferida está disponível em American Type Culture Collection (ATCC), sendo referida como THP-1, com o número de acesso ATCC TIB-202. Sabe-se que o IFN- γ induz a expressão dos três heterodímeros do MHC II, HLA-DP,



HLA-DQ e HLA-DR, em células THP-1. A potenciação da função e/ou da sobrevivência de células que respondem a factor trófico, *e.g.*, células da linhagem neuronal pode ser, preferivelmente, estabelecida usando um ensaio de colina-acetiltransferase ("ChAT") de espinal-medula cultivada.

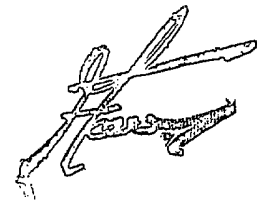
Tal como aqui usado, o termo "potenciação" quando usado para qualificar os termos "função" e "sobrevivência", significa uma alteração ou mudança positiva. Uma potenciação que seja positiva também pode ser aqui referida como "intensificação" ou "aumento".

Tal como aqui usado, os termos "melhorar", "aumentar" ou intensificação, quando usados para qualificarem os termos "função", "sobrevivência" ou "indução" significam que a presença de uma pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-ona condensada, tem um efeito comparativamente superior sobre a função e/ou sobrevivência de uma célula com resposta a factor trófico ou, no caso do IFN- γ , na indução de moléculas do MHC, do que uma célula comparativa à qual não foi apresentada a pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-ona condensada.

Tal como aqui usado, o termo "neurónio", "célula de estirpe neuronal" e "célula neuronal" inclui, mas não está limitado, a uma população heterogénea de tipos neuronais tendo transmissores únicos ou múltiplos e/ou funções únicas ou múltiplas; preferivelmente eles são neurónios colinérgicos. Tal como aqui usada, a frase "neurónio colinérgico" significa neurónios do Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP) cujo neurotransmissor é a acetilcolina; são exemplos os neurónios do prosencéfalo basal e neurónios da espinal-medula.

Tal como aqui usado, um "factor trófico" é uma molécula que directa ou indirectamente afecta a sobrevivência ou função de uma célula que responde a factor trófico. Factores tróficos de exemplo incluem Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF), Factor de Crescimento de Fibroblasto básico (bFGF), insulina e factores de crescimento semelhantes a insulina (*e.g.*, IGF-I, IGF-II, IGF-III), interferões, interleucinas, citóquinas e as neurotrofinas, incluindo Factor de Crescimento do Nervo (NGF), Neurotrofina-3 (NT-3), Neurotrofina-4/5 (NT-4/5) e Factor Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF).

Uma "célula que responde a factor trófico" tal como aqui definido, é uma célula que inclui um receptor ao qual um factor trófico se pode ligar especificamente; exemplos incluem neurónios (*e.g.*, neurónios colinérgicos) e células não neuronais (*e.g.*, monócitos e células neoplásticas).



Tal como aqui usado, “actividade de factor trófico” e “actividade induzida por factor trófico” são definidas como qualquer resposta que directa ou indirectamente resulte da ligação de um factor trófico (*e.g.*, NT-3) a uma célula que compreenda um receptor de factor trófico.

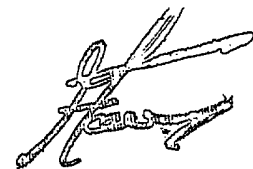
Tal como usado nas frases “actividade de factor trófico” e “actividade induzida por factor trófico”, o termo “factor trófico” inclui tanto factores tróficos endógenos como exógenos, referindo-se “endógeno” a um factor trófico já presente e “exógeno” referindo-se a um factor trófico adicionado a um sistema. Tal como definido, “actividade induzida por factor trófico” inclui actividade induzida por (1) factores tróficos endógenos; (2) factores tróficos exógenos; (3) e uma combinação de factores tróficos endógenos e exógenos.

A. Intensificação da Indução por IFN- γ de Moléculas do MHC

Os compostos do invento podem ser usados para intensificar a indução de moléculas do MHC por IFN- γ . O IFN- γ mostrou eficácia no tratamento de infecções virais e de certos tumores. Contudo, devido aos seus efeitos secundários que limitam a dose, a utilidade do IFN- γ tem sido limitada. Numa situação de imunocompromisso, *e.g.*, num paciente que evidencia uma infecção viral, seria benéfica a intensificação de uma resposta imunitária mediada por IFN- γ , dado que o IFN- γ induz a expressão de moléculas do MHC. Como tal, são benéficos os compostos deste invento que melhoram a capacidade do IFN- γ endógeno ou do IFN- γ administrado exogenamente, para induzirem a expressão do MHC.

Tal como detalhado na Secção V seguinte, a capacidade de uma pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-ona condensada para intensificar a indução por IFN- γ de moléculas do MHC é, preferivelmente, avaliada usando a linha celular THP-1. Esta linha celular evidencia a expressão de heterodímero HLA-DR do MHC II. Comparando a expressão de HLA-DR na presença de IFN- γ e de IFN- γ com uma ou mais pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-onas condensadas do presente invento, pode ser proporcionado um método rápido e eficiente para a determinação do melhoramento na indução por IFN- γ de moléculas do MHC.

Os compostos deste invento podem ser utilizados no desenvolvimento de modelos *in vitro* de intensificação da expressão de moléculas do MHC, função, identificação ou para a selecção de outros compostos sintéticos que tenham actividades semelhantes aos das pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-onas condensadas. Os compostos podem ser utilizados num meio de pesquisa para investigar, refinar e determinar alvos moleculares associados a respostas



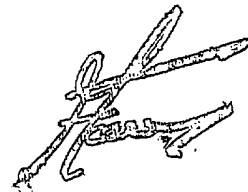
funcionais. Por exemplo, por radiomarcção de uma pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-ona condensada associada a uma função celular específica (*e.g.*, indução de HLA-DR), a entidade alvo à qual a pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-ona condensada se liga, pode ser identificada, isolada e purificada para caracterização. Num outro exemplo, uma pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-ona condensada pode ser ainda utilizada como uma ferramenta de selecção para encontrar agentes que tenham actividade marginal, mas que quando combinados com pelo menos uma pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-ona condensada descrita, sejam capazes de intensificar a indução por IFN- γ de moléculas do MHC. Dado que as pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-onas condensadas descritas são úteis na intensificação da indução por IFN- γ de moléculas do MHC, os compostos descritos têm utilidade benéfica como agentes terapêuticos. Esta intensificação tem valor num paciente imunocomprometido.

B.Potenciação da função e/ou sobrevivência de células que respondem a factor trófico

As pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-onas condensadas deste invento pode ser utilizadas para intensificar a função e/ou sobrevivência de células de linhagem neuronal. As pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-onas condensadas podem ser utilizadas individualmente ou com outras pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-onas condensadas, ou em combinação com outras moléculas benéficas, tais como indolocarbazolos que também têm a capacidade de potenciar a função e/ou sobrevivência de uma dada célula. Em situações em que a pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-ona condensada intensifica uma actividade biológica, *e.g.*, actividade de neurotrofina, podem ser utilizadas neurotrofinas exógenas, tais como NT-3 em conjunto com a pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-ona condensadas.

Uma variedade de desordens neurológicas são caracterizadas por células neuronais que estão a morrer, lesionadas, funcionalmente comprometidas, sofrendo de degeneração axonal em risco de morrerem, etc. Estas desordens incluem, mas não estão limitadas a: Alzheimer, desordens dos neurónios motores (*e.g.*, esclerose lateral amiotrófica); Parkinson; doenças cerebrovasculares (*e.g.*, esclerose múltipla); neuropatias periféricas (*e.g.*, aquelas que afectam os neurónios DRG em neuropatia periférica associada a quimioterapia); desordens induzidas por aminoácidos excitadores; desordens associadas a lesões de concussão e de penetração no cérebro ou na espinal-medula.

Tal como descrito na Secção V seguinte, a capacidade de uma pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-ona condensada para intensificar a função e/ou sobrevivência de células de uma linhagem neuronal pode ser determinada empregando um ensaio de



actividade de ChAT do prosencéfalo basal. A ChAT catalisa a síntese do neurotransmissor acetilcolina e é considerada como um marcador enzimático para um neurónio colinérgico funcional. Um neurónio funcional também é capaz de sobrevivência. A intensificação de uma neurotrofina, tal como NT-3, pode ser determinada por comparação da actividade funcional da neurotrofina com ou sem a presença da pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-ona condensada.

Sais farmacêuticamente aceitáveis das pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-onas condensadas também estão no âmbito do presente invento. O termo "sais farmacêuticamente aceitáveis", tal como aqui usado significa um sal de adição de ácido inorgânico, tal como cloridrato, sulfato e fosfato ou um sal de adição de ácido orgânico, tal como acetato, maleato, fumarato, tartarato e citrato. Exemplos de sais de metal, farmacêuticamente aceitáveis, são sal de metal alcalino, tais como sal de sódio e sal de potássio, sais de metal alcalino-terroso, tais como sal de magnésio, sal de cálcio, sal de alumínio e sal de zinco. Exemplos de sais de amónio farmacêuticamente aceitáveis são sal de amónio e sal de tetrametilamónio. Exemplos de sais de adição de amina orgânica farmacêuticamente aceitáveis são sais com morfolina e piperidina. Exemplos de sais de adição de aminoácido farmacêuticamente aceitáveis são sais com lisina, glicina e fenilalanina.

Os compostos aqui proporcionados podem ser formulados em composições farmacêuticas por mistura com excipientes e portadores não tóxicos, farmacêuticamente aceitáveis. Estas composições podem ser preparados para uso em administração parentérica, particularmente na forma de soluções ou suspensões líquidas; ou administração oral, especialmente na forma de comprimidos ou cápsulas; ou intranasalmente na forma de pós, gotas nasais ou aerossóis; ou dermicamente, através de, por exemplo, pensos transdérmicos.

A composição pode ser administrada convenientemente em forma de dosagem unitária e pode ser preparada por qualquer método bem conhecidos na arte farmacêutica, por exemplo, tal como descrito em *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980). Formulações para administração parentérica podem conter, como excipientes comuns, água estéril ou solução salina, polialquilenoglicol, tais como polietilenoglicol, óleos de origem vegetal, naftalenos hidrogenados e semelhantes. Em particular, polímero de láctido, copolímero de láctido/glicólido ou copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, biocompatíveis, biodegradáveis, podem ser excipientes úteis para o controlo da libertação dos compostos activos. Outros sistemas de distribuição parentérica, potencialmente úteis para estes compostos activos, incluem partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusão implantáveis

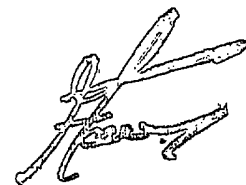
e lipossomas. Formulações para administração por inalação contêm como excipientes, por exemplo, lactose, ou podem ser soluções aquosas contendo, por exemplo, polioxietileno-éter 9-laurílico, glicocolato e desoxicolato ou soluções oleosas para administração na forma de gotas nasais ou como um gel para ser aplicado intranasalmente. Formulações para administração parentérica também podem incluir glicocolato para administração bucal, um salicilato para administração rectal ou ácido cítrico para administração vaginal. Formulações para pensos transdérmicos são preferivelmente emulsões lipófilas.

Os compostos deste invento podem ser empregues como o único agente activo numa composição farmacêutica. Alternativamente, eles podem ser usados em combinação com outros ingredientes activos, *e.g.*, IFN- γ sintético e/ou outros factores de crescimento que facilitam a potenciação de NT-3 tal como descrito na patente U.S. Nº 5,468,872 e publicação internacional Nº WO 95/07911 (data da publicação, 23 de Março de 1995).

As concentrações dos compostos deste invento numa composição terapêutica podem variar. A concentração dependerá de factores, tais como a dosagem total da droga a ser administrada, as características químicas (*e.g.*, hidrofobicidade) dos compostos empregues e da via de administração. Os compostos deste invento são proporcionados tipicamente numa solução tampão aquosa fisiológica, contendo cerca de 0,1 a 10% p/v do composto para administração parentérica. Gammas de dose típicas são de cerca de 1 $\mu\text{g/kg}$ a cerca de 1 g/kg de peso corporal por dia; uma gama de dose preferida é de cerca de 0,01 mg/Kg a 100 mg/kg do peso corporal por dia. É provável que uma dosagem preferida da droga a ser administrada dependa de variáveis, como o tipo e extensão da progressão da doença ou desordem, do estado de saúde global do paciente particular, da eficiência biológica relativa do composto seleccionado e da formulação do composto excipiente e da sua via de administração.

IV. Descrição geral do processo sintético

Foram empregues duas vias sintéticas para a preparação dos derivados de pirrolo[2,3-c]-carbazono-6-ona condensada do invento. No Método A (FIG. 2) um derivado 2-(arilo) ou de 2-(heteroarilo)indolo (1-4) que está não substituído ou substituído nos carbonos 4-7 (inclusive) do anel indolo (R^3) substituído ou não substituído na porção (hetero)arilo (R^4), é feito reagir com maleimida na presença de um catalisador, tal como ácido trifluoroacético (TFA), para originar os derivados de pirrolo[2,3-c]-carbazono-6-ona condensada de Fórmula I (Exemplos I-IV). Para a reacção também podem ser utilizados catalisadores ácidos de Lewis adicionais, tais como SnCl_4 , AlCl_3 , EtAlCl_2 ou Et_2AlCl . A



reacção também pode decorrer num solvente, tal como TFA, tolueno, CH_2Cl_2 ou 1,2-dicloroetano.

Os intermediários bi-ariloindolo, 2-2'-bi-indolo **1** ($\text{X}=\text{N}$, R^2 , R^3 , $\text{R}^4=\text{H}$), 2-(2-furil)indolo **2** ($\text{X}=\text{O}$, R^2 , R^3 , $\text{R}^4=\text{H}$) e 2-(benzotienil)indolo **3** ($\text{X}=\text{S}$, R^2 , R^3 , $\text{R}^4=\text{H}$) podem ser preparados utilizando procedimentos comuns da literatura (Hudkins, R.L.; *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1995, 60, 6218) (FIG. 2). Os derivados 2-(2-indenil)indolo **4** (FIG. 3) ($\text{X}=\text{CH}_2$, R^2 , R^3 , $\text{R}^4=\text{H}$) ou 2-(2-indenil)indolo substituídos com um grupo R^3 ou R^4 , podem ser preparados por reacção de 1-carboxi-2-(tributilestanil)indolo **5** ou 1-carboxi-2-(tributilestanil)indolo substituídos com um grupo R^3 (Hudkins, R.L.; *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1995, 60, 6218) por 2-bromo-indeno **6** (*J. Org. Chem.*, 1982, 47, 705) ou um 2-bromo-indeno substituído com um grupo R^4 . Alternativamente, os derivados 2-(2-indenil)indolo **4** ($\text{X}=\text{CH}_2$, R^2 , R^3 , $\text{R}^4=\text{H}$) ou 2-(2-indenil)indolo substituídos com um grupo R^3 ou R^4 , podem ser preparados por reacção de 1H-indolo ou de um seu derivado contendo um grupo R^3 , protegido como um intermediário indol-1-carboxilato de lítio (*Tetrahedron Lett.*, 26:5935 (1985)), sendo depois tratado com uma base forte, tal como t-BuLi, depois alquilado com uma 2-indanona ou derivado de 2-indanona substituída com um grupo R^4 , adequadas, para originar o álcool terciário **7** correspondente (FIG. 4). O álcool terciário **7** resultante é tratado com um ácido diluído (*e.g.*, HCl 2N em acetona) para originar o correspondente 2-(2-indenil)indolo **4** (Patente EUA 5.475.110). Usando outras benzociclo-alcan-2-onas, tal como 2-tetralona na sequência reacção apresentada na Figura 4, obter-se-ia 2-(2-(3,4-dihidronaftil)indolo **8** ($\text{X}=\text{CH}_2\text{CH}_2$, R^2 , R^3 , $\text{R}^4=\text{H}$) (Patente U.S. 5,475,110). A metodologia de acoplamento cruzado catalisado por paládio (reacção de Stille) pode ser usada para preparar outros derivados, por exemplo, quando X na Figura 3 tem 1-3 carbonos (inclusive), por acoplamento do derivado 2-(trifluorometanossulfonato)- ou o 2-iodo- ou 2-bromovinil- da correspondente cetona cíclica com 1-carboxi-2-tributilestanilindolo para originar 2-(2-benzociclo-alcenil)indolos.

O derivado 1H-indolo de partida descrito anteriormente é convertido num derivado 1-indolo substituído (R^2 é H) por metodologia comum, por exemplo, por tratamento do 1H-indolo com uma base e com um agente de alquilação para originar um indolo substituído em 1. Nestes exemplos, o derivado indolo pode ser tratado directamente com uma base forte (*e.g.*, t-BuLi, sec-BuLi, n-BuLi, di-isopropilamida de lítio) seguindo-se alquilação com um derivado de 2-indanona para originar o álcool terciário **7** correspondente, que inclui substituintes R^2 na posição um do anel indolo. O derivado 2-(aril)- ou 2-(hetero-aril)indolo (**1-3**), 2-(2-indenil)indolo **4** ou 2-(2-(1,2-dihidronaftil)indolo **8** pode ser convertido em



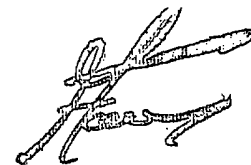
intermediários que contenham substituintes R^2 na posição um do anel indolo, pelo método descrito anteriormente para derivados indolo.

Compostos com as Fórmulas gerais **I** e **II** que contenham grupos R^1 , diferentes de H, podem ser preparados começando com a maleimida substituída com R^1 adequada (FIG. 2, Método A). Compostos de Fórmulas gerais **I** e **II**, em que R^1 é hidrogénio, podem ser alquilados na presença de base (e.g., hidretos, alcóxidos, hidróxidos de metais alcalinos ou alcalino-terrosos ou compostos de organolítio) por tratamento com R^1L em que L é um grupo que se despede tal como um halogéneo, mesilato ou tosilato para originar um derivado de pirolocarbazolo-6-ona condensada que tem um grupo R^1 ligado ao azoto da lactama. Compostos de Fórmulas gerais **I** e **II**, em que R^5 é hidrogénio, podem ser convertidos em derivados em que um ou dois grupos R^5 podem ser adicionados por tratamento de um derivado pirolocarbazolo-6-ona condensada, com um equivalente ou um excesso de uma base forte (e.g., hidretos, alcóxidos, hidróxidos de metais alcalinos ou alcalino-terrosos ou compostos de organolítio) com R^5L em que L é um grupo que se despede, tal como um halogéneo ou por condensação com um derivado de carbonilo de cetona ou aldeído que contenha R^5 para originar um derivado pirolocarbazolo-6-ona condensada com um ou dois grupos R^5 . Os derivados das reacções de condensação da cetona ou do aldeído originariam derivados vinílicos com R^5 .

Os derivados de indolo são preparados usando metodologia comum (patente U.S. 3,976,639; patente U.S. 3,732.245; *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Indoles Partes Um e Dois; Houlihan Ed., Wiley-Interscience (1972)). Os derivados 2-indanona podem ser preparados usando procedimentos já descritos (ver patente U.S. 4,192,888; patente U.S. 4,128,666; *J. Am. Chem. Soc.*, 89: 4524 (1967); *Tetrahedron Lett.*, 43: 3789 (1974); *Chem. Ber.*, 122: 1791 (1989); *Can. J. Chem.*, 60: 2678 (1982); *Helvetica Chimica Acta* 70: 1791 (1987); *Chem. Pharm. Bull.*, 33: 3336 (1985); *J. Org. Chem.*, 55: 4835 (1990); *Tetrahedron* 45: 1441 (1989); *Synthesis* 818 (1981)).

No método B (FIG. 2), um derivado 2-(heteroarilo)indolo (**1-3**), ou derivado 2-(aril)indolo, tal como 2-(2-indenil)indolo **4** é feito reagir com *cis*- β -ciano-acrilato de etilo na presença de um catalisador, tal como $SnCl_4$, $AlCl_3$, $EtAlCl_2$, Et_2AlCl ou TFA em CH_2Cl_2 , C_6H_5Cl ou tolueno como um solvente para originar os compostos 6-oxo-carbazolo de Fórmula I do invento.

Os compostos de Fórmula **II** são preparados tal como delineado na FIG. 5. A adição de reagentes 2-(aril)- ou 2-(hetero-aril)indolilzinco (*Tetrahedron Lett.*, 1994, 35, 793;



Tetrahedron Lett., 1994, 35, 7123; *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, 5955; *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, 6245) a succinimida ou a um derivado succinimida substituído com R^1 , através de uma reacção do tipo de Reformatzky (*Synthesis*, 1975, 685) seguida de desidratação, originaria compostos de estrutura geral 9. O fecho do anel catalisado por paládio (patente U.S. 5,475,110; *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, 8361) originaria compostos de pirrolo[2,3-c]carbazolo de Fórmula II.

Compostos em que $X=(C=O)$ (estrutura geral 10) são preparados por oxidação de derivados de Fórmula geral I (ou II) em que $X=CH_3$, usando reagentes comuns de oxidação (e.g., SeO_2 , CrO_3 , Na_2CrO_7 ou MnO_2) (FIG. 6). Alternativamente, o 2-(2-indenil)indolo 4 pode ser oxidado em 2-(2-(1-oxo-indenil)indolo e usado para a preparação de compostos de Fórmula I ou II em que $X = (C=O)$ através dos métodos apresentados nas FIG. 2 e 5. Alternativamente, o 2-(2-(1-oxo-indenil)indolo 11 pode ser preparado usando a metodologia de acoplamento catalisado por paládio (FIG. 3) por acoplamento de 1-carboxi-2-tributylestanilindolo 5 ou seus derivados com 2-(trifluorometanossulfonil)oxi-inden-1-ona ou 2-bromo-inden-1-ona 12 (FIG. 7) (*J. Org. Chem.* 1994, 59, 3453) ou um dos seus derivados. Compostos da estrutura geral 10 ($X = (C=O)$) podem sofrer uma variedade de reacções de olefinação, adição e condensação conhecidas pelos peritos na arte da síntese orgânica para originar, por exemplo, mas sem lhes estarem limitados, derivados $X = (C=C(R^2)^2)$, $C(R^2)^2$, $C(OR^{11})(R^{11})$. Derivados de pirrolocarbazolo-6-ona condensada em que X for $S(=O)$ ou $S(=O)_2$ podem ser preparados por oxidação de derivados $X = S$ de um modo semelhante a $X = (C=O)$.

Exemplos

V. Descrição Específica dos Processos Sintéticos

Os Exemplos seguintes são apresentados para fins de ilustração e não devem ser considerados como limitando de qualquer modo o âmbito do invento.

A. Exemplo I : 5H,7H,13H-benzofurano[2,3-a]pirrolo[2,3-c]carbazolo-6(6H)ona
($X = O$; $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H$)

Uma mistura de 2-(2-benzofuril)indolo 2 (250 mg; 1,0 mmol) e maleimida (110 mg; 1,2 mmol) em ácido trifluoroacético (2 ml) foi aquecida a $125^\circ C$ durante 18 h, num frasco de reacção selado. O sólido precipitado foi recolhido, lavado com TFA e seco para originar 150 mg (48%) de produto. A recristalização (THF) originou um sólido castanho; p.f. $>300^\circ C$,



EM (ES⁺) 312 (M⁺), ¹H RMN (DMSO - d₆) δ 4,00 (s, 2H), 4,13 (s, 2H), 7,12 (t, 1H), 7,37 (t, 2H), 7,45 (t, 2H), 7,71 (d, 1H), 7,95 (d, 1H), 8,54 (d, 1H), 10,12 (s, 1H), 11,79 (s, 1H). Anal. calc. para C₂₀H₁₂N₂O₂.0,4H₂O; C, 75,18; H, 4,04; N, 8,77. Determinado: C, 75,29, H, 3,86, N, 8,60.

B. Exemplo II : 5H,7H,13H-benzotieno[2,3-a]pirrolo[2,3-c]carbazolo-6(6H)ona
(X = S; R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H)

Uma mistura de 2-(2-benzotienil)indolo **3** (100 mg, 0,4 mmol) e maleimida (40 mg; 0,4 mmol) em ácido trifluoroacético (2 ml) foi aquecida a 125°C, durante 16 h, num frasco de reacção selado. O sólido precipitado foi recolhido, lavado com metanol arrefecido e seco para originar 80 mg (58%) de produto. Recristalização (THF) originou um sólido castanho; p.f. >300°C, EM (ES⁺) 328 (M⁺), ¹H RMN (DMSO - d₆) δ 4,10 (s, 2H), 7,20 (t, 1H), 7,40-7,60 (m, 4H), 8,10 (d, 1H), 8,80 (m, 1H), 10,86 (s, 1H), 11,80 (s, 1H). Anal. calc. para C₂₀H₁₂N₂SO.0,5H₂O; C, 71,20; H, 3,88; N, 8,30. Determinado: C, 70,86, H, 3,61, N, 8,39.

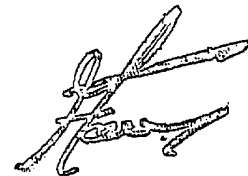
C. Exemplo III : 5H,7H,12H,13H-indolo[2,3-a]pirrolo[2,3-c]carbazolo-6(6H)ona
(X = N; R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H)

(1) Método A

A uma mistura de 2-2'-bi-indolo **1** (250 mg; 1,0 mmol) e de maleimida (110 mg; 1,2 mmol) suspensa em tolueno (50 ml) foi adicionado ácido trifluoroacético (0,5 ml). A solução foi aquecida ao refluxo durante 18 h, arrefecida até t.a. e concentrada a aproximadamente 20 ml. A solução foi arrefecida num banho com gelo, o sólido precipitado foi recolhido, lavado com éter frio e seco para originar 150 mg (55%) de produto. A purificação por cromatografia em coluna (EtOAc: hexanos; 2:1) originou um sólido castanho-bronze, p.f. >320°C, EM (ES⁺) 311 (M⁺), ¹H RMN (DMSO - d₆) δ 4,00 (s, 2H), 7,17-7,22 (m, 2H), 7,37-7,42 (m, 2H), 7,67 (d, 2H), 8,03 (d, 1H), 8,58 (d, 1H), 10,87 (s, 1H), 10,92 (s, 1H), 11,18 (s, 1H). Anal. calc. para C₂₀H₁₂N₂O₂.0,5H₂O; C, 74,99; H, 4,41; N, 13,12. Determinado: C, 75,24, H, 4,02, N, 13,05.

(2) Método B

Uma mistura de 2-2'-bi-indolo **1** (100 mg; 0,43 mmol) e de *cis*-β-cianoacrilato de etilo (50 mg; 0,4 mmol) em cloreto de metileno (10 ml) foram adicionados 25 ml de SnCl₄. A mistura foi agitada a t.a. durante 30 min. A suspensão foi arrefecida num banho



com gelo, o sólido recolhido, lavado com éter frio e foi seco para originar 36 mg (27%) de produto. A purificação por cromatografia em coluna (EtOAc:hexanos; 2:1) originou um sólido castanho-bronze, p.f. >320°C, EM (ES⁺) 311 (M⁺). ¹H RMN (DMSO - d₆) δ 4,00 (s, 2H), 7,17-7,22 (m, 2H), 7,37-7,42 (m, 2H), 7,67 (d, 2H), 8,03 (d, 1H), 8,58 (d, 1H), 10,87 (s, 1H), 10,92 (s, 1H), 11,18 (s, 1H).

Este composto apresentou características espectrais e analíticas idênticas ao do preparado pelo método A.

D. Exemplo IV : 5H,7H,12H,13H-indeno[2,3-a]pirrolo[2,3-c]carbazolo-6(6H)ona
(X = CH₂; R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H)

(1) Método A

Uma mistura de 2-(2-indenil)indolo 4 (300 mg; 1,3 mmol) e maleimida (160 mg; 1,6 mmol) em ácido trifluoroacético foi aquecida a 160°C durante 18 h, num frasco de reação selado. A solução foi evaporada e o sólido dissolvido em acetato de etilo, depois lavado com água e seco (MgSO₄) para originar produto sólido castanho. O produto em bruto foi submetido a cromatografia (sílica-gel, EtOAc:hexanos; 1:1) para originar um produto que foi tratado com THF e filtrado. O resíduo concentrado foi triturado com MeOH para originar o produto: p.f. 275-280°C, EM (ES⁺) 310 (M⁺), ¹H RMN (DMSO - d₆) δ 4,00 (s, 2H), 4,13 (s, 2H), 7,17 (t, 1H), 7,25-7,42 (m, 3H), 7,50 (d, 1H), 7,71 (d, 1H), 8,00 (d, 1H), 8,37 (d, 1H), 10,75 (s, 1H), 11,33 (s, 1H). IV (KBr) 1650-1700 cm⁻¹. Anal. calc. para C₂₁H₁₄N₂O.0,7H₂O: C, 78,10; H, 4,81; N, 8,65. Determinado: C, 78,13; H, 4,41; N, 8,10.

(2) Método B

Uma mistura de 2-(2-indenil)indolo 4 (75 mg; 0,32 mmol) e *cis*-β-cianoacrilato de etilo (81 mg; 0,64 mmol) em ácido trifluoroacético (1 ml) foi aquecida a 120°C durante 1 h, num frasco de reação selado, seguindo-se 4 h a 160°C. A mistura foi evaporada a pressão reduzida e o resíduo foi triturado com éter. O sólido resultante foi submetido a cromatografia (sílica-gel; EtOAc:hexanos; 1:1) para originar 12 mg (12%) de produto sólido acastanhado; p.f. 275-280°C, EM (ES⁺) 310 (M⁺). Este composto apresentou dados espectrais idênticos aos do preparado no Método A.

E. Exemplo V : Intensificação, por Pirrolo[2,3-c]carbazolo-6-onas condensadas, da indução por IFN-γ do antígeno HLA-DR do MHC II



Foi utilizada uma linha celular humana derivada de monócitos humanos, THP-1 (ATCC TIB 202) que responde a IFN- γ , para evidenciar o aumento de HLA-DR pelas pirrolo[2,3-c]carbazolo-6-onas.

As células THP-1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo mercapto-etanol 20 μ M e 10% de soro de bovino fetal, a 37°C, numa atmosfera de 5% CO₂:95% de ar, com 100% de humidade. Para a determinação do aumento de HLA-DR pelos compostos do invento, as células foram deixadas sem tratamento como controlos, ou foram tratadas com IFN- γ apenas a 100 unidades/ml ou foram tratadas com compostos do invento numa concentração final de 1 μ M, durante 30 min., antes da adição de IFN- γ a 100 unidades/ml. Foram utilizadas culturas em duplicado em todas as experiências. As células THP-1 tratadas foram incubadas a 37°C durante 48 horas e depois preparadas para análise de HLA-DR por citometria de Fluxo. A indução de HLA-DR foi realizada por procedimentos comuns tal como descrito em *"Interferons and Other Regulatory Cytokines"*, Edward De Maeyer and Jacqueline De Maeyer Guignard, Capítulo 9, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1988. As células foram preparadas para a citometria de fluxo e foram analisadas quanto a HLA-DR por citometria de fluxo, tal como indicado em *"Current Protocols in Immunology"*, Vol. 1, páginas 5.0.1-5.8.8, John Wiley & Sons, 1994. Foi recolhido um milhão de células de cada tratamento por centrifugação e foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS). As células foram ressuspensas em 100 μ l de PBS contendo 10 μ g de IGG de coelho purificada, para o bloqueio dos locais não específicos na superfície celular. Após 20 min. em gelo, foram adicionados 20 μ l de anticorpo monoclonal anti-HLA-DR marcado com a etiqueta fluorescente FITC e as células deixadas no gelo durante 30 min. adicionais para permitir a ligação do anticorpo a HLA-DR. As células foram então lavadas 2 vezes com PBS em cada lavagem e foram fixadas em 0,5 ml de paraformaldeído a 5%. As células fixas foram armazenadas a 4°C até serem analisadas por citometria de fluxo.

O aumento em HLA-DR através de pirrolo[2,3-c]-carbazolo-6-onas condensadas representativas é indicado na FIG. 1. O aumento em HLA-DR por IFN- γ sozinho é designado por 100% no eixo dos Y. Não existe indução de HLA-DR significativa pelos compostos representativos sozinhos a 1 μ M (FIG. 1). Todos os compostos representativos intensificam a indução de HLA-DR por IFN- γ acima da indução por IFN- γ sozinho, *i.e.* acima de 100%. O aumento percentual acima do IFN- γ sozinho pelos quatro compostos é indicado na Tabela 1. Por exemplo, a 2 μ M, o composto da Secção V (D) (exemplo IV) intensificou a indução por IFN- γ de HLA-DR em 60% relativamente ao IFN- γ sozinho.



Tabela 1

Composto do Exemplo #	Conc. de Pirrolo-[2,3-c]-6-ona condensada. μ M	Conc. de IFN- γ Unidades/ml	Aumento Percentual em HLA-DR
I	-	-	0
I	-	100*	100
I	1	100	115
I	2	100	108
II	-	-	0
II	-	100*	100
II	1	100	133
II	2	100	153
III	-	-	0
III	-	100*	100
III	1	100	135
III	2	100	130
IV	-	-	0
IV	-	100*	100
IV	1	100	156
IV	2	100	160

* IFN- γ sozinho é definido como 100%.

F. Exemplo VI : Potenciação por NT-3 da Actividade de ChAT em Culturas de Prosencéfalo Basal por Pirrolo[2,3--c]carbazolo 6-onas

A capacidade das pirrolo[2,3-c]carbazolo-6-onas para potenciar a actividade de NT-3 em culturas do prosencéfalo basal foi determinada usando a actividade de colina-acetiltransferase (ChAT) como uma medida da função ou da sobrevivência de neurónio colinérgico. Os compostos sozinhos não tiveram quaisquer efeitos na actividade de ChAT. Contudo, na presença de NT-3, os compostos representativos originaram uma potenciação da actividade ChAT dependente da dose a níveis superiores aos dos conseguidos por NT-3 sozinha. Os resultados, apresentados na Tabela 2, são o resultado de uma aplicação de NT-3 única e do composto a ser testado no dia do início da cultura, indicando um efeito

prolongado sobre a sobrevivência ou função dos neurónios colinérgicos do prosencéfalo basal. Os métodos empregues estão descritos na patente U.S. 5,468,872, colunas 18 e 19.

Tabela 2

Compostos do Exemplo #	% Basal (média $\pm$ DP)		% NT-3 (média $\pm$ DP)	
	100 nM	300 nM	100 nM	300 nM
NT-3 + I	184 $\pm$ 3	221 $\pm$ 2	113 $\pm$ 2	136 $\pm$ 1*
NT-3 + II	212 $\pm$ 4	228 $\pm$ 13	130 $\pm$ 2*	140 $\pm$ 1*
NT 3 + III	180 $\pm$ 3	203 $\pm$ 2	114 $\pm$ 2	129 $\pm$ 1*

A NT-3 (100 ng/ml) aumentou a actividade de ChAT 163 $\pm$ 5% (média $\pm$ DP) relativamente ao controlo de culturas não tratadas. Os compostos de teste sozinhos tinham um nível de actividade basal (100%).

*p < 0,05, estatisticamente significativo quando comparados com a actividade de NT-3 sozinha, por estatística t de Dunnett.

Lisboa, 29. SET. 2000

Por CEPHALON, INC.

- O AGENTE OFICIAL -
O ADJUNTO

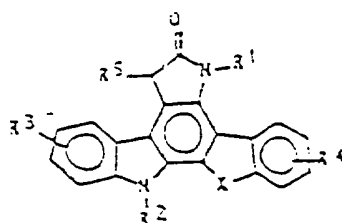


ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA



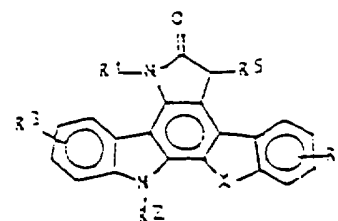
REIVINDICAÇÕES

1 - Pirrolo[2,3-c]carbazolo-6-ona condensada, representada por uma fórmula seleccionada de entre o grupo consistindo em:



I

e



II

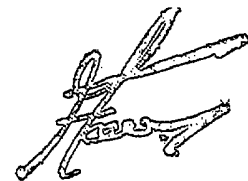
na qual:

- a) R^1 é seleccionado de entre o grupo consistindo em H, alquilo com 1-4 carbonos, grupos aromáticos monocíclicos e policíclicos, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo; $C(=O)R^9$, em que R^9 é alquilo com 1-4 carbonos ou um grupo aromático monocíclico ou policíclico; $(CH_2)_nOR^9$, em que n é um inteiro com 1-4; OR^{10} , em que R^{10} é H ou alquilo com 1-4 carbonos; $(CH_2)_nOR^{14}$, em que R^{14} é o resíduo de um aminoácido depois de o grupo hidroxilo do grupo carboxilo ter sido removido; OR^{14} , NR^7R^8 ; $(CH_2)_nNR^7R^8$, $O(CH_2)_nNR^7R^8$; e ou

(1) R^7 e R^8 são independentemente H ou alquilo com 1-4 carbonos; ou

(2) R^7 e R^8 são, combinados conjuntamente para formarem um grupo de ligação de fórmula geral $-(CH_2)_2-X^1-(CH_2)_2-$, em que X^1 é O, S ou CH_2 ;

- b) R^2 é seleccionado de entre o grupo consistindo em H, SO_2R^9 , CO_2R^9 , $C(=O)R^9$, alquilo com 1-8 carbonos, alcenilo com até 8 carbonos, alcinilo com até 8 carbonos e um monossacárido com 5-7 carbonos, em que cada grupo hidroxilo do referido monossacárido é seleccionado independentemente de entre o grupo consistindo em hidroxilo não substituído e uma porção de substituição que substitui o referido grupo hidroxilo, seleccionada de entre o grupo consistindo em H, alquilo com 1-4 carbonos, alquilcarboniloxi de 2-5 carbonos e alcoxi com 1-4 carbonos; em que ou



1) cada alquilo com 1-8 carbonos, alcenilo com até 8 carbonos ou alcinilo com até 8 carbonos está não substituído; ou

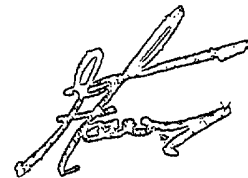
2) cada alquilo com 1-8 carbonos, alcenilo com até 8 carbonos ou alcinilo com até 8 carbonos, é independentemente substituído com 1-3 grupos seleccionados de entre o grupo consistindo em grupos aromáticos monocíclicos e policíclicos com 6-10 carbonos, heteroarilo, F, Cl, Br, I, CN, NO₂, OH, OR⁹, O(CH₂)_nNR⁷R⁸, OCOR⁹, OCONHR⁹, O-tetra-hidropiraniolo, NH₂, NR⁷R⁸, NR¹⁰COR⁹; NR¹⁰CO₂R⁹, NR¹⁰CONR⁷R⁸, NHC(=NH)NH₂, NR¹⁰SO₂R⁹; S(O)_yR¹¹, em que R¹¹ é H, alquilo com 1-4 carbonos, um grupo aromático monocíclico ou policíclico com 6-10 carbonos ou heteroarilo e y é 1 ou 2; SR¹¹, CO₂R⁹, CONR⁷R⁸, CHO, COR⁹, CH₂OR⁷, CH₂OR⁹, CH=NNR¹¹R¹², CH=NOR¹¹, CH=NR⁹, CH=NNHCH(N=NH)NH₂, SO₂NR¹²R¹³, em que ou

(1a) R¹² e R¹³ são, independentemente, H, alquilo com 1-4 carbonos, um grupo aromático monocíclico ou policíclico com 6-10 carbonos ou heteroarilo; ou

(2a) R¹² e R¹³ estão combinados conjuntamente para formarem um grupo de ligação -(CH₂)₂-X¹-(CH₂)₂;

PO(OR¹¹)₂, NHR¹⁴, NR¹⁰R¹⁴, OR¹⁴ é um monossacárido com 5-7 carbonos em que cada grupo hidroxilo do referido monossacárido é, seleccionado independentemente de entre o grupo consistindo em hidroxilo não substituído e uma porção de substituição que substitui o referido grupo hidroxilo seleccionado de entre o grupo consistindo em H, alquilo com 1-4 carbonos, alquilcarboniloxi com 2-5 carbonos e alcoxi com 1-4 carbonos;

c) cada R³ e R⁴ é seleccionado independentemente de entre o grupo consistindo em H, grupos aromáticos monocíclicos ou policíclicos com 6-10 carbonos, heteroarilo, F, Cl, Br, I, CN, CF₃, NO₂, OH, OR⁹, O(CH₂)_nNR⁷R⁸, OCOR⁹, OCONHR⁹, NH₂, (CH₂)_nOR⁹, (CH₂)_nOR¹⁰, (CH₂)_nOR¹⁴, OR¹⁴, NHR¹⁴, NR⁷R⁸, NR⁷(CH₂)_nNR⁷R⁸, NR¹⁰COR⁹, NR¹⁰CONR⁷R⁸, SR¹¹, S(O)_yR¹¹, CO₂R⁹, COR⁹, CONR⁷R⁸, CHO, CH=NOR¹¹, CH=NR⁹, CH=NNR¹¹R¹², (CH₂)_nSR⁹, (CH₂)_nS(O)_yR⁹; CH₂SR¹⁵, em que R¹⁵ é alquilo com 1-4 carbonos; CH₂S(O)_yR¹⁴, (CH₂)_nNR⁷R⁸, (CH₂)_nNHR¹⁴, alquilo com 1-8 carbonos, alcenilo com até 8 carbonos e alcinilo com até 8 carbonos; e ou



1) cada alquilo com 1-8 carbonos, alcenilo com até 8 carbonos ou alcinilo com até 8 carbonos está não substituído; ou

2) cada alquilo com 1-8 carbonos, alcenilo com até 8 carbonos ou alcinilo com até 8 carbonos está, independentemente, substituído tal como descrito anteriormente em b)2);

d) R^5 é seleccionado de entre o grupo consistindo em hidrogénio, alquilo com 1-8 carbonos, alcenilo com até 8 carbonos e alcinilo com até 8 carbonos; e ou

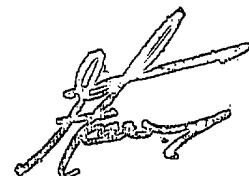
1) cada grupo alquilo, alcenilo, ou alcinilo não está substituído; ou

2) cada grupo alquilo, alcenilo, ou alcinilo está substituído por 1-3 grupos seleccionados de entre o grupo consistindo em F, Cl, Br, I, CN, CF_3 , NO_2 , OH, OR^9 , $O(CH_2)_nNR^7R^8$, $OCOR^9$, $CONHR^9$, NH_2 , $(CH_2)_nOR^9$, $(CH_2)_nOR^{14}$, NR^7R^8 , $NR^7(CH_2)_nNR^7R^8$, $NR^{10}COR^9$, $NR^{10}CONR^7R^8$, SR^{11} , $S(O)_yR^{11}$, CO_2R^9 , COR^9 , $CONR^7R^8$, CHO, $CH=NOR^{11}$, $CH=NR^9$, $CH=NNR^{11}R^{12}$, $(CH_2)_nSR^9$, $(CH_2)_nS(O)_yR^9$, CH_2SR^{15} , $CH_2S(O)_yR^{14}$, $(CH_2)_nNR^7R^8$, e $(CH_2)_nNHR^{14}$;

e) X é seleccionado de entre o grupo consistindo em -N-, -O-, -S-, $-S(=O)-$, $-S(=O)_2-$, alquilenos com 1-3 carbonos, $-C(=O)-$, $-C(R^2)=C(R^2)-$, $-(C(R^2))_2-$, $-CH=CH-$, $-CH(OH)-$, $CH(OH)-$, $-C(=NOR^{11})-$, $-C(OR^{11})(R^{11})-$, $-C(=O)CH(R^{15})-$, $-CH(R^{15})C(=O)-$, $-CH_2-Z-$, $-Z-CH_2-$, $-CH_2ZCH_2-$, em que Z é seleccionado de entre o grupo consistindo em $-C(OR^{11})(R^{11})-$, O, S, $C(=O)$ e NR^{11} ; e alquilenos com 1-3 carbonos substituído com um grupo seleccionado de entre o grupo consistindo em um grupo substituinte R^5 , SR^{10} , OR^{10} , OR^{14} , R^{15} , fenilo, naftilo e arilalquilo com 7-14 carbonos.

2 - Composto de acordo com a Reivindicação 1 em que R^9 é seleccionado de entre o grupo consistindo em alquilo com 1-4 carbonos, fenilo e naftilo.

3 - Composto de acordo com a Reivindicação 1 em que R^{11} , R^{12} e R^{13} são cada um, seleccionados independentemente de entre o grupo consistindo em H, alquilo com 1-4 carbonos, fenilo, naftilo e heteroarilo.



4 - Composto de acordo com a Reivindicação 1 em que R^1 é seleccionado de entre o grupo consistindo em H, alquilo com 1-4 carbonos, fenilo substituído, fenilo não substituído, OR^{10} e $O(CH_2)_nNR^7R^8$.

5 - Composto de acordo com a Reivindicação 1 em que R^2 é seleccionado de entre o grupo consistindo em H, $C(=O)R^9$, alquilo com 1-8 carbonos, alquilo com 1-8 carbonos substituído com um grupo seleccionado de entre o grupo de OR^9 , OH, $OCOR^9$, NR^7R^8 , NH_2 , $NR^{10}COR^9$ e $NR^{10}R^{14}$.

6 - Composto de acordo com a Reivindicação 1 em que R^3 e R^4 são cada, seleccionados independentemente de entre o grupo consistindo em H, halogéneo, CN, OH, OR^9 , OR^{14} , NH_2 , NR^7R^8 , $(CH_2)_nOR^{10}$, $(CH_2)_nOR^{14}$, COR^9 , $NR^{10}COR^9$, NHR^{14} e $O(CH_2)_nNR^7R^8$.

7 - Composto de acordo com a Reivindicação 1 em que R^5 é seleccionado de entre o grupo consistindo em H e alquilo com 1-4 carbonos.

8 - Composto de acordo com a Reivindicação 1 em que X é seleccionado de entre o grupo consistindo em -N-, -O-, -S-, alquilenos com 1-3 carbonos, -C=O-, -CH₂-Z- e -Z-CH₂-.

9 - Composto de acordo com a Reivindicação 8 em que X é seleccionado de entre o grupo consistindo em -N-, -O-, -S- e -CH₂-.

10 - Composto de acordo com a Reivindicação 9 em que R^1 , R^2 , R^3 , R^4 e R^5 são cada um H.

11 - Composto de acordo com a Reivindicação 1 representado pela Fórmula I.

12 - Composto de acordo com a Reivindicação 11 em que R^1 é seleccionado de entre o grupo consistindo em H, alquilo com 1-4 carbonos, fenilo substituído, fenilo não substituído, OR^{10} e $O(CH_2)_nNR^7R^8$.

13 - Composto de acordo com a Reivindicação 11 em que R^2 é seleccionado de entre o grupo consistindo em H, $C(=O)R^9$, alquilo com 1-8 carbonos e alquilo com 1-8 carbonos substituído com um grupo seleccionado de entre o grupo consistindo em OR^9 , OH, $OCOR^9$, NR^7R^8 , NH_2 , $NR^{10}COR^9$ e $NR^{10}R^{14}$.

14 - Composto de acordo com a Reivindicação 11 em que R^3 e R^4 são cada um seleccionados independentemente de entre o grupo consistindo em H, halogéneo, CN, OH, OR^9 , OR^{14} , NH_2 , NR^7R^8 , $(CH_2)_nOR^{10}$, $(CH_2)_nOR^{14}$, COR^9 , $NR^{10}COR^9$, NHR^{14} e $O(CH_2)_nNR^7R^8$.

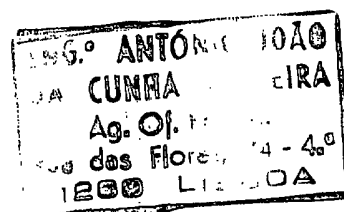
15 - Composto de acordo com a Reivindicação 11 em que R^5 é seleccionado de entre o grupo consistindo em H e alquilo com 1-4 carbonos.

16 - Composto de acordo com a Reivindicação 11 em que X é seleccionado de entre o grupo consistindo em -N-, -O-, -S-, alquilenos com 1-3 carbonos, -C=O-, -CH₂-Z- e -Z-CH₂-.

Lisboa, 29. DEZ. 2000

Por CEPHALON, INC.

- O AGENTE OFICIAL -
IO ADJUNTO



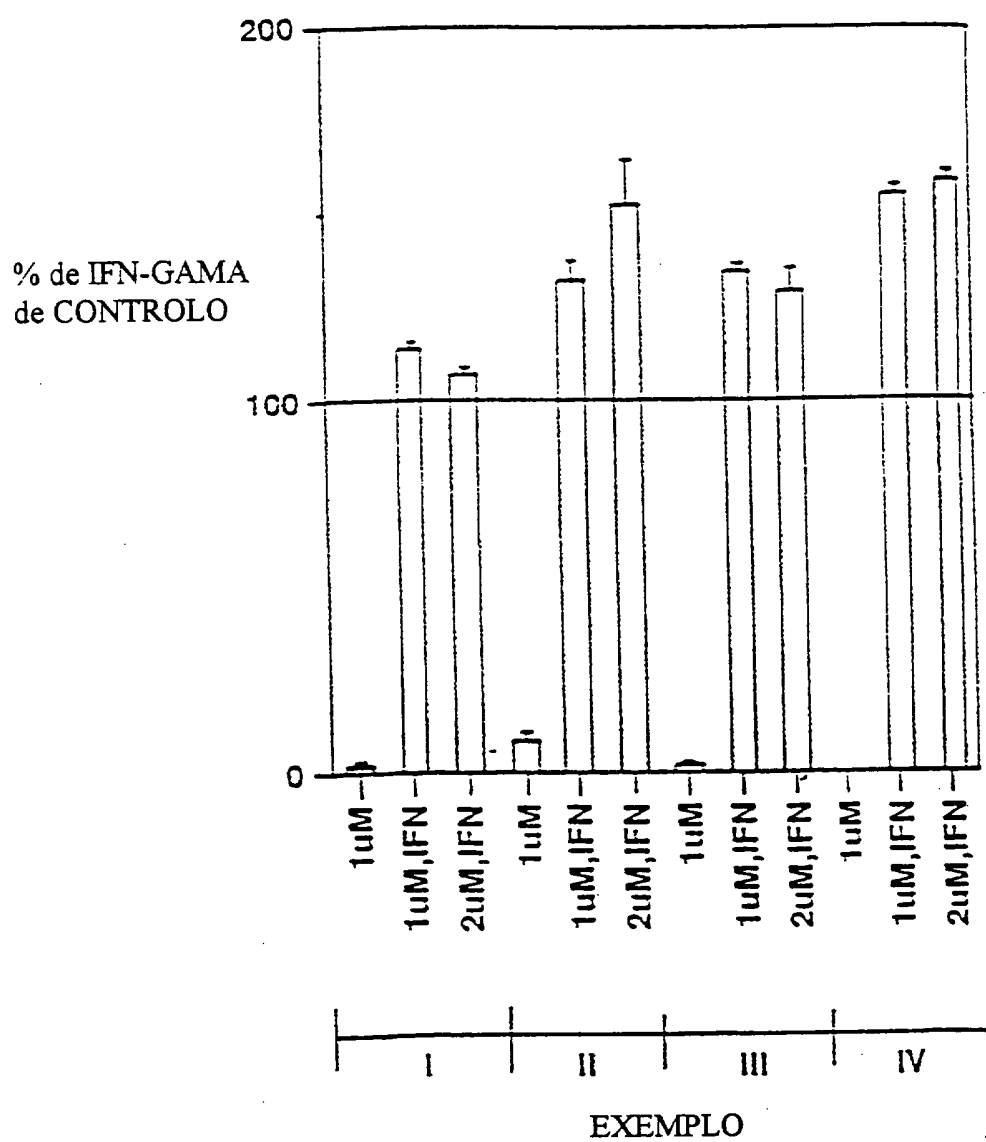
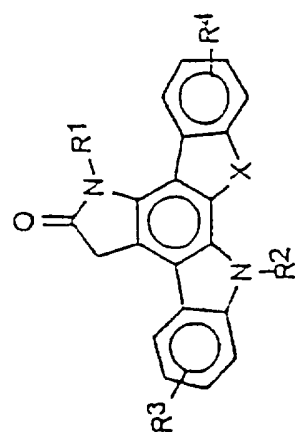
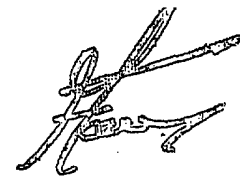
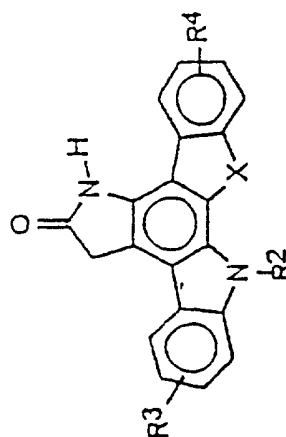


FIG. 1



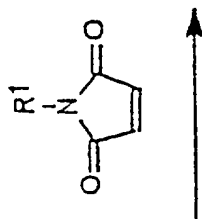
Fórmula I

Ex. I, X = O
 Ex. II, X = S
 Ex. III, X = N
 Ex. IV, X = CH₂

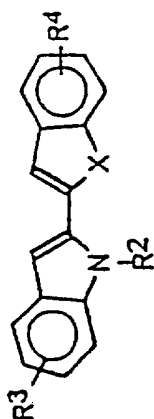


Fórmula I

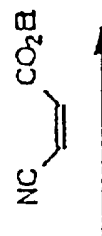
Ex. III, X = N
 Ex. IV, X = CH₂



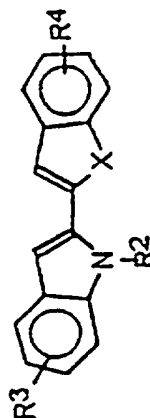
Método A



1-4



Método B



1-4

FIG. 2

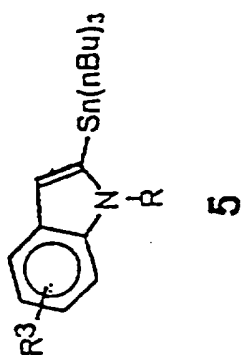
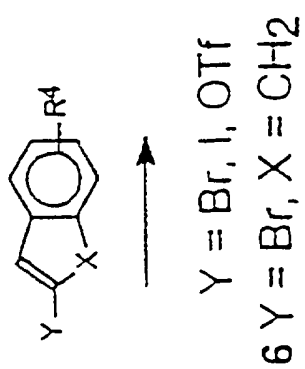
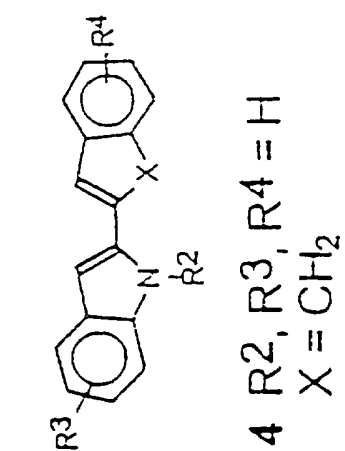


FIG. 3

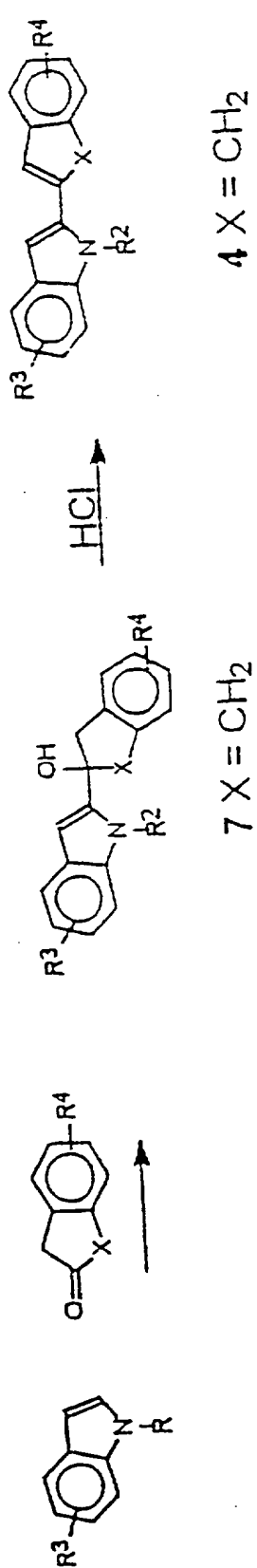
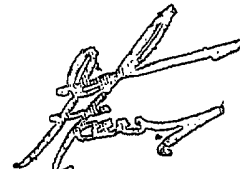


FIG. 4

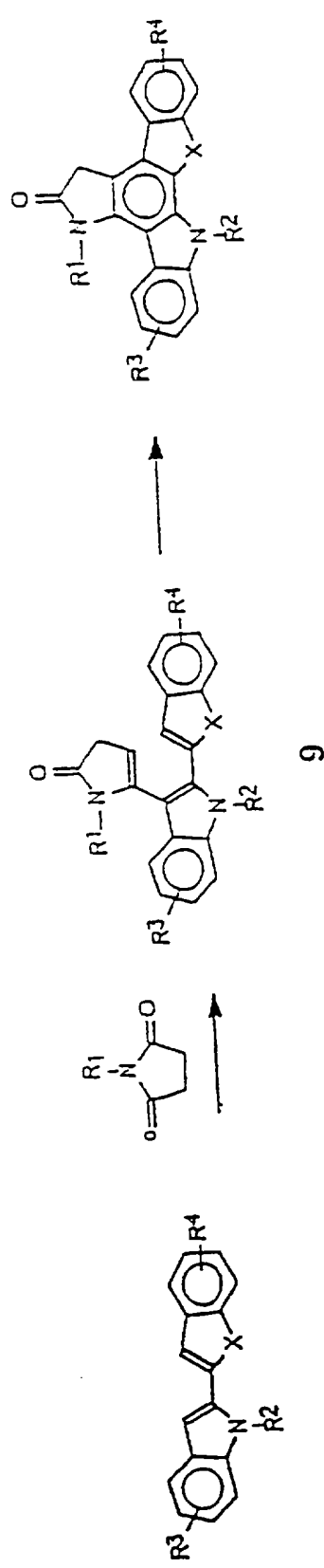


FIG. 5

Fórmula II

9

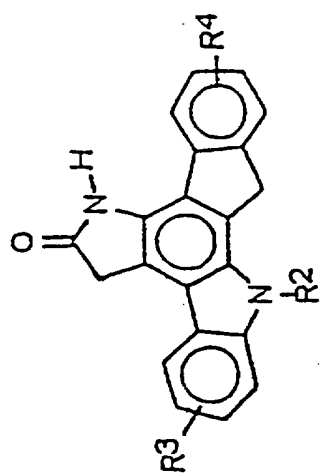
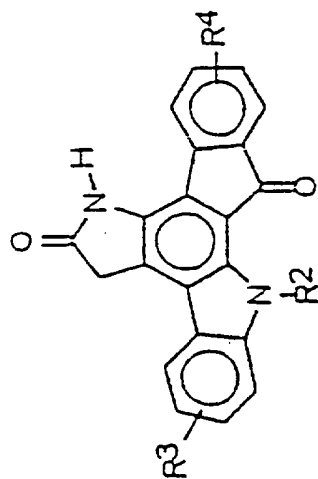
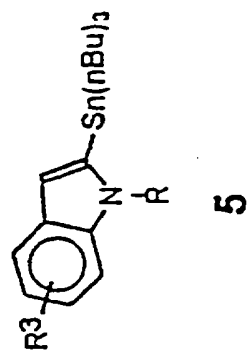


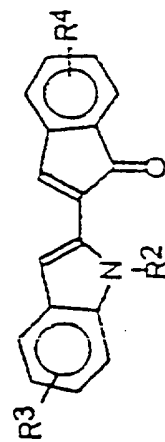
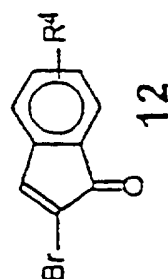
FIG. 6



10



5

11 $\text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4 = \text{H}$ 

12



FIG. 7