



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

(11) (21) **PI 0404851-2 A**



(22) Data de Depósito: 20/10/2004
(43) Data de Publicação: **13/06/2006**
(RPI 1849)

(51) Int. Cl⁷.:
C07D 233/91
A61K 31/4164
A61P 31/00
A61P 33/00

(54) Título: COMPOSTOS ANTIBACTERIANOS E/OU ANTIPROTOZOÁRIOS DERIVADOS DO NITROIMIDAZOL APRESENTANDO ATIVIDADE INIBIDORA DE UREASE, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DESTES COMPOSTOS E USO EM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E MEDICAMENTOS

(57) Resumo: "COMPOSTOS ANTIBACTERIANOS E/OU ANTIPROTOZOÁRIOS DERIVADOS DO NITROIMIDAZOL APRESENTANDO ATIVIDADE INIBIDORA DE UREASE, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DESTES COMPOSTOS E USO EM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E MEDICAMENTOS". No presente pedido são descritos compostos derivados nitroimidazólicos com atividade antibacteriana e/ou antiprotozoária, os quais são potentes inibidores da urease. São também descritos o processo de obtenção destes compostos, e o uso destes em composições farmacêuticas e medicamentos.

(66) Dados da Prioridade Interna: PI0304761-0 28/10/2003

(71) Depositante(s): EMS S. A. (BR/SP)

(72) Inventor(es): Antônio Távora de Albuquerque Silva, Andressa Munhoz, Jean Leandro dos Santos, Rodolfo Gonzalez Camargo, Lúcia Fioravanti de Castro, Renato Farina Menegon, Wagner Vilegas, Antonio Gilberto Ferreira, Eliana Aparecida Varanda, Man Chin Chung

(74) Procurador: LLC - Info Connection Ltda

COMPOSTOS ANTIBACTERIANOS E/OU ANTIPROTOZOÁRIOS DERIVADOS DO NITROIMIDAZOL APRESENTANDO ATIVIDADE INIBIDORA DE UREASE, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DESTES COMPOSTOS E USO EM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E MEDICAMENTOS.

5 No presente pedido são descritos compostos derivados nitroimidazólicos com atividade antibacteriana e/ou antiprotozoária, os quais são potentes inibidores da urease. São também descritos o processo de obtenção destes compostos, e o uso destes em composições farmacêuticas e medicamentos.

10 Durante os últimos 25 anos, um alarmante número de cepas bacterianas têm desenvolvido resistência a diversos agentes antimicrobianos. Patologias, tais como a faringite e a laringite, que seriam de fácil controle e cura com reduzidas doses de agentes antimicrobianos, atualmente, são de difícil
15 tratamento. O grande problema reside na determinação dos microorganismos que são resistentes aos agentes antimicrobianos, pois os ditos microorganismos podem sofrer mutação de forma espontânea contra qualquer agente em seu meio uma vez a cada 10^5 a 10^{10} divisões celulares. Assim, em
20 face desta alta taxa de multiplicação, o mutante pode se multiplicar rapidamente na presença do agente antimicrobiano produzindo uma nova população de microorganismos resistentes.

São diversos os fatores que levam à resistência aos antimicrobianos, como por exemplo, o uso dos mesmos de forma
25 incorreta e indiscriminada em resfriados e gripes; o uso dos mesmos por pacientes com dificuldades de seguir o tratamento prescrito e pela automedicação; o uso dos mesmos para profilaxias após cirurgias em pacientes imunodeprimidos e em tratamentos longos contra acne; e, pela disseminação de
30 bactérias resistentes através de regiões geográficas distintas. O problema da resistência bacteriana se agrava nos

países em desenvolvimento, pois alguns desses países permitem a venda de antimicrobianos potentes no balcão da farmácia, o que facilita o desenvolvimento desta resistência.

Atualmente, um dos grandes desafios da pesquisa biológica é evitar que o tratamento das doenças infecciosas seja ameaçado pela incrível capacidade das bactérias de desenvolver resistência a cada novo antimicrobiano produzido.

O campo de atuação da pesquisa da presente invenção tem por base os compostos derivados de nitroimidazol, os quais pertencem à classe dos imidazóis.

Os nitroimidazóis são substâncias caracterizadas pela presença de um núcleo cíclico pentagonal contendo dois átomos de nitrogênio e pela presença de um grupo nitro (NO₂) substituinte. O isolamento do 2-nitroimidazol, também denominado azomicina, de um estreptomiceto e a demonstração de sua propriedade tricomonocida estimulou a síntese do referido composto e a pesquisa das atividades biológicas de outros compostos nitroimidazólicos, como por exemplo, do 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etanol também conhecido como metronidazol.

O metronidazol é um antimicrobiano nitroimidazólico de amplo espectro e foi o primeiro derivado de imidazol introduzido na terapêutica humana. O metronidazol possui uma ótima atividade clínica contra uma variedade de agentes patogênicos anaeróbicos e microaeróbicos onde se incluem as bactérias Gram-positiva e Gram-negativa sendo classificado como um agente antiprotozoário e antibacteriano.

O metronidazol é um composto ativo no combate a protozoários (*Balantidium coli*, *Blastocystis hominis*, *Chilomastix mesnili*, *Dracunculus medinensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*), Bactérias Gram negativas (*Acidaminococcus* spp, *Bacteroides*

fragilis, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides ovatus*,
Bacteroides thetaiotaomicron, *Bacteroides vulgatus*,
Fusobacterium varium, *Fusobacterium* spp., *Megasphaera*,
Veillonella parvula, e *Veillonella* spp), Bactérias Gram
5 positivas (*Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*,
Clostridium ramosum, *Clostridium* spp., *Eubacterium* spp.,
Peptococcus spp. e *Peptostreptococcus* spp), Bactérias
anaeróbias facultativas (*Gardnerella vaginalis* e *Helicobacter*
pylori), *Campylobacter* spp e *Mycobacterium tuberculosis*).

10 A atividade tricomonocida do metronidazol foi observada
após a administração oral do composto em pacientes com
tricomoníase e a partir do alto percentual de cura obtido.
Testes em pacientes portadores de estomatite de Vincent
também ficaram curados através da atividade medicamentosa do
15 metronidazol.

Entretanto, a pesquisa biológica tem evidenciado a
atividade mutagênica do metronidazol e de outros imidazóis
para bactérias e sistemas eucariontes primitivos. Esta
atividade foi verificada em testes em *Salmonella*
20 *typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* e *Citrobacter*
freundii.

A ciência ensina que mutação é toda alteração do
material genético de uma célula que não resulta de segregação
ou recombinação. A mutação, quando não é letal à própria
25 célula, pode propagar-se pelo corpo em crescimento (mutação
somática) ou transferir-se às gerações (mutação germinal) e
pode ser espontânea ou induzida por agentes físicos, químicos
ou biológicos. Sabe-se que quando a mutação incide sobre
células somáticas, esta pode levar a um processo
30 carcinogênico no organismo do paciente. Entretanto, a
pesquisa científica acerca dos efeitos carcinogênicos do
metronidazol ainda apresenta resultados controversos. A

pesquisa mostra que o metronidazol é cancerígeno para roedores, mas no que tange aos testes da sua aplicação em seres humanos a literatura ainda não apresenta resultados conclusivos, o que requer ainda mais experimentos. No caso da

5 mutação ocorrer em células germinativas, ela pode produzir doenças ou malformações nas gerações futuras.

As mutações e neoplasias representam alterações abruptas em uma única célula, que são permanentes e herdadas pelas células-filhas. Assim, testes de mutagenicidade são sempre

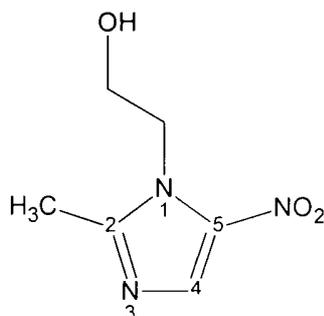
10 recomendados para a pré-seleção de agentes químicos-farmacêuticos.

O grupo nitro (NO_2) encontra-se presente nas moléculas de diversos fármacos, estando ligado diretamente a um anel benzênico ou fazendo parte de anéis heterocíclicos. O

15 grupamento nitro é responsável pela atividade antiparasitária do composto e, conseqüentemente, indispensável na estrutura da molécula. Entretanto a pesquisa científica mostra que a atividade mutagênica do metronidazol e dos outros 5-nitroimidazóis está relacionada com a presença do grupamento

20 nitro (NO_2) e com a substituição em N-1 e/ou N-3 (veja-se a estrutura química do metronidazol mostrada abaixo). Neste último caso, a atividade mutagênica pode ser completamente inibida. O efeito mutagênico do metronidazol é ampliado pela ativação microssomal. A estrutura química do metronidazol é

25 como mostrado a seguir:



Para que este efeito ocorra, é necessária uma redução enzimática do grupo nitro dando origem aos produtos intermediários mutagênicos, entretanto, este processo não é comum em células de mamíferos. Nas células humanas, o metronidazol não induz, *in vitro* ou *in vivo*, a troca entre cromátides irmãs ou a indução de micronúcleos. O efeito clastogênico do metronidazol pode ser verificado através do aumento de aberrações cromossômicas e da indução de micronúcleos em células CHO (Células de Ovário de Hamster) e em linfócitos humanos. A capacidade do metronidazol e de seus metabólicos de produzir quebras no DNA de células humanas também tem sido discutida. Estudos de MENÉNDEZA et.al., **DNA breakage due to metronidazole treatment, Mutation Research, 478, 153-158, 2001**, concluíram que doses terapêuticas de metronidazol produzem dano ao DNA de linfócitos circulantes, as quais parecem ter sido reparadas 15 dias após o fim do tratamento, contudo houve paciente em que tal dano não foi reparado. Entretanto, ainda faltam estudos para determinar se os danos causados pelo metronidazol ao DNA podem provocar a gênese de neoplasmas.

Novos compostos químicos terapêuticos são fabricados através da latenciação do fármaco matriz, particularmente através da esterificação. A latenciação trata-se de um processo de síntese orgânica, o qual procura modificar a molécula de um composto ativo ou fármaco matriz otimizando suas propriedades farmacocinéticas e/ou reduzindo sua toxicidade. Estudos de Guido, R.V.C et. al, demonstram diminuição da atividade mutagênica do fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofural (nitrofurazona), onde a utilização dessa técnica pôde diminuir o efeito mutagênico do composto ativo ou fármaco matriz (Revista Ciência Farmacêutica, V.22, nº 2, 319-333(2001)). No caso da pesquisa citada, o efeito

mutagênico do nitrocomposto foi reduzido em 300 a 400 %, quando comparado ao fármaco matriz.

Nos últimos anos, a latenciação tornou-se uma das principais ferramentas para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o combate às maiores enfermidades da atualidade como o câncer e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - **SIDA**. As razões que justificam a busca por novos fármacos latentes são:

- 1- inconvenientes farmacocinéticos do fármaco matriz;
- 10 2- alta toxicidade do fármaco matriz;
- 3- estabilidade química pobre do fármaco matriz;
- 4- solubilidade inapropriada em água do fármaco matriz;
- 5- odor e paladar inconvenientes do fármaco matriz;
- 15 6- formulação farmacêutica de difícil preparo do fármaco matriz.

As formas latentes de fármacos também podem ser utilizadas sob a forma do que se denomina pró-fármacos, ou seja, um fármaco matriz que é quimicamente transformado em um derivado inativo instável, através de reações químicas, enzimáticas ou ambas; o qual é convertido no fármaco matriz dentro do organismo antes ou após alcançar seu local de ação. O pró-fármaco pode ser definido como qualquer composto que sofre biotransformação antes de exibir seus efeitos farmacológicos. Tanto o pró-fármaco quanto o análogo possuem estruturas químicas similares, mas as propriedades biológicas desses compostos diferem da do fármaco matriz quanto: a atividade, a potência, a biodisponibilidade, síntese, espectro de ação, índice terapêutico. O pró-fármaco se diferencia do fármaco análogo em face da ligação química instável (fraca e reversível) entre o fármaco matriz e o grupamento transportador.

Entre os diversos métodos de preparação de pró-fármacos, a esterificação é o mais empregado, seguido da formação de amidas, imidas e carbamatos. Atualmente grupamentos funcionais de fármacos podem ser modificados por reações químicas produzindo grupos reversíveis muito utilizados no desenvolvimento de pró-fármacos.

Uma grande quantidade de pró-fármacos de ésteres e hemiésteres de metronidazol foram sintetizados a fim de melhorar a hidrossolubilidade para a administração parental, estabilidade química, permeabilidade da membrana celular e redução da suscetibilidade à degradação enzimática.

Conforme citado anteriormente, o metronidazol é uma droga amplamente empregada no tratamento de diversas infecções bacterianas e parasitárias. Dentre os agentes infecciosos sobre os quais ela apresenta atividade encontra-se o *Helicobacter pylori*.

O *Helicobacter pylori* é a causa primária da úlcera péptica sendo um agente etiológico que se encontra envolvido no desenvolvimento do câncer gástrico. Acredita-se que a infecção por *H. pylori* atinja cerca de 50% da população mundial, sendo que cerca de 20% das pessoas infectadas desenvolvem desordens gastroduodenais durante a vida. Este agente etiológico é responsável pela doença da úlcera péptica, gastrite primária, linfoma do tecido linfóide associado à mucosa gástrica e adenocarcinoma gástrico.

De acordo com Houimel M; Mach J; Corthèsy-Theulaz I; Corthèsy B; Fish I. **New inhibitors of Helicobacter pylori urease holoenzyme selected from phage-displayed peptide libraries**. Eur. J. Biochem; 202:774-780, 1998, vários estudos demonstram a correlação entre a síntese da urease pelo *H. pylori* e sua sobrevivência no meio ácido do estômago. A enzima hidrolisa a uréia e libera amônia mantendo o pH

periplasmático em 6,2. Mutantes urease-negativos não são capazes de colonizar a mucosa gástrica das espécies animais testadas.

Atualmente, a terapia para erradicação do *Helicobacter pylori* não é totalmente eficiente e requer uma terapia dupla, tripla e até quádrupla, dificultando a adesão do paciente à terapia e aumentando a probabilidade de efeitos adversos e/ou colaterais e resistência bacteriana. Normalmente a terapia consiste no uso de um, dois ou três antibióticos associados a um inibidor da bomba protônica. Dentre os compostos empregados, por exemplo, os inibidores da bomba protônica, o omeprazol e rabeprazol são os únicos inibidores de urease utilizados na clínica, mas são ineficientes na erradicação desta bactéria, necessitando da adição de pelo menos um agente antimicrobiano à composição medicamentosa.

Na literatura são descritos diversos compostos derivados nitroimidazólicos empregados no tratamento de infecções bacterianas. Entretanto, não foi encontrado nenhum documento descrevendo compostos derivados nitroimidazólicos que atuem também como inibidores de urease.

O desenvolvimento de novos compostos capazes de inibir a urease e que sejam compostos com atividade antimicrobiana e/ou antiprotozoária possibilitaria o tratamento eficaz e simplificado de infecções causadas por diversos agentes patogênicos, em particular no tratamento da *H. pylori*, diminuindo a necessidade de se empregar terapias complexas compreendendo a combinação de diversos agentes terapêuticos. Estas drogas poderão ser ainda mais seguras se forem planejadas e/ou desenvolvidas de forma a apresentarem atividade mutagênica inferior à observada no fármaco matriz (em especial o metronidazol).

É possível encontrar na literatura diversas referências descrevendo derivados nitroimidazólicos planejados e desenvolvidos para melhorar as características dos fármacos predecessores.

- 5 De acordo com Cho & Haynes (CHO, M.J., HAYNES, L.C., **Serum-catalyzed hydrolysis of metronidazole amino acid esters**, *Journal of Pharmaceutical Science*, V. 74, nº 8, 883-885, 1985), a síntese do fosfato de metronidazol provocou um aumento da hidrossolubilidade do metronidazol em 50 vezes.
- 10 Estes pesquisadores também esterificaram o metronidazol com aminoácidos o que possibilitou a melhoria da solubilidade do mesmo para uso parental, com liberação plasmática do metronidazol e de aminoácido.

- 15 A preparação de ésteres duplos idênticos tornou-se uma estratégia comum para o desenvolvimento de novos pró-fármacos, onde duas moléculas do fármaco matriz são ligadas por meio de um composto espaçante. Mahfouz et. al. (MAHFOUZ, N.M., HASSAN, M.A., *Synthesis, chemical and bioavailability in rabbits of metronidazole aminoacid ester prodrugs with enhanced water solubility* *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 841-848 (2001)) sintetizaram uma série de ésteres duplos de metronidazol utilizando diferentes ácidos carboxílicos (adípico, ftálico, glutárico, succínico e sebáico) como agentes espaçantes. O estudo demonstrou que os
- 20 mesmos são mais lipofílicos que o fármaco matriz e suficientemente estáveis em solução glicofisiológica e em pH fisiológico para serem absorvidos de forma integral. Os pró-fármacos foram convertidos a metronidazol com liberação rápida da primeira molécula e hidrólise lenta da outra. O
- 25 estudo *in vivo* (em camundongos e coelhos) desses pró-fármacos administrados por via oral demonstrou que os mesmos são absorvidos na forma não ionizada, com liberação plasmática
- 30

prolongada. Triésteres de metronidazol também foram testados com bons resultados quanto a hidrossolubilidade, a estabilidade química e liberação plasmática do metronidazol. Entretanto, nenhum destes estudos avaliou os compostos quanto a sua atividade mutagênica, só se preocupando com a melhoria da solubilidade e estabilidade do fármaco matriz, sem tentar aumentar a especificidade e a atividade do fármaco matriz.

A literatura científica mostra que compostos não nitroimidazólicos, tais como os derivados do ácido hidroxâmico, ácido acetohidroxâmico, hidroxiuréia, tiouréia, N,N'- dihidroximetiluréia, fluorofamida, omeprazol, acabet sodium e rabeprazol são inibidores de urease testados em infecções, particularmente por *Helicobacter pylori*, de acordo com SHIBATA K; HONGO A; KINOSHITA M. **Ecabet sodium, a locally acting antiulcer drug, inhibits urease activity of Helicobacter pylori.** Eur J Pharmacol; 345(2):193-8, 1998 Mar., KUHLEK TC; FRYKLUND J; BERGMAN NA; WEILITZ J; LEE A; LARSSON H. **Structure-activity relationship of omeprazole and analogues as Helicobacter pylori urease inhibitors.** J Med Chem; 38(25):4906-16, 1995 Dec 8., NAGATA K; TAKAGI E; SATOH H; OKAMURA H; TAMURA T. **Growth inhibition of Ureaplasma urealyticum by the proton pump inhibitor lansoprazole: direct attribution to inhibition by lansoprazole of urease activity and urea-induced ATP synthesis in U. urealyticum.** Antimicrob Agents Chemother; 39(10):2187-92, 1995 Oct., ODAKE S; MORIKAWA T; TSUCHIYA M; IMAMURA L; KOBASHI K. **Inhibition of Helicobacter pylori urease activity by hydroxamic acid derivatives.** Biol Pharm Bull; 17(10):1329-32, 1994 Oct., OHTA T; SHIBATA H; KAWAMORI T; IIMURO M; SUGIMURA T; WAKABAYASHI K. **Marked reduction of Helicobacter pylori-induced gastritis by urease inhibitors, acetohydroxamic acid and fluorofamide, in Mongolian gerbils.** Biochem Biophys Res Commun; 285(3):728-33, 2001 Jul 20., PARK JB; IMAMURA L; KOBASHI K. **Kinetic**

studies of Helicobacter pylori urease inhibition by a novel proton pump inhibitor, rabeprazole. Biol Pharm Bull; 19(2):182-7, 1996 Feb., WOO TW; CHANG MS; CHUNG YK; KIM KB; SOHN SK; KIM SG; CHOI WS. **Inhibitory action of YJA20379, a**
5 new proton pump inhibitor on Helicobacter pylori growth and urease. Arch Pharm Res; 21(1):6-11, 1998 Feb.

A patente US 4.160.827 descreve sais do fosfato de metronidazol solúveis em água, os quais podem ser preparados em formas de dosagens onde o metronidazol não pode ser
10 empregado por ser insolúvel. Os exemplos descrevem a síntese de diversos sais e possíveis formas de dosagem, não descrevendo os efeitos na atividade, seletividade ou toxicidade dos sais propostos.

A patente US 4.456.610 descreve derivados 2-
15 nitromidazólicos para serem usados no tratamento da filariose. Os compostos desenvolvidos apresentaram menor toxicidade do que o composto líder a azomicina, demonstrando que a derivação de compostos conhecidos pode levar ao desenvolvimento de compostos mais seguros para o uso
20 terapêutico.

A patente US 4.482.722 descreve um éster derivado do metronidazol com N,N-dimetilglicina e seus sais de adição. Segundo os autores, estes compostos são solúveis em água e especialmente úteis no preparo de composições farmacêuticas
25 parenterais apropriadas no tratamento de certas infecções anaeróbicas. Este éster hidrolisa rapidamente *in vivo* liberando o metronidazol no organismo. Como o composto é um pró-fármaco do metronidazol, a preocupação quanto ao fator mutagenicidade é relevante, uma vez que o fármaco matriz é
30 regenerado *in vivo*.

A patente US 6.423.707 trata de ésteres de compostos nitroimidazólicos ativos contra *Helicobacter pylori*,

confirmando, assim, a eficácia do processo de latenciação no desenvolvimento de novos compostos (pró-fármacos) com atividade antimicrobiana. A dita patente, entretanto, nem menciona nem sugere a capacidade inibidora de urease dos ditos ésteres, uma vez que o objeto da patente está apenas direcionado a potencializar a atividade microbiana dos compostos ésteres nela descritos.

Das referências citadas observa-se que muitos derivados nitroimidazólicos foram propostos buscando apenas melhorias das propriedades físico-químicas dos compostos matriz, e em um caso específico, levou a obtenção de um composto menos tóxico que o seu antecessor, no caso do derivado da azomicina empregado para o tratamento da filariose.

Conforme citado anteriormente, o tratamento de infecções diversas com derivados nitroimidazólicos menos tóxicos ou mutagênicos e que possuam habilidade de serem drogas multifuncionais, agindo em mais de um alvo no organismo seria de relevância no tratamento de diversas doenças.

Desta forma, a pesquisa desenvolvida pela requerente diz respeito ao desenvolvimento de novos compostos antibacterianos e/ou antiparasitários derivados de nitroimidazóis os quais adicionalmente são ativos na inibição da urease, enzima necessária à adaptação e sobrevivência de diversos microorganismos em organismos hospedeiros.

Consequentemente, é objetivo da presente invenção aperfeiçoar a farmacoterapia contra uma variedade de agentes patogênicos anaeróbicos e microaeróbicos onde se incluem os protozoários, as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e bactérias anaeróbicas facultativas, preferentemente a *Helicobacter pylori*, através do emprego de compostos multifuncionais os quais, além de possuírem atividade

antibacteriana e/ou antiparasitária, são potentes inibidores da enzima urease.

O avanço alcançado na presente invenção possibilita o tratamento de diversas doenças empregando especialmente a
5 monoterapia, onde os compostos da presente invenção podem ser empregados de forma segura por apresentarem reduzida atividade mutagênica, quando comparados ao metronidazol, e por serem inibidores efetivos da urease, sendo particularmente úteis no tratamento de indivíduos infectados
10 pelo *Helicobacter pylori*.

Organismos produtores de urease, tal como o *Helicobacter pylori*, utilizam desta enzima para sua defesa e sobrevivência. Estes organismos promovem a conversão da uréia em amônia, a qual neutraliza o ácido clorídrico da mucosa
15 gástrica e provoca um aumento no processo inflamatório, com possível progressão ao carcinoma.

De acordo com a presente invenção, os compostos descritos atuam sobre o microorganismo invasor, particularmente o *H. pylori*, de forma seletiva e específica.
20 Devido à baixa toxicidade e/ou mutagenicidade destes compostos quando comparados particularmente ao metronidazol, a dose terapêutica a ser empregada é mais segura, não havendo a necessidade de se empregar doses terapêuticas próximas ao limiar tóxico destes compostos.

A seletividade dos compostos da presente invenção, se dá pela presença de grupos com afinidade à urease acoplados à estrutura destes compostos, os quais direcionam o composto para o alvo (microorganismos produtores de urease), promovendo no local de ação, atividade antimicrobiana pela
25 presença de grupos nitroimidazólicos, além da inibição da própria urease, o que possibilita a reversão do pH do meio a um pH ácido, o qual é inviável à sobrevivência do agente
30

patogênico. A seletividade também se dá através da potencialização da ação antimicrobiana, quando se utiliza um inibidor de urease. A seletividade de ação também promove diminuição da toxicidade, uma vez que o composto em questão

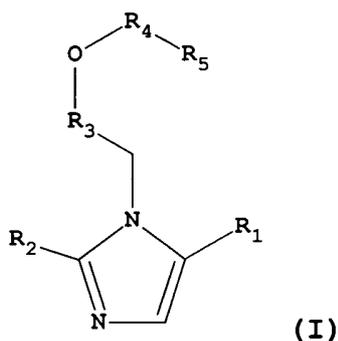
5 terá ação preferencial em microorganismos produtoras de urease, o que não é o caso das células da mucosa intestinal humana. Desta forma, os compostos desenvolvidos na presente invenção apresentam maior seletividade por agirem como

10 medicamentos duplos: exibindo um efeito antimicrobiano e inibindo um dos mecanismos de sobrevivência do microorganismo *in vivo*.

Os estudos apresentados na parte experimental como o teste de Ames ou teste utilizando *Salmonella typhimurium* para a caracterização da atividade mutagênica claramente

15 demonstram um aumento da confiabilidade para uso dos compostos da presente invenção em seres humanos quando comparados com o fármaco matriz.

A presente invenção descreve os compostos de fórmula geral (I) e (II) abaixo representados:

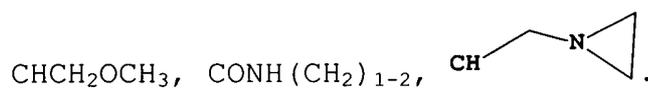


Onde

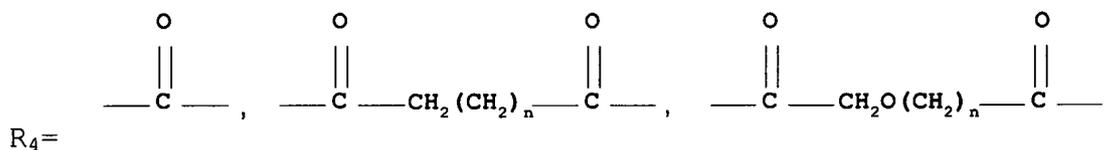
$R_1 = \text{NO}_2$, $R_2 = \text{CH}_3$ e $R_3 = \text{CH}_2$, CHCH_3 , CHCH_2Cl

OU,

25 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NO}_2$ e $R_3 = \text{O}(\text{CH}_2)_4$, $\text{OCH}_2(\text{CH})_2\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{-C}=\text{C-CH}_2$,

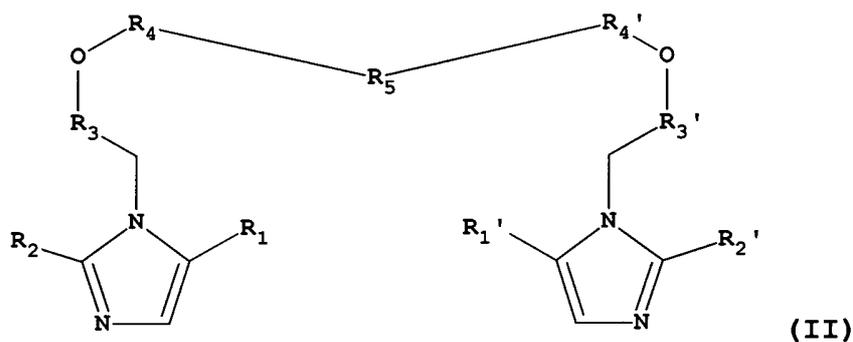


E



CH₂CO, onde n = 1-6

- 5 R₅ = NHCONH₂, NHCONHOH, ONHCONHOH, OCH₂NHCONHCH₂OH,
NHCSNH₂, NHCSNHOH, ONHCSNHOH, OCH₂NHCSNHCH₂OH,
NHCNHNH₂, NHCNHNHOH, ONHCNHNHOH, OCH₂NHCNHNHCH₂OH



10 Onde

R₁ e R₁' = NO₂,

R₂ e R₂' = CH₃ e

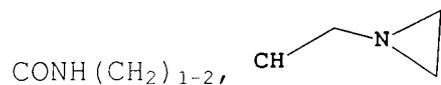
R₃ e R₃' = CH₂, CHCH₃, CHCH₂Cl

OU

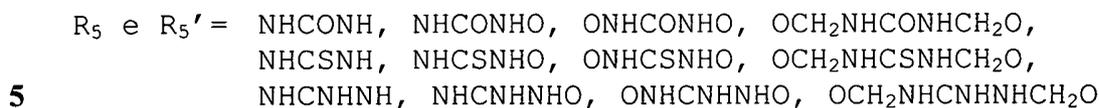
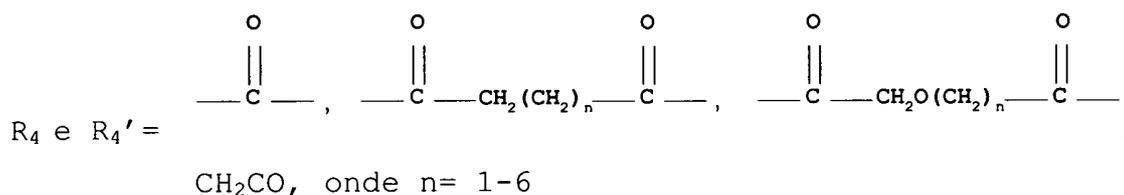
15 R₁ e R₁' = H,

R₂ e R₂' = NO₂ e

R₃ e R₃' = O(CH₂)₄, OCH₂(CH)₂CH₂, OCH₂-C=C-CH₂, CHCH₂OCH₃,



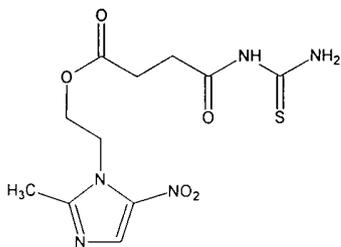
E



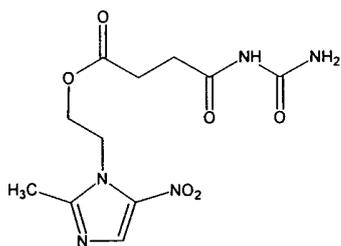
Os compostos inventivos de fórmula geral (I) e (II) são úteis no tratamento de infecções causadas por microorganismos anaeróbicos, microaeróbicos, onde se incluem os protozoários, as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e bactérias anaeróbicas facultativas. Particularmente os compostos de fórmula geral (I) e (II) são úteis no tratamento de infecções causadas por microorganismos produtores de urease, em especial no tratamento de infecções por *Helicobacter pylori*.

A presente invenção também compreende os sais de adição dos compostos de fórmula geral (I) e (II), ou seja, os sais farmacêuticos apropriados dos compostos de fórmula geral (I) e (II), tais como o cloridrato, bromidrato, acetato, propionato, fosfato, sulfato, nitrato, maleato, fumarato, citrato, tartarato, metanosulfonato, besilato, entre outros, assim como também os seus diferentes hidratos.

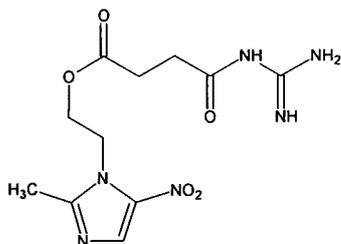
Compostos representativos de fórmula geral (I) e (II) da presente invenção incluem:



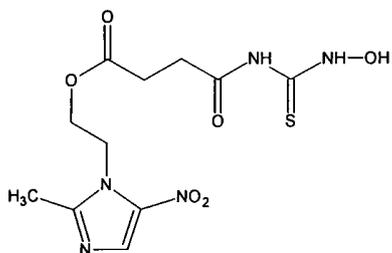
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 4-[(aminocarbonotioil) amino]-4-oxobutanoato;



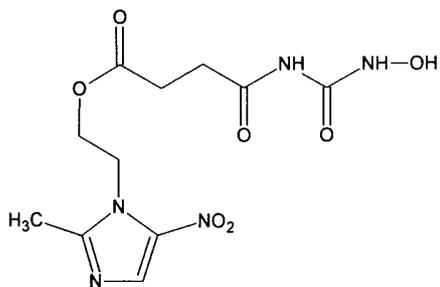
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 4-[(aminocarbonil)amino]-4-oxobutanoato;



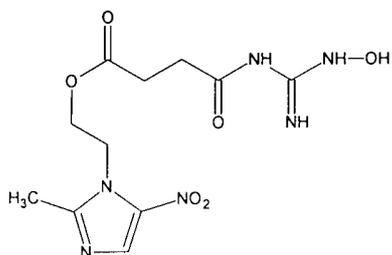
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 4-[[amino(imino)metil] amino]-4-oxobutanoato;



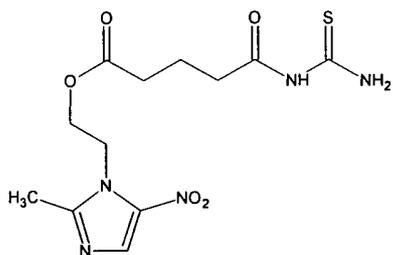
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 4-[[hidroxiamino] carbonotioil] amino}-4-oxobutanoato;



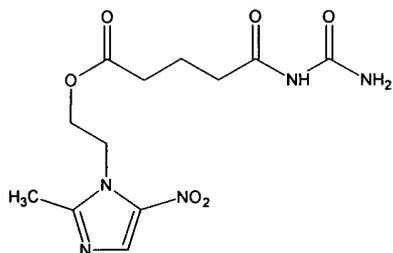
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 4-[[hidroxiamino] carbonil] amino}-4-oxobutanoato;



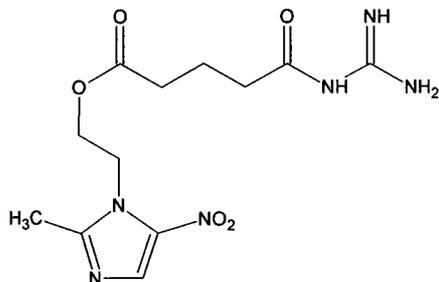
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 4-[[hidroxiamino] (imino) metil] amino}-4-oxobutanoato;



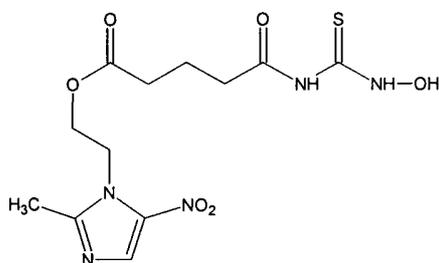
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 5-[(aminocarbonotioil) amino]-5-oxopentanoato;



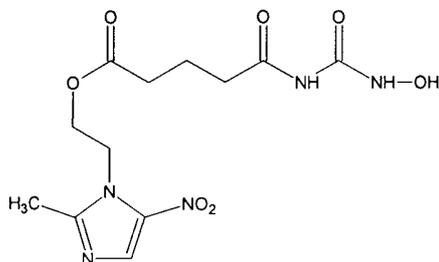
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 5-[(aminocarbonil) amino]-5-oxopentanoato;



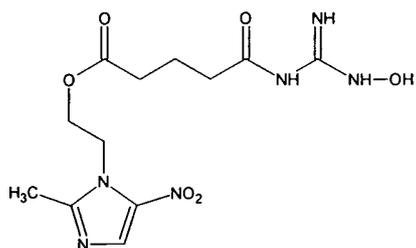
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 5-[[amino(imino)metil] amino]-5-oxopentanoato;



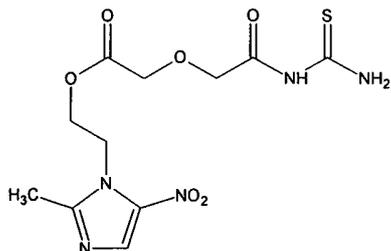
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 5-[[hidroxiamino] carbonotioil] amino]-5-oxopentanoato;



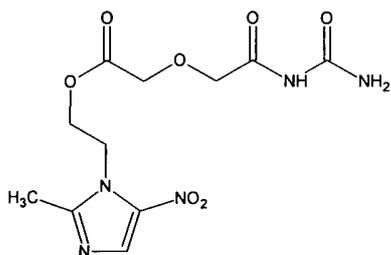
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 5-[[hidroxiamino] carbonil] amino]-5-oxopentanoato;



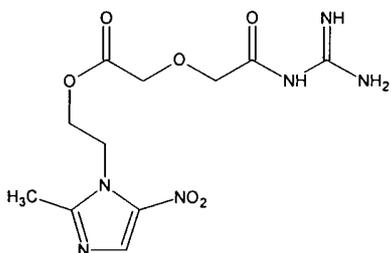
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 5-
 {[(hidroxiamino) (imino)
 metil] amino}-5-
 oxopentanoato;



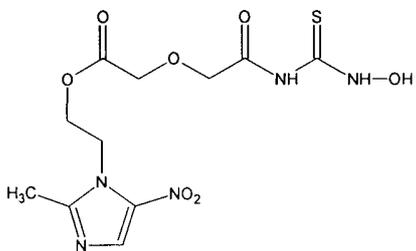
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil {2-
 [(aminocarbonotioil) amino]-
 2-oxoetoxi}acetato;



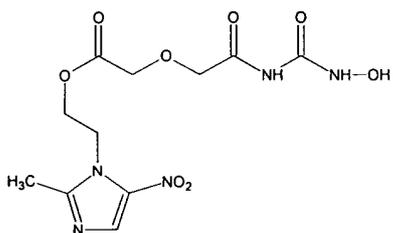
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil {2-
 [(aminocarbonyl) amino]-2-
 oxoetoxi}acetato;



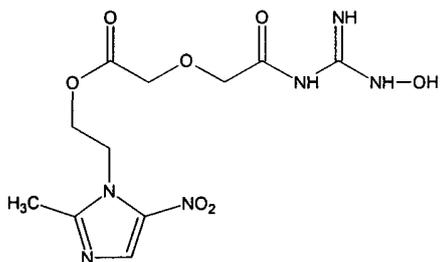
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil (2-
 {[amino(imino)metil] amino}-
 2-oxoetoxi)acetato;



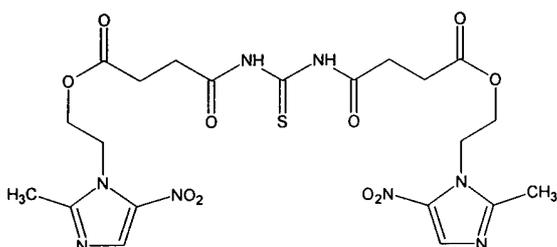
2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil (2-
 {[(hidroxiamino)
 carbonotioil] amino}-2-
 oxoetoxi) acetato;



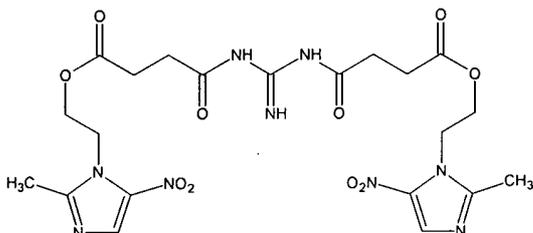
2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil (2-
{[(hidroxiamino)
carbonil]amino}-2-oxoetoxi)
acetato;



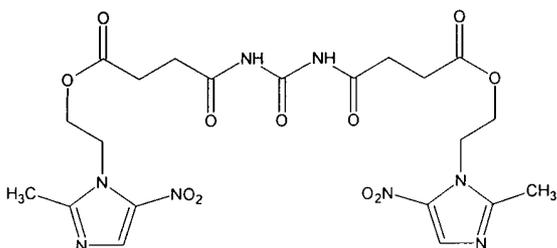
2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil (2-
{[(hidroxiamino)
(imino)metil]amino}-2-
oxoetoxi) acetato;



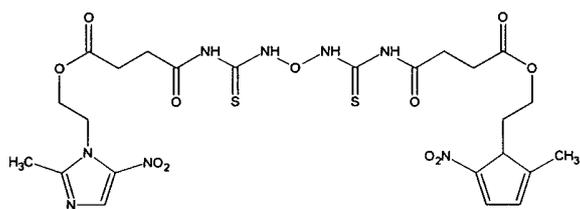
Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 4,4'-
[(tioxometilene)diimino]bis(
4-oxobutanoato);



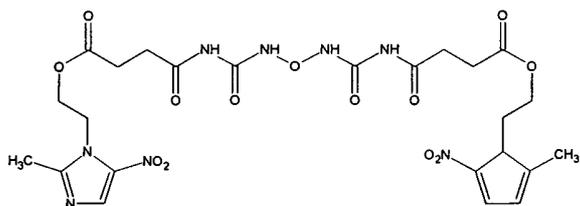
Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 4,4'-
[(iminometilene)diimino]bis(
4-oxobutanoato);



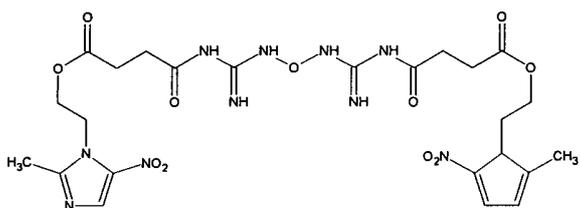
Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 4,4'-
(carbonyldiimino)bis(4-
oxobutanoato);



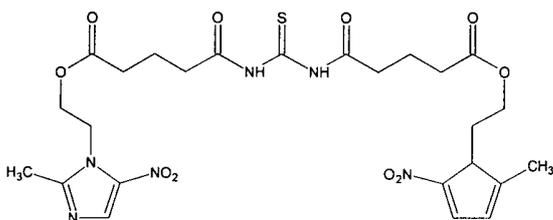
Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 3,6,12-trioxo-8,12-ditioxo-2,10-dioxa-7,9,11,13-tetraazaheptadecan-17-oato;



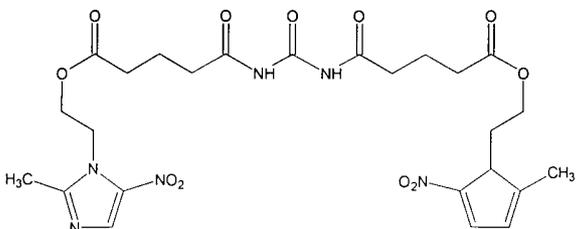
Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 3,6,8,12,14-pentaoxo-2,10-dioxa-7,9,11,13-tetraazaheptadecan-17-oato;



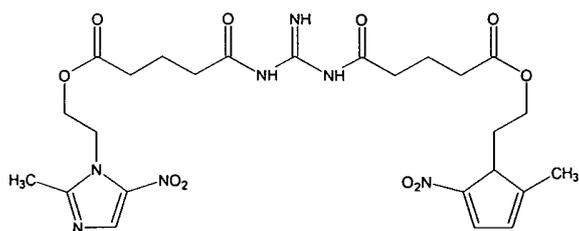
Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 8,12-diimino-3,6,14-trioxo-2,10-dioxa-7,9,11,13-tetraazaheptadecan-17-oato;



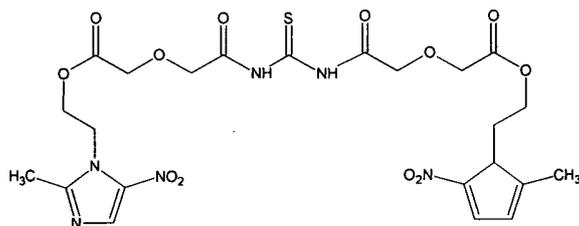
Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 5,5'-(tioxometilene)diimino]bis(5-oxopentanoato);



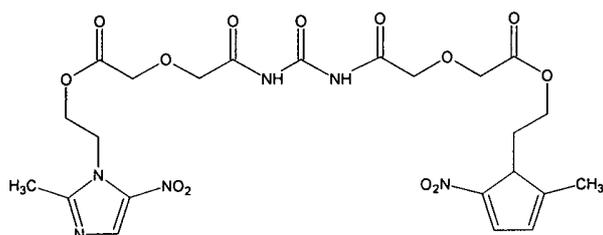
Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 5,5'-(carbonildiimino)bis(5-oxopentanoato);



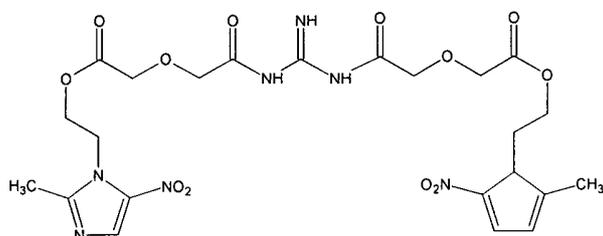
Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 5,5'-[(iminometilene)diimino]bis(5-oxopentanoato);



Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 5,9-dioxo-7-tioxo-3,11-dioxa-6,8-diazatridecane-1,13-dioato;



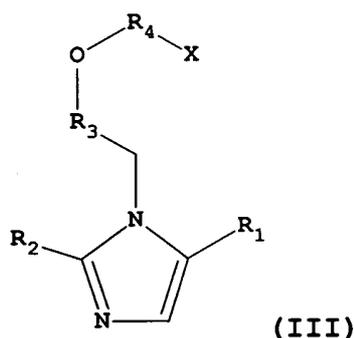
Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 5,7,9-trioxo-3,11-dioxa-6,8-diazatridecane-1,13-dioato;



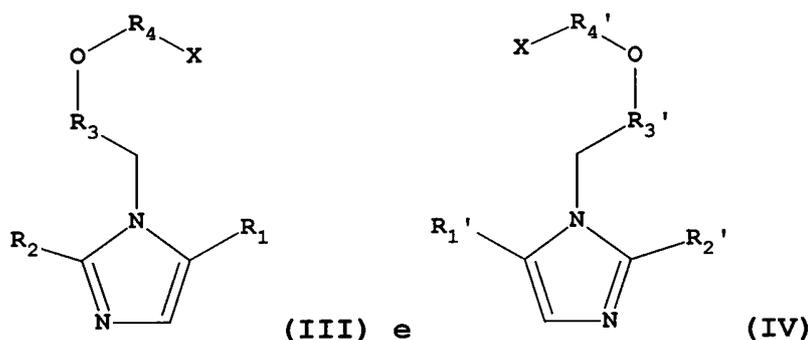
Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 7-imino-5,9-dioxo-3,11-dioxa-6,8-diazatridecane-1,13-dioato;

ou seus sais farmacêuticos apropriados e/ou seus hidratos, entre outros compostos.

O segundo objetivo da presente invenção é o processo de obtenção dos compostos de fórmula geral (I) e (II). De acordo com a presente invenção os compostos de fórmula geral (I) são preparados através da reação de um composto com afinidade a urease com o composto de fórmula geral (III) abaixo:



onde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 são definidos na fórmula geral (I) anteriormente descrita e $X = OH$ ou Cl . Os compostos de fórmula geral (II) são preparados através da reação do composto com afinidade a urease com os compostos de fórmula geral (III) e (IV) abaixo representados:



onde R_1 , R_1' , R_2 , R_2' , R_3 , R_3' , R_4 , R_4' são definidos pela fórmula geral (II) anteriormente descrita e $X = OH$ ou Cl .

- 10 Segundo o processo de preparação dos compostos de fórmula geral (I) e (II) da presente invenção, quando são empregados os intermediários de fórmula geral (III) e/ou (IV) acima descritos onde $X = Cl$, a reação é efetuada diretamente com o composto apresentando afinidade com a urease. Quando
- 15 $X = OH$, são empregados agentes de condensação, também conhecidos como agentes de acoplamento.

Os agentes de acoplamento preferentemente empregados no processo da presente invenção são selecionados do grupo das carbodiimidas compreendendo preferentemente a N,N' -

diciclohexil carbodiimida (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 1,3-diisopropil carbodiimida (DCI).

De acordo com o processo de preparação dos compostos de fórmula geral (I) e (II), os compostos com afinidade a urease empregados são selecionados do grupo compreendendo a uréia, N-hidroxiuréia, N,N'-dihidroxiuréia, bis-(hidroximetil)uréia, tiouréia, N-hidroxitouréia, N,N'-dihidroxitouréia, bis-(hidroximetil)tiouréia, guanidina, N-hidroxi guanidina, N,N'-dihidroxi guanidina e bis-(hidroximetil)guanidina.

O preparo dos compostos de fórmula geral III e IV é efetuado através de procedimentos usuais conhecidos pelos técnicos na área. No caso dos compostos da presente invenção, eles foram preparados preferentemente através da esterificação de derivados hidróxi - nitroimidazólicos empregando a reação com anidridos de ácidos com até 14 átomos de C em meio básico.

Dentre os derivados hidróxi - nitroimidazólicos, preferentemente foi empregado o metronidazol (2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etanol).

Dentre os anidridos de ácido foram preferentemente empregados os anidridos selecionados do grupo compreendendo o anidrido succínico, o anidrido glutárico e o anidrido diglicólico.

O pH básico do meio foi alcançado através do uso de bases inorgânicas, tais como o hidróxido de sódio ou o hidróxido de potássio. Preferentemente, foi empregado o hidróxido de sódio como base.

No preparo dos compostos de fórmula geral (I) a reação ocorre entre o composto de fórmula (III) onde X= OH ou Cl, e o composto com afinidade a urease na razão de 1:1

respectivamente. No meio reacional, preferentemente a razão entre o composto com afinidade a urease e o composto de fórmula (III) onde X= OH ou Cl empregados pode variar de cerca de 10:1 a 1:1 respectivamente, sendo preferentemente empregado um excesso molar do composto com afinidade a urease, evitando assim a dupla condensação.

No preparo dos compostos de fórmula geral (II) a reação ocorre entre os compostos de fórmula (III) e (IV) onde X= OH ou Cl e o composto com afinidade a urease na razão de 2:1 respectivamente. No meio reacional, preferentemente, a razão entre a concentração do composto com afinidade a urease e a concentração dos compostos de fórmula (III) e (IV) onde X= OH ou Cl empregados pode variar de cerca de 1:1 a 1:10 (concentração composto com afinidade a urease e soma da concentração dos compostos de fórmula (III) e (IV) respectivamente) dependendo da reação. Podem existir casos especiais onde a proporção entre estes reagentes deverá ser alterada fora destes limites para se alcançar condições ótimas de rendimento, isto muitas vezes decorrente da solubilidade dos compostos empregados no meio reacional mas, de forma geral, estes limites são eficientes na obtenção dos referidos compostos.

Outro objetivo da presente invenção são as composições farmacêuticas compreendendo como princípio ativo um composto inventivo de fórmula geral (I) ou (II) e pelo menos um excipiente selecionado dentre os excipientes farmacêuticos apropriados para o preparo de composições farmacêuticas.

Os compostos da presente invenção podem ser preparados na forma de diversas composições farmacêuticas empregadas na administração de agentes biológicos. A via de administração pode ser oral, tópica, nasal, injetável, etc.

Na composição farmacêutica da presente invenção, o ingrediente farmacêutico ativo é selecionado dos compostos de fórmula geral (I) ou (II), e é usado em concentrações terapêuticas apropriadas variando de 0,001% a 99,999% em peso da composição final. De forma a formular formas de dosagem permitindo meios adequados para sua veiculação, pelo menos um excipiente farmacêutico apropriado é usado para oferecer uma diluição adequada para o ingrediente ativo.

10 Numa realização preferencial da presente invenção, a composição farmacêutica compreende:

(a) um composto de fórmula (I) ou (II) empregado numa quantidade de pelo menos 0,001% em peso da composição final, e

(b) pelo menos um excipiente farmacêutico apropriado.

15 Numa outra realização preferencial da presente invenção, a composição farmacêutica compreende:

(c) um composto de fórmula (I) ou (II) empregado numa quantidade de pelo menos 1,0% em peso da composição final, e

20 (d) pelo menos um excipiente farmacêutico apropriado.

Como exemplo, os compostos da presente invenção podem ser formulados como pós ou grânulos para administração oral através de comprimidos, pílulas e cápsulas de gelatina dura, onde os compostos podem ter acrescentados em suas fórmulas excipientes farmacêuticos diversos empregados para diluir o princípio ativo, para auxiliar a compressão e para conferir propriedades diversas como liberação imediata ou controlada, solubilidade e estabilidade entre inúmeras outras propriedades.

30 Os compostos da presente invenção também podem ser formulados na forma de soluções apropriadas à administração

oral como soluções, elixires, xaropes, ou como soluções enclausuradas em cápsulas de gelatina mole. Podem ser também formulados como soluções injetáveis para o tratamento mais agressivo de diversas infecções. Podem também ser formulados
5 na forma de pastas, cremes, pomadas, loções ou pós para a administração tópica.

Além destas possibilidades, os compostos da presente invenção podem ser formulados com outros ingredientes farmacêuticos ativos auxiliares para o tratamento combinado
10 de infecções diversas, onde a necessidade de um agente multifuncional deva ser complementada pela ação de outros compostos para o tratamento das infecções.

Conseqüentemente, a presente invenção também tem por objetivo o uso dos compostos ativos de fórmula geral (I) e
15 (II) em composições, ou formulações farmacêuticas, ou medicamentos para tratar infecções diversas em animais e/ou humanos e, em particular, para tratar infecções mediadas por organismos produtores de urease como, por exemplo, a *Helicobacter pylori*.

Outro objetivo da presente invenção consiste no método de tratamento de indivíduos infectados pelo *Helicobacter pylori*, o qual consiste em administrar uma quantidade terapêutica efetiva dos compostos inventivos de fórmula geral (I) ou (II) na forma de uma composição farmacêutica
25 compreendendo um composto inventivo e pelo menos um excipiente farmacêutico apropriado.

Os exemplos descritos a seguir são ilustrativos, porém não exaustivos, das potencialidades dos compostos da presente invenção como substâncias menos mutagênicas que os fármacos dos quais elas derivam, de suas propriedades em inibir a
30 urease e de suas atividades sobre microorganismos como, por exemplo, o *Helicobacter pylori*.

EXEMPLO 1 - Síntese do monosuccinato de metronidazol

Em um reator de 100mL contendo 10mL de metanol a uma temperatura de aproximadamente 60°C adicionar 0,315g de metronidazol, 2,0mL de NaOH 1N, 0,2g de anidrido succínico e
5 manter sob agitação e aquecimento por cerca de 2 horas. Resfriar o meio reacional a uma temperatura aproximada de 8°C e manter em repouso por 12 horas. O meio reacional é filtrado e o solvente é evaporado à secura, rendendo 0,47g monosuccinato de metronidazol (Rendimento 94%).

10 EXEMPLO 2 - Síntese do monoglutarato de metronidazol

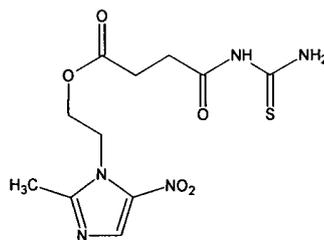
Em um reator de 100mL contendo 10mL de metanol a uma temperatura de aproximadamente 60°C adicionar 0,300g de metronidazol, 2,0mL de NaOH 1N e mantenha sob agitação por cerca de 30 minutos. Em seguida adicionar 0,2g de anidrido
15 glutárico e 1,0mL de NaOH 1N e manter sob agitação e aquecimento por cerca de 5 horas. Resfriar o meio reacional a uma temperatura aproximada de 8°C e manter em repouso por 12 horas. O meio reacional é filtrado e o solvente é evaporado à secura, rendendo 0,30g monoglutarato de metronidazol
20 (Rendimento 60%). PF= 203 - 205°C.

EXEMPLO 3 - Síntese do monodiglicolato de metronidazol

Em um reator de 100mL contendo 10mL de metanol a uma temperatura de aproximadamente 60°C adicionar 0,298g de metronidazol, 3,0mL de NaOH 1N e 0,252g de anidrido
25 diglicólico manter sob agitação e aquecimento por cerca de 5 horas. Resfriar o meio reacional a uma temperatura aproximada de 24°C e manter sob agitação por 24 horas. Resfriar o meio reacional a cerca de 8°C e manter em repouso por aproximadamente 12 horas. O meio reacional é filtrado e o

solvente é evaporado à secura, rendendo 0,20g monodiglicolato de metronidazol (Rendimento 40%). PF= 139 - 145°C.

EXEMPLO 4 - Síntese do 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 4-[(aminocarbonotioil)amino]-4-oxobutanoato



5

- Em um reator de 100mL dissolver 0,27g de monosuccinato de metronidazol em 5mL de N,N'-dimetilformamida sob agitação. Resfriar o meio reacional uma temperatura de cerca de 5°C e adicionar 0,36mL de DCI (1,3-diisopropil carbidiimida), 0,3g
- 10 de HOBT (1-hidroxibenzotriazol), ajustar o pH do meio numa faixa de 8 a 9 com TEA (triethylamina) e adicionar 0,3g de tiouréia. Manter o meio reacional sob agitação por cerca de uma hora e retirar o resfriamento mantendo a reação sob agitação por cerca de 23 horas em temperatura ambiente.
- 15 Adicionar cerca de 6mL de uma solução de NaHCO₃ 2,0M ao reator e extrair o meio reacional com três alíquotas de 30mL de acetato de etila ou éter etílico. Lavar a fase orgânica com 3 alíquotas de 30mL de solução aquosa de ácido cítrico 0,2M, separar a fase orgânica e secar com sulfato de sódio.
- 20 Filtrar o sólido e rotoevaporar a fase orgânica a uma temperatura de aproximadamente 40°C. O produto bruto resultante é cristalizado de metanol obtendo-se um rendimento de 78,42%. PF = 106 - 108°C.

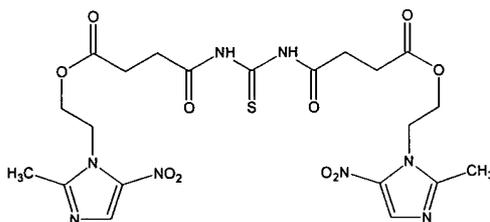
¹H RMN (DMSO-d₆) δ 8,04 (s,1H); 4,57 (t,2H); 4,37 (t,2H);

- 25 2,55 (t,2H); 2,51 (t,2H); 2,50 (s,3H).

^{13}C RMN (DMSO-d₆) δ 174,4; 171,3; 156,9; 132,0; 44,7; 42,3; 23,3; 22,4; 14,0.

IR (KBr): 3342, 3288, 1732, 1652, 1622, 1568, 1387, 1364, 1168, 1126, 1058.

5 **EXEMPLO 5 - Síntese do Bis [2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil] 4,4' [(tioxometileno)diimino]bis(4-oxobutanoato)**



Em um reator de 100mL adicionar 10mL de THF e aquecer a uma temperatura aproximada de 65°C. Sob agitação dissolver
10 0,41g de monosuccinato de metronidazol, adicionar lentamente 0,13mL de PCl₃ e aguardar a dissipação de fumos. Estabilizar o pH entre 9 e 10 com trietilamina (cerca de 0,5mL) e adicionar 0,12g de tiouréia. Manter o meio reacional sob agitação por cerca de 3 horas e evaporar o THF. O produto é
15 purificado via cromatografia preparativa em placa de sílica fluorescente com 50 micras de espessura empregando uma fase móvel de metanol:clorofórmio (70:20 - volume:volume).

Rendimento = 0,45g (90%).

^1H RMN (DMSO-d₆) δ 8,00 (s,2H); 4,38 (t,4H); 3,68 (t,4H);
20 2,56 (t,4H); 2,52(t,4H); 2,47 (s,6H);

^{13}C RMN (DMSO-d₆) δ 183,9; 172,4; 171,3; 152,0; 132,9; 51,6; 48,3; 28,4; 13,1.

IR (KBr): 3303, 3193, 1731, 1656, 1616, 1533, 1396, 1365, 1170, 1058.

TESTE DE ATIVIDADE MUTAGÊNICA

Os compostos inventivos foram avaliados quanto às atividades mutagênicas através do Teste de Ames sem ativação metabólica (-S9), com a linhagem de *Salmonella typhimurium* T-100. O teste é baseado no fato de as linhagens indicadoras de *S. typhimuirium* serem sensíveis a substâncias capazes de induzir diferentes tipos de mutação. Na presença de agentes mutagênicos, estas linhagens revertem o caráter de auxotrofia para a síntese de histidina e passam a formar colônias em meio desprovido deste aminoácido. A atividade mutagênica de um composto em função de sua concentração é estabelecida através da contagem de colônias por placa.

Os dados finais obtidos foram analisados utilizando-se o programa estatístico Salanal (*Salmonella Assay Analysis*) versão 1.0 do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA. Tal programa permite avaliar o efeito dose-resposta por meio do cálculo de análise de variância (ANOVA - teste F) entre a medida do número de revertentes nas diferentes concentrações (doses) testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. O modelo do programa escolhido para análise dos dados foi o de Bernstein (Bernstein *et al*, 1982). A inclinação da reta da parte linear da curva dose-resposta é também fornecida por este programa e corresponde ao número de revertentes induzidos por mg da amostra analisada.

A partir dos resultados obtidos, foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada concentração (dose) analisada, de cada composto.

A RM é dada pela seguinte equação:

$$RM = \frac{\text{média do n}^\circ \text{ de revertentes por placas teste (espontâneos + induzidos)}}{\text{média do n}^\circ \text{ de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos)}}$$

onde crescimento espontâneo significa o número de revertentes que desenvolveram na placa, independente de serem ou não induzidos, considerando-se como resposta positiva valores ≥ 2 (Valent *et al*, 1993).

5 A tabela 1 resume os resultados de atividade mutagênica obtidos para os compostos inventivos e controles empregados. Os valores tabelados correspondem a média \pm desvio padrão do número de colônias revertentes por placa e a respectiva razão de mutagenicidade calculada (RM).

10 **TABELA 1:** Atividade Mutagênica e Razão de Mutagenicidade (RM) em função da concentração da droga testada.

Concentração (mM) /placa	Metronidazol	Exemplo 1	Exemplo 4	Exemplo 5
0	123 \pm 13	106 \pm 8	86 \pm 2	126 \pm 3
2,9	376 \pm 38 RM = 3,1	175 \pm 37 RM = 1,6	92 \pm 2 RM = 1,1	162 \pm 29 RM = 1,3
14,6	1059 \pm 103 RM = 8,6	420 \pm 90 RM = 4,0	166 \pm 32 RM = 1,9	316 \pm 19 RM = 2,5
29,2	1626 \pm 77 RM = 13,2	954 \pm 101 RM = 9,0	225 \pm 14 RM = 2,6	606 \pm 94 RM = 4,8
58,4	1832 \pm 36 RM = 14,9	1674 \pm 233 RM = 15,8	371 \pm 61 RM = 4,3	1095 \pm 100 RM = 8,7
116,9	1053 \pm 227 RM = 8,6	1181 \pm 224 RM = 11,1	708 \pm 35 RM = 8,2	1582 \pm 79 RM = 12,5

15 Com os resultados obtidos foi construído o gráfico representado pela figura 1, onde é possível observar que os compostos inventivos dos exemplos 4 e 5 apresentam uma atividade mutagênica bastante inferior à apresentada pelo fármaco matriz metronidazol ou pelo seu éster derivado monosuccinato de metronidazol (exemplo 1). A partir do gráfico da figura 1 é também possível observar que em concentrações acima de 58,4mM/placa, o metronidazol e o

20 monosuccinato de metronidazol são tóxicos e matam as células empregadas no ensaio. Este efeito pode ser observado pela

queda das curvas correspondentes do metronidazol e do composto do exemplo 1.

TESTE DE ATIVIDADE PARA *HELICOBACTER PYLORI*

A atividade dos compostos da presente invenção para o *Helicobacter pylori* foi avaliada através da metodologia descrita por Magalhães, P.P. et al - *Helicobacter pylori* Primary Resistance to Metronidazole and Clarithromycin in Brazil - Antimicrobial Agents and Chemotherapy, June 2002, p. 2021-2023, Vol. 46, No. 6, e os resultados encontram-se apresentados na tabela 2.

TABELA 2: Avaliação de atividade contra *Helicobacter pylori*.

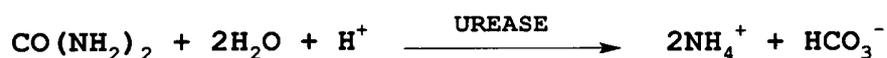
COMPOSTO	Cultura 627-99			Cultura 712-00		
	Concentração (µmol/placa)			Concentração (µmol/placa)		
	0,0234	0,0467	0,0935	0,0234	0,0467	0,0935
Metronidazol	+	+	+	+	+	+
Exemplo 1	+	+	+	+	+	+
Exemplo 4	+	+	+	+	+	+
Exemplo 5	+	+	+	+	+	+

Neste experimento foram testados o metronidazol (MDZ), o monossuccinato de metronidazol (exemplo 1) e os compostos inventivos dos exemplos 4 e 5. Foram empregadas duas culturas de diferente origem.

O teste de atividade contra *Helicobacter pylori* demonstra que os compostos inventivos são ativos desde a concentração mínima de inibição (MIC) empregada na avaliação para o metronidazol, demonstrando que eles apresentam no mínimo a mesma atividade do fármaco matriz (metronidazol) sobre o *H. pylori*.

TESTE DE INIBIÇÃO DE UREASE

A inibição da urease é avaliada através do ensaio baseado em RUÍZ-HERRERA, J; GONZALEZ, L. A (1969) e tem o objetivo de verificar no espectro visível, utilizando Vermelho de Fenol como indicador, a formação de amônio a partir da uréia de acordo com a seguinte reação:



De acordo com o teste, quanto menos amônio for formado, maior é a atividade inibidora de urease dos compostos testados.

Foram submetidos a este ensaio o metronidazol, a tiouréia e os compostos inventivos dos exemplos 4 e 5 empregando uma concentração de 30mM para cada composto. A tabela 3 apresenta a porcentagem de inibição da urease para cada composto testado.

TABELA 3: Porcentagem de inibição de urease dos compostos metronidazol, tiouréia, exemplo 4 e exemplo 5, a uma concentração molar de 30mM.

Compostos	Porcentagem de inibição / tempo		
	1 minuto	2 minutos	3 minutos
Metronidazol	6	7	7
Tiouréia	23	16	17
Exemplo 4	96	98	98
Exemplo 5	74	67	65

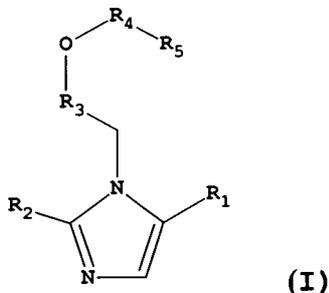
A representação gráfica destes resultados pode ser visualizada através do gráfico da figura 2, onde se pode observar de forma marcante a porcentagem de inibição da uréase, a 30 mM, pelos compostos da presente invenção.

Os resultados dos testes acima descritos demonstram a importância dos compostos da presente invenção, os quais

possuem um perfil de mutagenicidade reduzido, são potentes inibidores da urease e são pelo menos tão ativos quanto o fármaco matriz do qual derivam.

REIVINDICAÇÕES

- 1) Composto caracterizado por apresentar a fórmula geral (I)



5

ou seus sais farmacêuticos apropriados ou hidratos, onde:

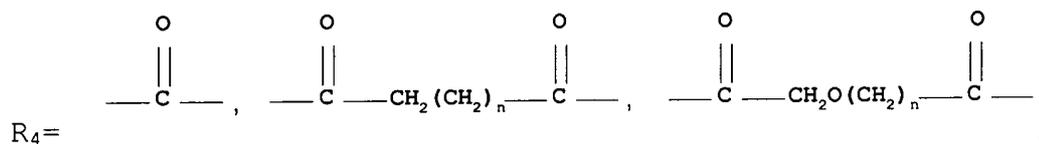
$R_1 = \text{NO}_2$, $R_2 = \text{CH}_3$ e $R_3 = \text{CH}_2$, CHCH_3 , CHCH_2Cl

OU

10

$R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NO}_2$ e $R_3 = \text{O}(\text{CH}_2)_4$, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2$, $\text{CHCH}_2\text{OCH}_3$, $\text{CONH}(\text{CH}_2)_{1-2}$, $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{N}$ (cyclopropyl ring).

E



CH_2CO , onde $n = 1-6$

15

$R_5 = \text{NHCONH}_2$, NHCONHOH , ONHCONHOH , $\text{OCH}_2\text{NHCONHCH}_2\text{OH}$, NHCSNH_2 , NHCSNHOH , ONHCSNHOH , $\text{OCH}_2\text{NHCSNHCH}_2\text{OH}$, NHCNHNH_2 , NHCNHNHOH , ONHCNHNHOH , $\text{OCH}_2\text{NHCNHNHCH}_2\text{OH}$.

- 2) Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado

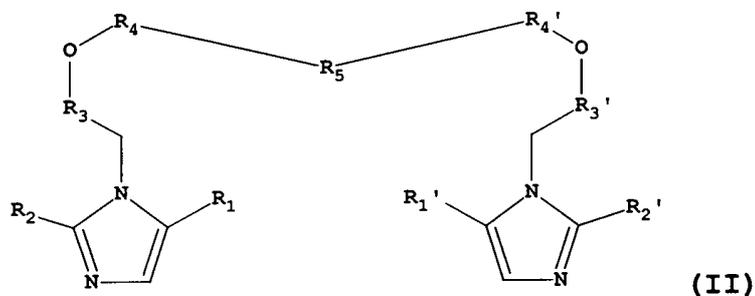
por $R_1 = \text{NO}_2$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{CH}_2$, $R_4 = \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---C---CH}_2(\text{CH}_2)_n\text{---C---} \end{array}$

20

onde $n=1$, e $R_5 = \text{NHCSNH}_2$.

- 3) Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser empregado no tratamento de infecções bacterianas e/ou parasitárias.

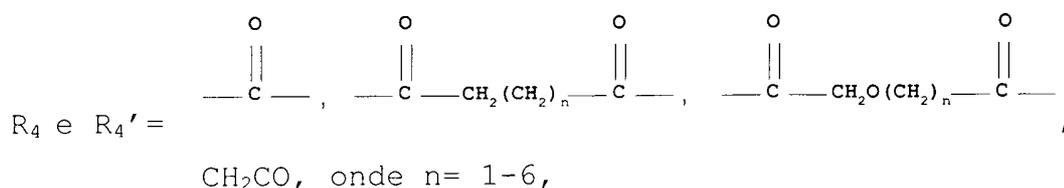
- 4) Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser empregado no tratamento de infecções mediadas por microorganismos produtores de urease.
- 5) Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser empregado para inibir a enzima urease.
- 6) Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser empregado no tratamento de infecções provocadas por *Helicobacter pylori*.
- 7) Composto caracterizado por apresentar a fórmula geral (II)
- 10



ou seus sais farmacêuticos apropriados ou hidratos, onde:

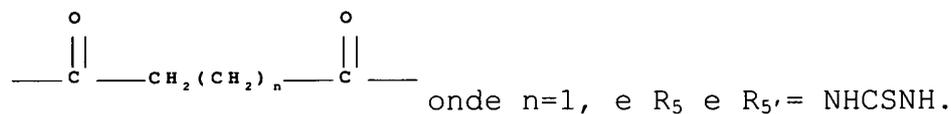
- 15
- R_1 e R_1' = NO_2 ,
- R_2 e R_2' = CH_3 e
- R_3 e R_3' = CH_2 , CHCH_3 , CHCH_2Cl
- OU
- R_1 e R_1' = H,
- R_2 e R_2' = NO_2 e
- 20
- R_3 e R_3' = $\text{O}(\text{CH}_2)_4$, $\text{OCH}_2(\text{CH})_2\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{-C}=\text{C-CH}_2$,
- $\text{CHCH}_2\text{OCH}_3$, $\text{CONH}(\text{CH}_2)_{1-2}$,

E

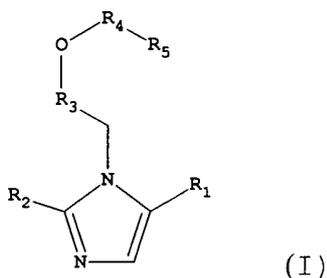


R_5 e $R_5' =$ NHCONH, NHCONHO, ONHCONHO, OCH₂NHCONHCH₂O,
NHCSNH, NHCSNHO, ONHCSNHO, OCH₂NHCSNHCH₂O,
NHCNHNH, NHCNHNHO, ONHCNHNHO, OCH₂NHCNHNHCH₂O.

- 5 8) Composto de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por R_1 e $R_1' = \text{NO}_2$, R_2 e $R_2' = \text{CH}_3$, R_3 e $R_3' = \text{CH}_2$, R_4 e $R_4' =$



- 9) Composto de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por ser empregado no tratamento de infecções bacterianas e/ou parasitárias.
- 10 10) Composto de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por ser empregado no tratamento de infecções mediadas por microorganismos produtores de urease.
- 11) Composto de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por ser empregado para inibir a enzima urease.
- 15 12) Composto de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por ser empregado no tratamento de infecções provocadas por *Helicobacter pylori*.
- 13) Processo para preparar um composto de fórmula geral (I)



20

Onde

$R_1 = \text{NO}_2$, $R_2 = \text{CH}_3$ e $R_3 = \text{CH}_2$, CHCH_3 , CHCH_2Cl

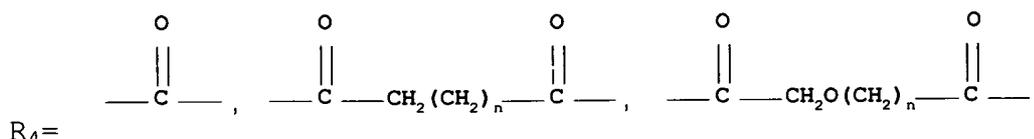
OU,

$R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NO}_2$ e $R_3 = \text{O}(\text{CH}_2)_4$, $\text{OCH}_2(\text{CH})_2\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{-C}=\text{C}-$

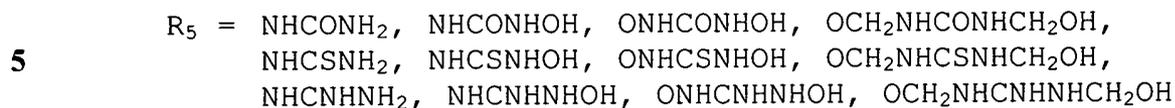
25

CH_2 , $\text{CHCH}_2\text{OCH}_3$, $\text{CONH}(\text{CH}_2)_{1-2}$, $\text{CH}-\text{N}$ (cyclic structure).

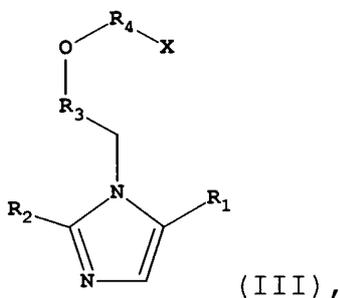
E



CH₂CO, onde n = 1-6,

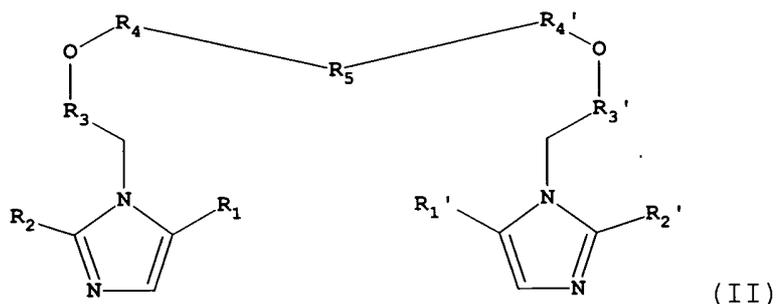


o qual compreende reagir um composto de fórmula (III)



10 onde R₁, R₂, R₃, R₄ são definidos acima e X = OH ou Cl,
 com um composto com afinidade a urease.

- 14) Processo de acordo com a reivindicação 13, onde para X= OH a condensação com o composto com afinidade a urease é efetuada usando um agente de acoplamento selecionado do grupo compreendendo N,N'-diciclohexil carbodiimida (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 1,3-diisopropil carbodiimida (DCI).
- 15) Processo de acordo com a reivindicação 13, onde o composto com afinidade a urease é selecionado do grupo compreendendo uréia, N-hidroxiuréia, N,N'-dihidroxiuréia, bis-(hidroximetil)uréia, tiouréia, N-hidroxitiouuréia, N,N'-dihidroxitiouuréia, bis-(hidroximetil)tiouréia, guanidina, N-hidroxi guanidina, N,N'-dihidroxi guanidina e bis-(hidroximetil)guanidina.
- 20 16) Processo para preparar um composto de fórmula geral (II)



Onde

R_1 e R_1' = NO_2 ,

R_2 e R_2' = CH_3 e

5 R_3 e R_3' = CH_2 , CHCH_3 , CHCH_2Cl

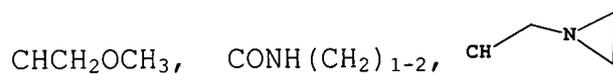
OU

R_1 e R_1' = H,

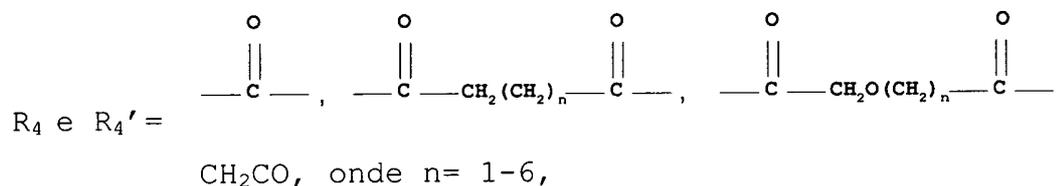
R_2 e R_2' = NO_2 e

R_3 e R_3' = $\text{O}(\text{CH}_2)_4$, $\text{OCH}_2(\text{CH})_2\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2$,

10



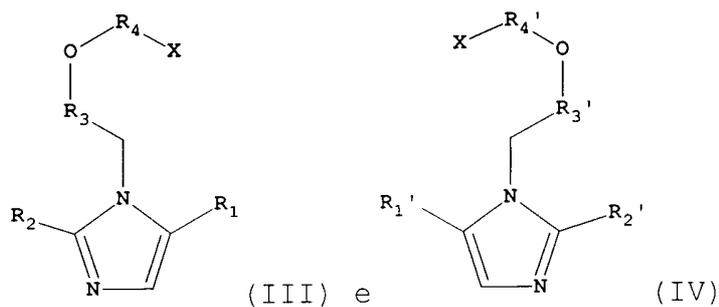
E



15

R_5 e R_5' = NHCONH , NHCONHO , ONHCONHO , $\text{OCH}_2\text{NHCONHCH}_2\text{O}$,
 NHCSNH , NHCSNHO , ONHCSNHO , $\text{OCH}_2\text{NHCSNHCH}_2\text{O}$,
 NHCNHNH , NHCNHNHO , ONHCNHNHO , $\text{OCH}_2\text{NHCNHNHCH}_2\text{O}$

o qual compreende reagir os compostos de fórmula (III) e (IV)



onde $R_1, R_1', R_2, R_2', R_3, R_3', R_4, R_4'$ são definidos acima e $X = OH$ ou Cl , com um composto com afinidade a urease.

- 5 **17)** Processo de acordo com a reivindicação 16, onde para $X = OH$ a condensação com o composto com afinidade a urease é efetuada usando um agente de acoplamento selecionado do grupo compreendendo N,N' -diciclohexil carbodiimida (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 1,3-diisopropil carbodiimida (DCI).
- 10 **18)** Processo de acordo com a reivindicação 16, onde o composto com afinidade a urease é selecionado do grupo compreendendo uréia, N -hidroxiuréia, N,N' -dihidroxiuréia, bis-(hidroximetil)uréia, tiouréia, N -hidroxitiouréia, N,N' -dihidroxitiouréia, bis-(hidroximetil)tiouréia, guanidina, N -hidroxiguanidina, N,N' -dihidroxiguanidina e bis-(hidroximetil)guanidina.
- 15 **19)** Composição farmacêutica caracterizada por compreender:
- (a) um composto de fórmula geral (I) como princípio ativo usado numa quantidade de pelo menos 0,001% em peso da composição final, e
- 20 (b) pelo menos um excipiente farmacêutico apropriado.
- 20)** Composição farmacêutica caracterizada por compreender:
- (a) um composto de fórmula geral (II) como princípio ativo usado numa quantidade de pelo menos 0,001% em peso da composição final, e
- 25 (b) pelo menos um excipiente farmacêutico apropriado.
- 21)** Uso do composto de acordo com a reivindicação 1 para preparar uma composição, formulação ou medicamento para tratar infecções em animais e/ou humanos.

- 22) Uso de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pela composição, formulação ou medicamento ser empregado no tratamento de infecções mediadas por microorganismos produtores de urease.
- 5 23) Uso de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pela composição, formulação ou medicamento ser empregado no tratamento de infecções por *Helicobacter pylori*.
- 24) Um método de tratamento de indivíduos infectados pelo *Helicobacter pylori*, que compreende administrar uma quantidade terapêutica efetiva de uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 19.
- 10 25) Uso do composto de acordo com a reivindicação 7 para preparar uma composição, formulação ou medicamento para tratar infecções em animais e/ou humanos.
- 15 26) Uso de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pela composição, formulação ou medicamento ser empregado no tratamento de infecções mediadas por microorganismos produtores de urease.
- 27) Uso de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pela composição, formulação ou medicamento ser empregado no tratamento de infecções por *Helicobacter pylori*.
- 20 28) Um método de tratamento de indivíduos infectados pelo *Helicobacter pylori*, que compreende administrar uma quantidade terapêutica efetiva de uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 20.
- 25 29) Um composto selecionado do grupo compreendendo:
- 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 4-[(aminocarbonotioil)amino]-4-oxobutanoato;
- 30 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil 4-[(aminocarbonil)amino]-4-oxobutanoato;

- 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil 4-
{ [amino(imino)metil]amino}-4-oxobutanoato;
- 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil 4-
{ [(hidroxiamino) carbonotioil]amino}-4-oxobutanoato;
- 5** 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil 4-
{ [(hidroxiamino) carbonil]amino}-4-oxobutanoato;
- 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil 4-
{ [(hidroxiamino) (imino)metil]amino}-4-oxobutanoato;
- 10** 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil 5-
[(aminocarbonotioil)amino]-5-oxopentanoato;
- 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil 5-
[(aminocarbonil)amino]-5-oxopentanoato;
- 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil 5-
{ [amino(imino)metil]amino}-5-oxopentanoato;
- 15** 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil 5-
{ [(hidroxiamino) carbonotioil]amino}-5-oxopentanoato;
- 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil 5-
{ [(hidroxiamino) carbonil]amino}-5-oxopentanoato;
- 20** 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil 5-
{ [(hidroxiamino) (imino)metil]amino}-5-oxopentanoato;
- 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil {2-
[(aminocarbonotioil)amino]-2-oxoetoxi}acetato;
- 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil {2-
[(aminocarbonil)amino]-2-oxoetoxi}acetato;
- 25** 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil (2-
{ [amino(imino)metil]amino}-2-oxoetoxi)acetato;
- 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil (2-
{ [(hidroxiamino) carbonotioil]amino}-2-oxoetoxi)acetato;
- 30** 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil (2-
{ [(hidroxiamino) carbonil]amino}-2-oxoetoxi)acetato;
- 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil (2-
{ [(hidroxiamino) (imino)metil]amino}-2-oxoetoxi)acetato;
- Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 4,4'-
[(tioxometilene) diimino]bis(4-oxobutanoato);
- 35** Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 4,4'-
[(iminometilene) diimino]bis(4-oxobutanoato);

Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 4,4'-
(carbonildiimino)bis(4-oxobutanoate);

5 Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 3,6,12-
trioxo-8,12-ditioxo-2,10-dioxa-7,9,11,13-
tetraazaheptadecan-17-oato;

Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil]
3,6,8,12,14-pentaoxo-2,10-dioxa-7,9,11,13-
tetraazaheptadecan-17-oato;

10 Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 8,12-
diimino-3,6,14-trioxo-2,10-dioxa-7,9,11,13-
tetraazaheptadecan-17-oato;

Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 5,5'-
[(tioxometilene)diimino]bis(5-oxopentanoato);

15 Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 5,5'-
(carbonildiimino)bis(5-oxopentanoato);

Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 5,5'-
[(iminometilene)diimino]bis(5-oxopentanoato);

Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 5,9-dioxo-
7-tioxo-3,11-dioxa-6,8-diazatridecane-1,13-dioato;

20 Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 5,7,9-
trioxo-3,11-dioxa-6,8-diazatridecane-1,13-dioato;

Bis[2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil] 7-imino-
5,9-dioxo-3,11-dioxa-6,8-diazatridecane-1,13-dioato;

ou seus sais farmacêuticos apropriados ou seus hidratos.

25 30) Uma composição farmacêutica caracterizada por
compreender como princípio ativo um composto de acordo
com a reivindicação 29, o qual é empregado numa
quantidade de pelo menos 0,001% em peso da composição
final, e pelo menos um excipiente farmacêutico
30 apropriado.

31) Uso do composto de acordo com a reivindicação 29 para
preparar uma composição, formulação ou medicamento para
tratar infecções em animais e/ou humanos.

- 32)** Uso de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pela composição, formulação ou medicamento ser empregado no tratamento de infecções mediadas por microorganismos produtores de urease.
- 5 33)** Uso de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pela composição, formulação ou medicamento ser empregado no tratamento de infecções por *Helicobacter pylori*.
- 10 34)** Um método de tratamento de indivíduos infectados pelo *Helicobacter pylori*, que compreende administrar uma quantidade terapêutica efetiva de uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 30.

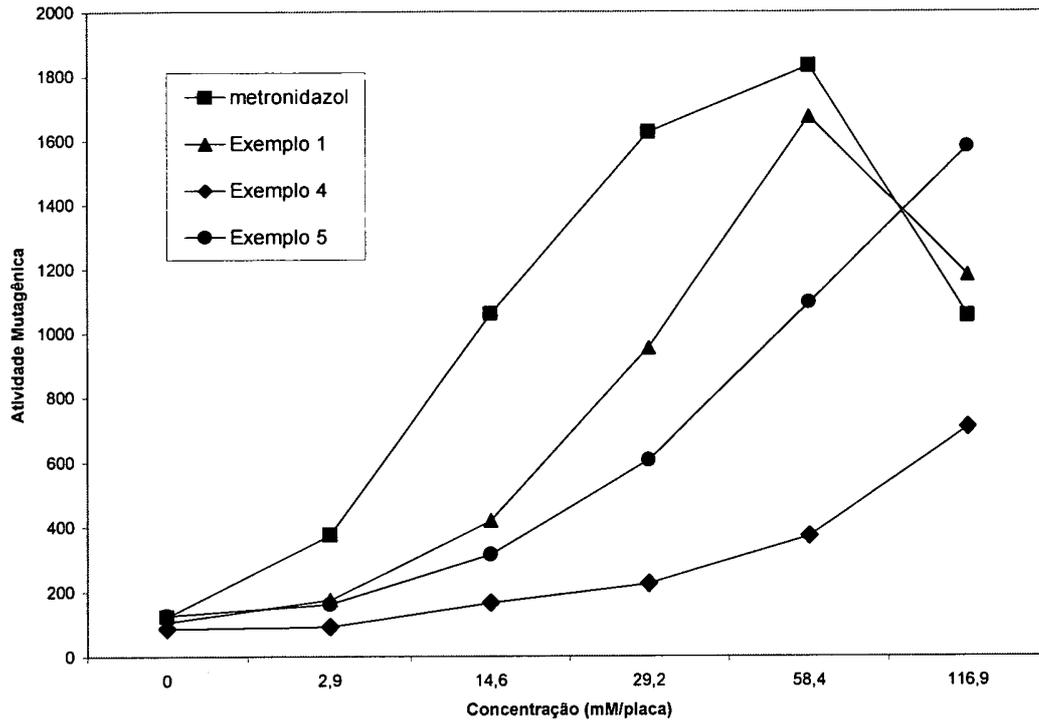


FIGURA 1

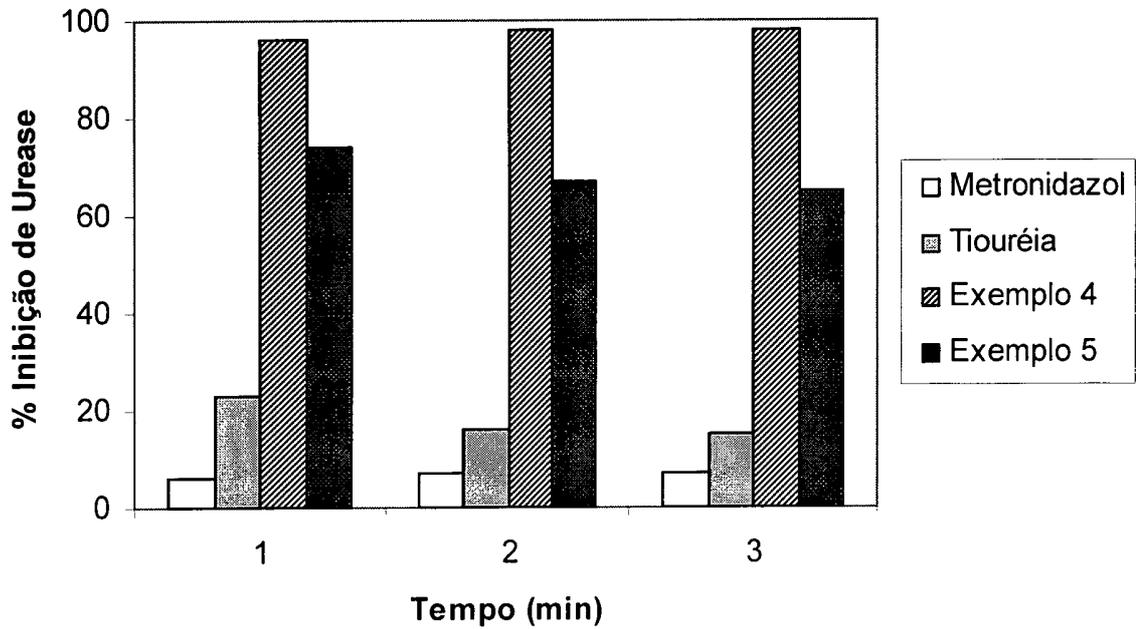


FIGURA 2

COMPOSTOS ANTIBACTERIANOS E/OU ANTIPROTOZOÁRIOS DERIVADOS DO NITROIMIDAZOL APRESENTANDO ATIVIDADE INIBIDORA DE UREASE, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DESTES COMPOSTOS E USO EM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E MEDICAMENTOS.

- 5 No presente pedido são descritos compostos derivados nitroimidazólicos com atividade antibacteriana e/ou antiprotozoária, os quais são potentes inibidores da urease. São também descritos o processo de obtenção destes compostos, e o uso destes em composições farmacêuticas e medicamentos.