



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

(21) **PI0705396-7 A2**



\* B R P I 0 7 0 5 3 9 6 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 12/12/2007  
(43) Data da Publicação: 22/12/2009  
(RPI 2033)

**(51) Int.Cl.:**  
A61K 31/4035 (2009.01)  
A61P 7/00 (2009.01)  
A61P 31/00 (2009.01)  
C07D 209/48 (2009.01)  
A61K 31/63 (2009.01)  
A61K 31/18 (2009.01)  
A61K 31/135 (2009.01)

(54) Título: **USO DE COMPOSTOS DERIVADOS FTALIMÍDICOS E/OU SULFONAMÍDICOS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS EM QUE HÁ A NECESSIDADE DE DIMINUIÇÃO DOS NÍVEIS DO FATOR TNF--(ALFA) E A NECESSIDADE DE UMA FONTE EXÓGENA DE ÓXIDO NÍTRICO, COMPOSTOS DERIVADOS FTALIMÍDICOS, COMPOSTOS DERIVADOS SULFONAMÍDICOS, MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UM COMPOSTO DERIVADO SULFONAMÍDICO**

(73) Titular(es): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

(72) Inventor(es): Carolina Lanaro, Chung Man Chin, Fernando Ferreira Costa, Jean Leandro dos Santos, Lídia Moreira Lima

(57) Resumo: USO DE COMPOSTOS DERIVADOS FTALIMÍDICOS E/OU SULFONAMÍDICOS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS EM QUE HÁ A NECESSIDADE DE DIMINUIÇÃO DOS NÍVEIS DO FATOR TNF-- $\alpha$  E A NECESSIDADE DE UMA FONTE EXÓGENA DE ÓXIDO NÍTRICO, COMPOSTOS DERIVADOS FTALIMÍDICOS, COMPOSTOS DERIVADOS SULFONAMÍDICOS, MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UM COMPOSTO DERIVADO SULFONAMÍDICO. A presente invenção se refere ao uso de compostos derivados ftalimídicos e/ou sulfonamídicos com propriedades doadoras de óxido nítrico, os quais apresentam importantes atividades no aumento da expressão gênica de gama globina e atividades antiinflamatórias e analgésicas, potenciais ao tratamento de doenças hematológicas em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF-  $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico. Mais particularmente, a presente invenção descreve o uso de tais derivados ftalimídicos e/ou sulfonamídicos para o tratamento de anemia falciforme. A invenção também apresenta como característica inovadora, a descrição de novos derivados ftalimídicos funcionalizados, desenhados a partir dos protótipos talidomida e hidroxiuréia e planejados racionalmente através da estratégia de hibridação molecular para o tratamento das doenças citadas. A invenção apresenta ainda um novo método de obtenção de um derivado sulfonamídico específico que pode ser utilizado na preparação de um medicamento para tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF-  $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "USO DE COMPOSTOS DERIVADOS FTALIMÍDICOS E/OU SULFONAMÍDICOS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS EM QUE HÁ A NECESSIDADE DE DIMINUIÇÃO DOS NÍVEIS DO FATOR TNF- $\alpha$  E A NECESSIDADE DE UMA FONTE EXÓGENA DE ÓXIDO NÍTRICO, COMPOSTOS DERIVADOS FTALIMÍDICOS, COMPOSTOS DERIVADOS SULFONAMÍDICOS, MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UM COMPOSTO DERIVADO SULFONAMÍDICO"

A presente invenção descreve o uso de compostos derivados ftalimídicos com propriedades doadoras de óxido nítrico, os quais apresentam importantes atividades no aumento da expressão gênica de gama globina e atividades antiinflamatórias e analgésicas, potenciais ao tratamento de doenças hematológicas em que há necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico. Mais particularmente, a presente invenção descreve o uso de tais derivados ftalimídicos para o tratamento de anemia falciforme.

#### Descrição do estado da técnica

A anemia falciforme é a mais prevalente doença genética hematológica conhecida caracterizada por uma mutação pontual no gene da  $\beta$ -globina, mais especificamente uma simples substituição de nucleotídeos (GTG para GAG) no sexto códon do gene  $\beta$ -globina, resultando na substituição de um ácido glutâmico por valina na superfície da cadeia  $\beta$ -globina variante ( $\beta^s$ -globina) (SAFO, M.K e col. **J. Med. Chem.** v.47, p.4665-4676, 2004).

A substituição do glutamato por uma valina tem conseqüências profundas na estrutura tridimensional da hemoglobina. O ácido glutâmico é carregado negativamente e a valina é um aminoácido neutro, isso permite a aproximação das moléculas de hemoglobina e, conseqüentemente, a polimerização, quando desoxigenada. Na conformação desoxi da hemoglobina falciforme (Hb S) a valina, presente na cadeia  $\beta$ , realiza interações hidrofóbicas com o bolso, constituído por aminoácidos hidrofóbicos, de uma molécula de Hb S vizinha, o que não é possível no estado oxigenado da hemoglobina, haja vista a inacessibilidade do bolso hidrofóbico nesta condição (ADACHI, K. e col. **J. Biol. Chem.** v. 263, n. 12, p. 5607-5610, 1988).

Estas interações levam à polimerização da desoxi Hb S em baixas pressões de oxigênio, situação típica dos leitos capilares em tecidos metabolicamente ativos (AVILA, C.M. e col. **Bioorg. Med. Chem.** v.14, p.6874-6885, 2006).

A polimerização de Hb S é o processo central da vaso-oclusão, característica da anemia falciforme (BUNN, H.F. **N Engl J Med** v.337, p.762-769, 1997; KAUL D.K. e col.

**Blood Rev.** v.10, p.29–44, 1996; a) FERRONE, F. A. e col. **J. Mol.Biol.** v.183, p. 591-610, 1985. b) FERRONE, F. e col. **J. Mol. Biol.** v.183, p.611-631, 1985; SAMUEL, R. E., e col. **Blood.** v.82, p.3474-3481, 1993).

5 Devido à polimerização intracelular da hemoglobina, por conta dos ciclos de oxigenação-desoxigenação, células contendo Hb S adquirem um formato de foice.

A falcização das hemácias está associada às alterações reversíveis da membrana. Com repetidos ciclos de falcização/desfalcização, as aberrações na função e estrutura da membrana tornam-se cada vez mais pronunciadas, culminando na fixação da membrana na forma falcizada (LEE, G.R. e col. Vol. I Manole, 1998, p.1161-1163.)

10 As hemácias falciformes demonstram uma aderência anormal ao endotélio vascular, monócito e macrófagos (DUITS, A. J. e col. **Clin Immunol Immunopathol** v.81, p.96–98, 1996; OKPALA, I. e col. **J. Eur. J. Haematol.** v.69, p.135–144, 2002.

15 Esta propriedade do sangue falciforme é conferida pelas células falciformes deformáveis e não pelas irreversivelmente falciformes, talvez porque as células rígidas sejam incapazes de formar contatos de superfície múltiplos com as células endoteliais. Esse fato denota uma forte correlação positiva com a frequência e gravidade das crises dolorosas. As áreas de turbulência nos capilares são os locais predominantes para a aderência.

20 A oclusão vascular é o principal evento responsável pelo quadro clínico da anemia falciforme, sendo a causa das crises álgicas e da falência de órgãos. As crises vaso-oclusivas iniciam-se na microcirculação venular, com o aprisionamento das células falcêmicas. O evento primário crucial para vaso-oclusão exclui a adesão de eritrócitos (reticulócitos e células densas deformadas) ao endotélio venular. Esta adesão leva a formação de agregados heterocelulares (leucócitos e células falcêmicas), que também  
25 contribuem para a obstrução, resultando em hipóxia local, aumento da formação de polímeros de Hb S, e propagação da oclusão da vasculatura adjacente. Transmigrações neutrofílica através das junções gap endoteliais aumentam a inflamação na microvasculatura (OKPALA, I. e col. **Eur. J. Haematol.** v.69, p.135–144, 2002.; OKPALA, I. **Blood Rev.** v.18, p.65–73, 2004).

30 Massas de hemácias falciformes entopem repetidamente os vasos da microcirculação, levando as crises de oclusão vascular dolorosas. De 5% a 10% das crianças ou adultos jovens falcêmicos apresentam, face ao entupimento dos vasos da microcirculação, quadros de acidente vascular cerebral, derrame ou hemorragia resultante de estenose ou dilatação aneurismática de artérias cerebrais importantes.

Tem sido relatado, que o aumento de hemoglobina fetal é benéfico ao paciente falciforme, aumentando sua sobrevida e diminuindo os episódios de dor (CHARACHE, S. e col. **Blood**. v.79, p. 2555-2565, 1992).

5 Recentemente, tem sido relatado que pacientes com anemia falciforme apresentam significativo aumento dos níveis circulantes de citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (MALAVÉ, I. e col. **Acta Haematol**. v. 90, p.172-176, 1993; FRANCIS, R. Jr., e col. **J. Natl. Med. Assoc**. v. 84: 611-615, 1992.; BUCHANAN e col. **Hematology**. p.35-47, 2004) cuja maior expressão relaciona-se diretamente a distintas patologias de origem inflamatória (MAKHATADZE, N. J. **Hum. Immunol**. v.59, p.571-579,  
10 1998).

O TNF- $\alpha$  exerce efeitos pró-inflamatórios aumentando as propriedades quimiotáticas, a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular, devido ao aumento das moléculas de adesão, estimulando a produção de radicais livres e a síntese de outros mediadores inflamatórios como IL-1 e PGE2. O TNF- $\alpha$  também induz mudanças nas  
15 propriedades coagulantes e anticoagulantes e aumenta a síntese hepática de alguns reagentes de fase aguda. Ademais, é um importante mediador da síndrome séptica e do choque endotóxico, sendo capaz de suprimir a biossíntese de lipases lipoprotéicas e enzimas lipogênicas em tecido adiposo, prejudicando o armazenamento de lipídeos nos adipócitos.

20 A capacidade do TNF- $\alpha$  em alterar as propriedades anticoagulantes do endotélio vascular e induzir a atividade pró-coagulante na superfície celular do endotélio, estimulando a produção do fator de ativação de plaquetas (PAF), e aumentando a adesão leucocitária às células do endotélio vascular, resulta no aumento da resistência ao fluxo sanguíneo, dificultando a circulação e, portanto, exacerbando a estase  
25 microvascular e a desoxigenação de Hb S.

Desta forma, o aumento dos níveis sanguíneos de TNF- $\alpha$ , em pacientes portadores de anemia falciforme, pode agravar as crises vaso-oclusivas, além de levar ao aparecimento de episódios infecciosos e inflamatórios (MALAVÉ, I. e col. **Acta Haematol**. v. 90, p.172-176, 1993).

30 De fato, Malavé e colaboradores (MALAVÉ, I. e col. **Acta Haematol**. v. 90, p.172-176, 1993), relataram interessante correlação inversa entre a porcentagem de hemoglobina fetal (Hb F) e a concentração sérica de TNF- $\alpha$ . Estes autores demonstraram que pacientes com altos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  apresentam conseqüente diminuição dos níveis de Hb F. Considerando que a Hb F possui efeito benéfico,

melhorando a oxigenação tecidual e diminuindo a polimerização de Hb S, tal correlação inversa potencializa os riscos de acidentes vasculares e concomitantemente dos sintomas associados à anemia falciforme. Ademais, o TNF- $\alpha$  tem papel importante na hiperalgesia periférica, e sua inibição tem sido associada à redução da dor aguda e crônica, o que explica o efeito analgésico da talidomida, primeiro fármaco anti-TNF- $\alpha$  introduzido na terapêutica (RIBEIRO, R.A. e col. **Eur. J. Pharmacol.**, v.391, p.97-103, 2000).

Por estas razões, a inibição do TNF- $\alpha$  tem sido demonstrada como importante estratégia para prevenção de complicações vasculares e inflamatórias relacionadas à doença falciforme.

Diversas substâncias têm sido relatadas possuindo ação direta sobre a inibição de TNF- $\alpha$ . Entre elas destacam-se os inibidores da enzima conversora de fator de necrose tumoral alfa (TACE), anticorpos neutralizantes (infiximab), e fármacos estruturalmente relacionados à talidomida.

Diversos laboratórios e grupos de pesquisa têm relatado as propriedades antiinflamatórias e imunomoduladoras da talidomida, demonstrando seu potencial terapêutico frente ao tratamento de patologias como mieloma múltiplo, cachexia, tuberculose, artrite, entre outras (MIYACHI, H. e col. **Bioorg. Med. Chem.** v.5, n. 11, p.2095-2102, 1997).

Neste contexto, o desenvolvimento de novos análogos da talidomida, contendo os principais farmacóforos para a atividade inibidora do TNF, e desprovida dos grupamentos toxicofóricos, responsáveis pela teratogenicidade, constitui objetivo ímpar para o desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas para o tratamento de patologias associadas ou agravadas pelo aumento dos níveis plasmáticos de TNF, a exemplo da anemia falciforme.

Contudo, até o momento, não existe tratamento específico para a anemia falciforme. O tratamento desta enfermidade genética é baseado na utilização de fármacos que minimizem ou combatam a sintomatologia da anemia falciforme. Entre os fármacos úteis ao tratamento sintomático disponíveis no mercado encontram-se a desferrioxamina (Desferal<sup>®</sup>), vacinas anti-pneumocócicas, penicilina profilática, ácido fólico (doses diárias) e a hidroxiuréia (Hydrea<sup>®</sup>).

A Hidroxiuréia (HU) é um conhecido inibidor da síntese de ribonucleotídeo redutase, enzima responsável pela conversão de ribonucleotídeos à deoxiribonucleotídeos, interferindo com a síntese de DNA e limita assim a síntese de

DNA (YARBRO, J.M. **Semin. Oncol.** v.19, p.1-10, 1992; HANFT, V.N. e col. **Blood.** v.95, n.11, 3589-3593, 2000).

A despeito da HU ser o principal fármaco disponível para o tratamento de anemia falciforme, liberado pela agência norte-americana FDA (Food and Drug Administration), diversos efeitos adversos estão associados a seu emprego continuado, muitos dos quais devem-se a sua capacidade de interromper o ciclo celular nas fases S e G1 (BUCHANAN, G.R. e col. **Hematology** p. 35-47, 2004; STUART, M.J. e NAGEL, R.L. **Lancet.** v. 364, p. 1343-1360, 2004.), ações que a caracterizam como agente citotóxico e antineoplásico.

Recentes estudos têm demonstrado que a terapia com hidroxiuréia (HU) reduz em 40% as mortes associadas à anemia falciforme. O benefício terapêutico da HU baseia-se no aumento dos níveis de hemoglobina fetal (Hb F), uma hemoglobina geneticamente distinta que inibe a polimerização de hemoglobina falciforme (Hb S) deoxigenada, impedindo ou dificultando o surgimento de sintomas relacionados a esta patologia (STEINBERG, M.H. e col. **JAMA**, v.289, p.1645-1651, 2003; CHARACHE, S. e col., **Medicine** v.75, p.300-326, 1996).

Além de inibir a ribonucleotídeo redutase, a HU também exerce seu mecanismo de ação como fármaco doador de óxido nítrico (NO), mediador importante na manutenção do fluxo e da pressão sanguínea normal. Sabe-se que HU reage com oxí e deoxihemoglobina, para formar metemoglobina, que então reage com outra molécula de HU para formar hemoglobina ferro nitrosilada (HbNO). A formação de HbNO envolve uma série de reações da subunidade hidroxilamínica, para formação de NO (COKIC, V.P. e col. **Blood.** v.108, n.1. p.184-191, 2006).

O benefício do óxido nítrico (NO) no tratamento da anemia falciforme baseia-se em sua capacidade de estimular a produção de hemoglobina fetal (Hb F) através da via de guanilato ciclase solúvel (sGC). A ativação de sGC aumenta a expressão de  $\gamma$  globina em células eritroleucêmicas e eritroblastos humanos primários. A inibição de sGC previne esse aumento, o que sugere que a via sGC regula a expressão de  $\gamma$  globina, e conseqüentemente a síntese de hemoglobina fetal (Hb F). Trabalhos têm demonstrado esta hipótese, mostrando que a HU, ativa sGC, e também induz a expressão de RNAm  $\gamma$  globina, aumentando os níveis de hemoglobina fetal (Hb F) em células eritroleucêmicas K562 e células progênitoras humanas. (CONRAN, N. e col. **Br. J. Haematol.** v.124, p.547-554. 2004).

Estes resultados indicam que a indução de Hb F mediada por NO induz a ativação de sGC e dá suporte a estratégia terapêutica baseada em óxido nítrico para pacientes com anemia falciforme.

Ademais, o NO possui efeitos vasodilatadores, que agrega efeitos benéficos na fisiopatologia e no tratamento da anemia falciforme. (KING, S.B. **Free Rad. Biol. Med.** v. 37, n 6, p.737-744, 2004).

A presente invenção trata do uso inédito de alguns derivados ftalimídicos e derivados sulfonamídicos na preparação de medicamentos alternativos ao tratamento de doenças que envolvam a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico. A invenção aqui descrita apresenta uma solução para as principais limitações associadas à terapia medicamentosa de doenças que envolvam a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico apresentando-se como uma alternativa para a redução dos efeitos colaterais e adversos dos compostos usualmente empregados

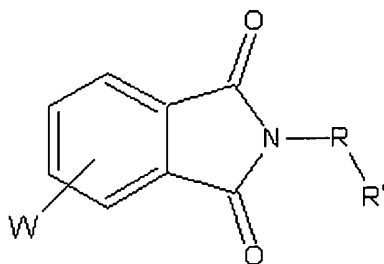
A invenção também apresenta dois novos derivados ftalimídicos que são utilizados na preparação de medicamentos para tratamento das doenças citadas bem como ainda descreve um novo processo de obtenção de um derivado sulfonamídico específico também utilizado na preparação de medicamentos para o tratamento de doenças que envolvam a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico. Em um aspecto mais particular, a presente invenção contorna a problemática relacionada às principais limitações e complicações associadas à terapia medicamentosa tradicionalmente usada para o tratamento de anemia falciforme, melhorando, assim, a qualidade de vida do paciente falcêmico.

#### **Breve descrição da Invenção**

A presente invenção proporciona alternativas para o tratamento de doenças em que há a envolvimento do aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico para tratamento.

Em um aspecto da invenção, as principais limitações e as complicações associadas à terapia medicamentosa usualmente empregada no tratamento da anemia falciforme seriam contornadas ou minimizadas com o uso dos derivados ftalimídicos e sulfonamídicos doadores de óxido nítrico e modulador de TNF- $\alpha$ , melhorando assim a qualidade de vida do paciente falcêmico.

A presente invenção se refere ao uso de um composto de fórmula geral (I)



(I)

5 onde W= H, halogênio, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, OH, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alcoxi, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> haloalcoxi, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> haloalquila; R corresponde a C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> alquila, 2-fenila, 3-fenila, 4-fenila, 2-benzila, 3-benzila, 4-benzila, 2-etilbenzila, 3-etilbenzila, 4-etilbenzila benzila, tiofeno, furano, pirrol, 2-piridina, 3-piridina, 4-piridina, pirazina, pirimidina, benzotiofeno, benzofurano, indol, quinolina, isoquinolina, naftaleno, CH<sub>2</sub>-2-tiofeno, CH<sub>2</sub>-3-tiofeno, CH<sub>2</sub>-2-furano, CH<sub>2</sub>-3-furano, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-2-tiofeno,  
 10 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-3-tiofeno, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-2-furano, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-3-furano; R' corresponde a O-NO<sub>2</sub> ou SO<sub>2</sub>NHOH ou furoxano; ou de um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, na preparação de um medicamento para tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF-α e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico.

15 A invenção também se refere ao uso de um composto de fórmula geral (II)

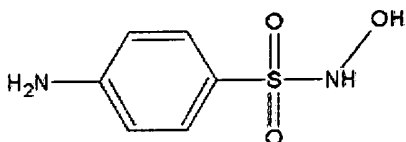


onde W= H, halogênio, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, OH, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alcoxi, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> haloalcoxi, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> haloalquila ,  
 R<sub>1</sub> corresponde 2-fenila ,3 fenila, 4-fenila, 2-benzila, 3-benzila, 4-benzila, 2-etilbenzila, 3-  
 20 etilbenzila ,4-etilbenzila, benzila, tiofeno, furano, pirrol, 2-piridina, 3-piridina, 4-piridina,  
 pirazina, pirimidina, benzotiofeno, benzofurano, indol, quinolina, isoquinolina, naftaleno,  
 CH<sub>2</sub>-2-tiofeno, CH<sub>2</sub>-3-tiofeno, CH<sub>2</sub>-2-furano, CH<sub>2</sub>-3-furano, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-2-tiofeno, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-3-  
 tiofeno, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-2-furano, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-3-furano, R<sub>2</sub> corresponde a OH, H, C(=O)NHOH,  
 C(=S)NHOH, C(=O)NOH (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); ou de um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo,  
 25 na preparação de um medicamento para o tratamento de doenças em que há a  
 necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF-α e a necessidade de uma fonte  
 exógena de óxido nítrico

A invenção se refere, ainda, a uma composição farmacêutica para tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF-α e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico compreendendo, tal composição,

composto selecionado dentre aqueles resultantes das fórmulas I e/ou II ou combinações entre os mesmos em um veículo farmacologicamente aceitável.

A invenção se refere também a um método de obtenção do composto de fórmula IIA



5

(IIA)

compreendendo as seguintes etapas:

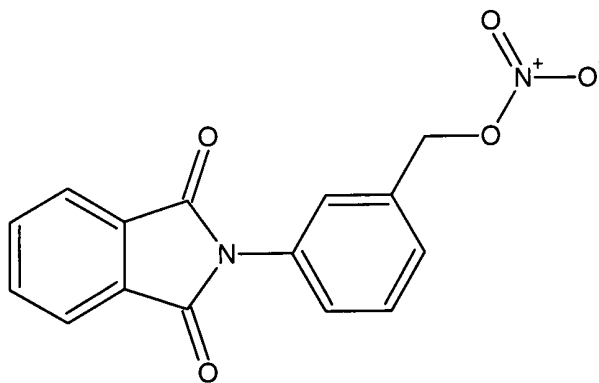
a) mistura, em recipiente apropriado, de cloridrato de hidroxilamina, bicarbonato de sódio e água

10

b) adição de etanol à mistura obtida na etapa a

c) adição de 4-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il) benzenosulfonil cloreto à mistura obtida na etapa b

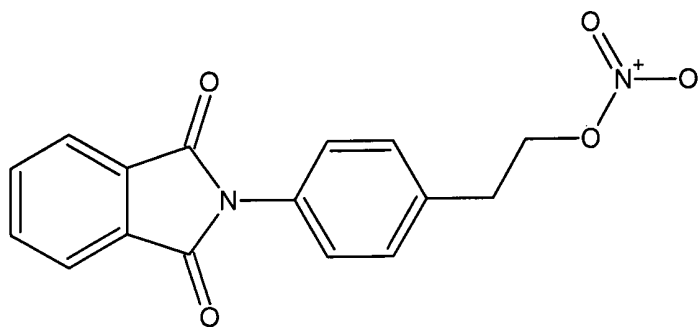
A invenção se refere ainda a um composto de fórmula (IC):



15

(IC)

e também a um composto de fórmula (IE)



20

(IE)

### **Breve descrição das Figuras**

Figura 1 - . Efeito dos derivados (300  $\mu\text{mol/Kg}$ ), via *i.p.*, em ensaio de edema de orelha de camundongo induzido por capsaicina. Os valores representam a média e erro padrão da média de 5 animais. (\* $p < 0,05$  foi considerado significativo ao nível de 95% de confiança no teste de *t* Student)

Figura 2 - Efeito dos derivados (300  $\mu\text{Mol/Kg}$ ), via oral, em ensaio de peritonite induzido por tioglicolato 3% em camundongo. Os valores representam a média erro padrão da média de 4 animais. (\* $p < 0,05$  foi considerado significativo ao nível de 95% de confiança no teste de *t* Student)

Figura 3 - Expressão de RNAm de gama globina na presença do exemplo 7 em diferentes concentrações, na ausência de hemina, nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h.

Figura 4 - Curva dose-resposta do composto IIA nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  nos tempos 24 h, 48h, 72h e 96h na ausência de hemina.

Figura 5 - Viabilidade celular dos compostos planejados

Figura 6 - Doseamento de óxido nítrico via indireta (nitrito)

### **Descrição detalhada da invenção**

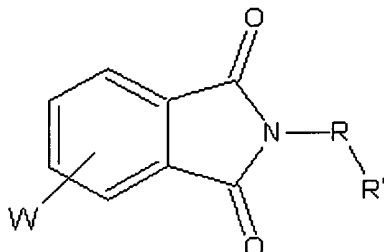
Atualmente, não existe tratamento específico para doenças hematológicas de origem genética, no entanto, existem no mercado fármacos úteis ao tratamento sintomático, que melhoram a qualidade de vida dos portadores destas doenças.

A presente invenção tem como principal característica inovadora, o uso de derivados ftalimídicos e/ou sulfonamídicos funcionalizados na preparação de medicamentos para o tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico. A invenção também apresenta como característica inovadora, a descrição de novos derivados ftalimídicos funcionalizados desenhados a partir dos protótipos talidomida e hidroxiuréia, e planejados racionalmente através da estratégia de hibridação molecular para o tratamento das doenças citadas. A invenção apresenta ainda como outra característica inovadora, um novo método de obtenção de um derivado sulfonamídico específico que pode ser utilizado na preparação de um medicamento para tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico.

O novo derivado foi obtido com bons a excelentes rendimentos químicos, empregando-se metodologia caracterizada por apresentar poucas etapas sintéticas,

partindo-se de compostos comercialmente disponíveis, o que qualifica esta metodologia para utilização industrial.

A presente invenção se refere ao uso de um composto de fórmula geral (I)

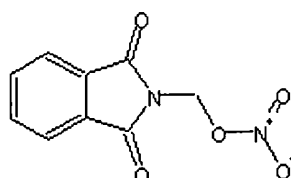


5

(I)

onde W= H, halogênio, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, OH, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alcoxi, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> haloalcoxi, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> haloalquila; R corresponde a C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> alquila, 2-fenila, 3-fenila, 4-fenila, 2-benzila, 3-benzila, 4-benzila, 2-etilbenzila, 3-etilbenzila, 4-etilbenzila benzila, tiofeno, furano, pirrol, 2-piridina, 3-piridina, 4-piridina, pirazina, pirimidina, benzotiofeno, benzofurano, indol, quinolina, isoquinolina, naftaleno, CH<sub>2</sub>-2-tiofeno, CH<sub>2</sub>-3-tiofeno, CH<sub>2</sub>-2-furano, CH<sub>2</sub>-3-furano, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-2-tiofeno, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-3-tiofeno, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-2-furano, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-3-furano; R' corresponde a O-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ou SO<sub>2</sub>NHOH ou furoxano; ou de um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, na preparação de um medicamento para tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF-α e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico. Preferencialmente, o composto de fórmula geral I descrito é utilizado na preparação de um medicamento para tratamento de anemia falciforme.

Em uma concretização preferida da invenção, utiliza-se o composto denominado (1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)metil nitrato, na preparação de um medicamento para tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF-α e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico. O composto mencionado possui fórmula estrutural (IA) :

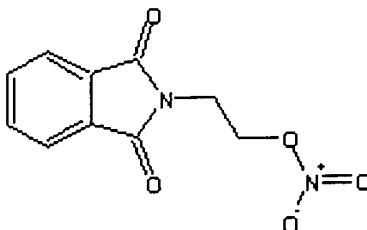


(IA)

25

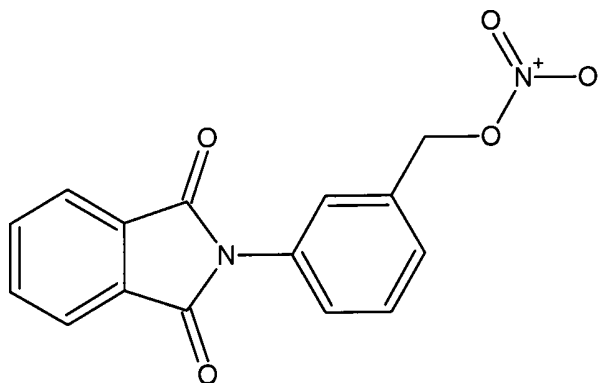
e, preferencialmente, é utilizado na preparação de um medicamento para tratamento de anemia falciforme.

Em outra concretização preferida da invenção, utiliza-se o composto denominado 2-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il) etil nitrato, na preparação de um medicamento para o tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico. O composto mencionado possui fórmula estrutural mostrada a seguir **(IB)** :

**(IB)**

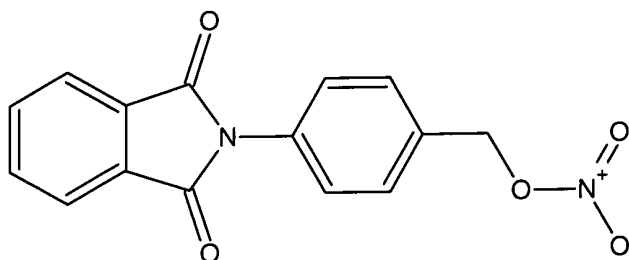
e, preferencialmente, é utilizado na preparação de um medicamento para tratamento de anemia falciforme.

Outra concretização preferida da invenção, utiliza o composto denominado 3-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)benzil nitrato, na preparação de um medicamento para tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico. O composto mencionado possui fórmula estrutural **(IC)** :

**(IC)**

e, preferencialmente, é utilizado na preparação de um medicamento para tratamento de anemia falciforme.

Em mais uma concretização preferida da invenção, é utilizado o composto denominado 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)benzil nitrato, na preparação de um medicamento para tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico. O composto mencionado possui fórmula estrutural **(ID)** :

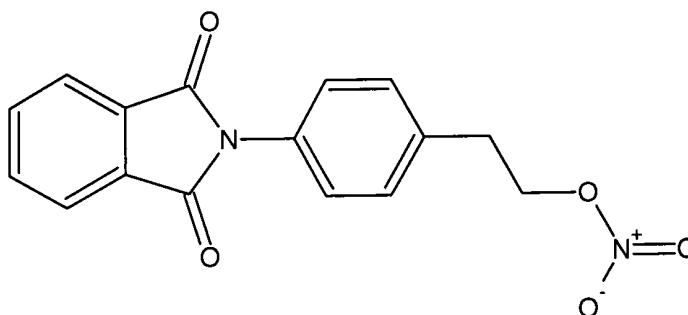


(ID)

5 e, preferencialmente, é utilizado na preparação de um medicamento para tratamento de anemia falciforme.

Em outra concretização preferida da invenção, é utilizado o composto denominado 2-[4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)fenil]etil nitrato, na preparação de um medicamento para tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico. O

10 composto mencionado possui fórmula estrutural (IE) :



(IE)

e, preferencialmente, é utilizado na preparação de um medicamento para tratamento de anemia falciforme.

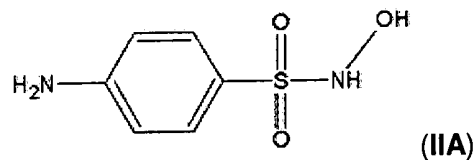
15 A presente invenção também se refere ao uso de um composto de fórmula geral (II)



onde W= H, halogênio, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, OH, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alcoxi, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> haloalcoxi, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> haloalquila , R<sub>1</sub> corresponde 2-fenila ,3 fenila, 4-fenila, 2-benzila, 3-benzila, 4-benzila, 2-etilbenzila, 3-etilbenzila ,4-etilbenzila, benzila, tiofeno, furano, pirrol, 2-piridina, 3-piridina, 4-piridina, pirazina, pirimidina, benzotiofeno, benzofurano, indol, quinolina, isoquinolina, naftaleno, CH<sub>2</sub>-2-tiofeno, CH<sub>2</sub>-3-tiofeno, CH<sub>2</sub>-2-furano, CH<sub>2</sub>-3-furano, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-2-tiofeno, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-3-tiofeno, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-2-furano, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-3-furano, R<sub>2</sub> corresponde a OH, H, C(=O)NHOH, C(=S)NHOH, C(=O)NOH (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); ou de um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo,

na preparação de um medicamento para tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico. Preferencialmente, o composto de fórmula geral descrito anteriormente é utilizado na preparação de um medicamento para tratamento de anemia falciforme.

Em uma concretização preferida da invenção, utiliza-se o composto denominado 4-amino-*N*-hidroxibenzenosulfonamida, na preparação de um medicamento para tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico. O composto mencionado possui fórmula estrutural (IIA) :



e, preferencialmente, é utilizado na preparação de um medicamento para tratamento de anemia falciforme

A invenção em questão se refere, ainda, a composições farmacêuticas para tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico compreendendo, tais composições, compostos selecionados dentre aqueles resultantes das fórmulas I e/ou II ou combinações entre os mesmos. As composições descritas na invenção em questão compreendem compostos de fórmula geral I e/ou II ou sais farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos, em associações com um excipiente farmacêuticamente aceitável.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas em uma variedade de formas de dosagem, por exemplo, oralmente, na forma de tabletes, cápsulas, açúcar ou tabletes cobertos de filme, soluções líquidas ou suspensões; via retal na forma de supositórios; parenteralmente, isto é via intramuscular, ou por infusão ou injeção intravenosa e/ou intratecal e/ou intraespinal.

As composições farmacêuticas a que se refere à invenção são normalmente preparadas seguindo métodos convencionais e são administrados em forma farmacêutica apropriada.

As formas farmacêuticas orais sólidas podem conter, juntas com o composto ativo, diferentes diluentes, como, por exemplo lactose, dextrose, sacarose, celulose,

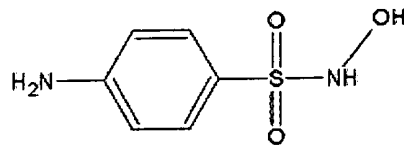
amido de milho, amido de batata ou outros diluentes compatíveis; lubrificantes, como sílica, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio ou de cálcio, e/ou glicóis de polietileno ou outros lubrificantes farmacêuticamente compatíveis; agentes de ligação como amidos, goma arábica, gelatina, metilcelulose, carboximetilcelulose, polivinil pirrolidona ou outros agentes de ligação compatíveis; agentes desagregantes, como amido, ácido algínico, alginatos ou glicolato de amido ou sódio ou outros agentes desagregantes compatíveis; misturas efervescentes; corantes; açucarados; agentes úmidos tais como lectina, polisorbatos, laurilsulfatos; e, em geral, substâncias inativas farmacologicamente e não tóxicas usadas em formulações farmacêuticas. Preparações ditas farmacêuticas podem ser manufaturadas de forma conhecida, por exemplo, por meio de mistura, granulação, prensagem em pastilha, cobertura de açúcar, processos de revestimento de filme ou outros processos compatíveis.

As dispersões líquidas para administração oral podem ser, por exemplo, xaropes, emulsões e suspensões. Os xaropes podem conter como carreador, por exemplo, sacarose ou sacarose com glicerina e/ou manitol e/ou sorbitol ou outro carreador farmacêuticamente aceitável. As suspensões e as emulsões podem conter como carreador, entre outros, uma goma natural, agar, alginato de sódio, pectina, metilcelulose, carboximetilcelulose, álcool polivinil ou outros carreadores compatíveis.

As suspensões ou soluções para injeção intramusculares podem conter, juntas com o composto ativo, um carreador farmacêuticamente aceitável, isto é, água estéril, óleo de oliva, oleato de etil, glicóis, isto é glicol de propileno, ou outro carreador aceitável farmacêuticamente e, se desejado, quantidade apropriada de hidrocloreto de lidocaína. As soluções para injeções intravenosa ou infusões podem conter como carreador, por exemplo, água estéril ou preferencialmente eles podem estar na forma de soluções salina estéril, aquosa, isotônica ou eles podem conter como carreador propileno glicol ou outro carreador farmacêuticamente aceitável.

Os supositórios podem conter juntamente com o composto ativo um carreador farmacêuticamente aceitável, por exemplo, manteiga de cacau, polietileno glicol, polioxietileno de sorbitano, surfactante de éster de ácido graxo, lecitina ou outros carreadores farmacêuticamente compatíveis.

A presente invenção se refere também a um novo método de obtenção do composto denominado 4-amino-*N*-hidroxibenzenosulfonamida de fórmula (IIA)



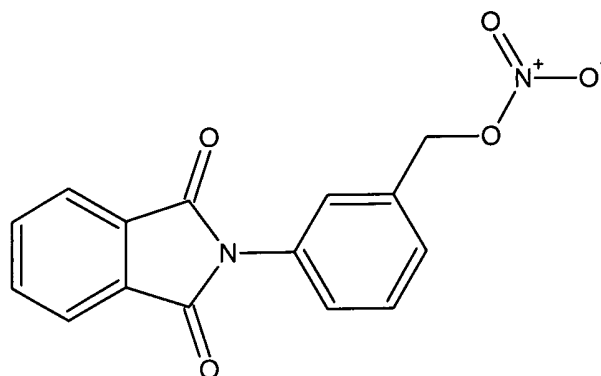
(IIA)

através das seguintes etapas:

- 5 a) mistura, em recipiente apropriado, de cloridrato de hidroxilamina, bicarbonato de sódio e água
- b) adição de etanol à mistura obtida na etapa a
- c) adição do cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il) benzenosulfonil à mistura obtida na etapa b

Em uma concretização preferida da invenção, a síntese de 4-amino-*N*-  
 10 hidroxibenzenosulfonamida realiza-se através da adição, em um balão de 10 ml, de 21,6 mg de cloridrato de hidroxilamina (0,31 mmol), 26,1 mg de bicarbonato de sódio (0,31 mmol) e 0,1 mL de água destilada. Após cessação da eliminação de CO<sub>2</sub>, adiciona-se 2 mL de etanol. Em seguida, adiciona-se 100 mg de cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il) benzenosulfonil (0,31 mmol). A reação é acompanhada por cromatografia  
 15 em camada delgada (CCD) (eluente: 100% Diclorometano) até indicação do término da reação. Após 45 minutos de reação, o solvente é evaporado a pressão reduzida, e o produto obtido é lavado com diclorometano a quente, (a fim de remover o cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il) benzenosulfonil que não reagiu para fornecer aproximadamente 82 mg (80%) de 4-amino-*N*-hidroxibenzenosulfonamida como um pó  
 20 branco, com faixa de fusão maior que 275 °C (C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>ClNO<sub>4</sub>S ; PM= 318,306 ). O composto obtido (4-amino-*N*-hidroxibenzenosulfonamida) através do método descrito, é utilizado, como detalhado anteriormente, para tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF-α e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico. Preferencialmente, o composto obtido (4-amino-*N*-  
 25 hidroxibenzenosulfonamida) é utilizado na preparação de um medicamento para tratamento de anemia falciforme.

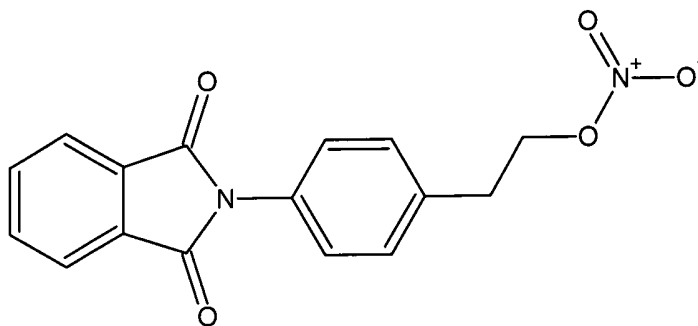
A presente invenção se refere ainda a um novo derivado ftalimídico denominado 3-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzil nitrato representado pela fórmula mostrada a seguir (IC)



(IC)

5 e utilizado, como descrito anteriormente, na preparação de um medicamento para tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico.

A invenção se refere também a um outro derivado ftalimídico denominado 2-[4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)fenil]etil nitrato de fórmula geral mostrada a seguir (IE)



(IE)

10

15 e utilizado, como descrito anteriormente, na preparação de um medicamento para tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico.

Os compostos descritos na presente invenção foram submetidos a uma série de ensaios a fim de atestar as atividades planejadas no tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico. Particularmente, os compostos foram submetidos a ensaios com objetivo de garantir a atividade destes como auxiliares no tratamento dos sintomas da anemia falciforme. Os ensaios realizados e os resultados obtidos são descritos a seguir.

20

Teste de atividade mutagênica

Inicialmente, os compostos foram avaliados no teste de AMES com objetivo de identificar uma possível mutagenicidade. Este ensaio é importante para obter compostos com menor perfil genotóxico, ademais guia as modificações moleculares para obtenção de compostos mais seguros. Os testes foram realizados com os compostos descritos anteriormente de fórmula geral IA, IB, IC, ID, IE e IIA e são mostrados nas tabelas 1, 2 e 3 a seguir.

Tabela 01: Avaliação mutagênica nas linhagens TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* na presença e ausência de ativação metabólica (S9) do composto IA.

concentração		TA 100		TA 102	
		+ S9	-S9	+ S9	-S9
Composto	nmol/placa				
IA	0	129,3 ± 8,1	136,7 ± 12,4	213,5 ± 15,5	197,33 ± 16,01
	7,25	154 ± 14,2 (1,19)	140,5 ± 17 (1,03)	298 ± 11,3 (1,4)	263,7 ± 15 (1,33)
	14,5	155 ± 5,9 (1,19)	161,7 ± 11 (1,18)	320,8 ± 17 (1,5)	249,7 ± 12 (1,26)
	29	140,3 ± 2 (1,08)	122,7 ± 3,06 (0,9)	385 ± 21,8 (1,8)	261,3 ± 20 (1,32)
	56	126,3 ± 8,1 (0,97)	234 ± 39,5 (1,71)	499 ± 8,9 (2,34)	153 ± 21 (0,77)*
	112	133,3 ± 11 (1,03)	335 ± 15,7 (2,45)	351,2 ± 12 (1,64)*	141 ± 18 (0,71)*
10	* morte celular				

Tabela 02 Avaliação mutagênica nas linhagens TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* na presença e ausência de ativação metabólica (S9) dos compostos IB, IC e IIA.

concentração		TA 100		TA 102	
COMPOSTO		+S9	-S9	+S9	-S9
IB	μmol/placa				
	0	104 ± 7,4	115 ± 13,2	219 ± 8,9	323 ± 10,2
	0,01	354 ± 6,9 (3,4)	171 ± 48,9 (1,49)	249 ± 11,7 (1,13)	394 ± 30 (1,22)
	0,021	335 ± 10,8 (3,22)	200 ± 23,3 (1,74)	269 ± 10,6 (1,22)	452 ± 23 (1,55)
	0,042	397 ± 25,9 (3,8)	223 ± 45,04 (1,94)	239 ± 22,5 (1,09)	502 ± 14 (1,25)
	0,085	395 ± 40,2 (3,8)	206 ± 30,2 (1,8)	247 ± 21,4 (1,12)	405 ± 24 (1,34)
	0,17	261 ± 11 (2,5)*	165 ± 11,1 (1,43)*	214 ± 32 (0,97)*	433 ± 35,4 (1,54)
IC	μmol/placa				
	0	129 ± 8,1	179 ± 8,72	372 ± 27,5	254,7 ± 14,6
	0,224	165 ± 13,2 (1,27)	216,7 ± 10,2 (1,21)	272 ± 26 (0,73)	281 ± 25 (1,10)
	0,488	153 ± 13,1 (1,18)	224,5 ± 24,6 (1,25)	378 ± 6,1 (1,01)	286 ± 4,2 (1,12)
	0,896	146 ± 5 (1,12)	266,3 ± 8,4 (1,48)	405 ± 11 (1,09)	303 ± 9,2 (1,19)
	1,8	163 ± 22,5 (1,26)	239,7 ± 11,3 (1,34)	399,3 ± 40 (1,07)	395,7 ± 9 (1,55)
	3,58	158,3 ± 9,3 (1,22)	323,7 ± 10,2 (1,8)	431 ± 17,9 (1,15)	387 ± 9,7 (1,52)
	μmol/placa				

IIA	0	129,3±8,14	146,7 ± 12,1	372,3±27,5	197,3±16,1
	0,98	160±12,4 (1,24)	146,3 ± 5,1 (0,99)	385±33,1 (1,03)	222±12 (1,12)
	1,96	175,7± 2 (1,36)	180,5 ± 7,8 (1,23)	323±5,54 (0,87)	241±13 (1,22)
	3,92	185,3±15 (1,43)	179 ± 11,3 (1,22)	423,7±22 (1,13)	251±19,2(1,27)
	7,85	206±13,6 (1,59)	172,7±12,5 (1,17)	387±14,4 (1,03)	232±13,1(1,17)
	15,7	354± 6,5 (2,74)	175 ± 2,8 (1,19)	300±4,9 (0,8)*	210±23 (1,06)

\* morte celular

Tabela 03 Avaliação mutagênica nas linhagens TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* na presença e ausência de ativação metabólica (S9) dos compostos ID e IE.

COMPOSTO	concentração	TA 100		TA 102	
		+S9	-S9	+S9	-S9
ID	μmol/placa				
	0	129,3±8,1	179 ± 8,7	372,3 ± 27,5	260,1 ± 11,6
	0,224	157±13 (1,21)	228 ± 18 (1,27)	405,7±13 (1,09)	340,3±9,7 (1,31)
	0,488	184,7±16 (1,42)	239±11,5 (1,33)	434,7±21 (1,16)	373,5±21 (1,43)
	0,896	216,7± 18 (1,67)	231±20,2 (1,29)	370 ± 6 (0,99)	391,2 ± 6,3 (1,5)
	1,8	192,7±16 (1,49)	212,3±17 (1,18)	397,3±9,3(1,06)	486,8±20 (1,87)
	3,58	263± 12,3 (2,03)	349 ± 5,6 (1,94)	427,3±5 (1,14)	420±8,6 (1,62)*
IE	μmol/placa				
	0	129,3± 8,1	136,7±12,4	372,3±27,5	197,3 ± 16,1
	0,12	363± 25,2 (2,8)	143,3 ± 5 (1,04)	335,3±11 (0,9)	256±6,9 (1,29)
	0,25	478,7±4,22 (3,7)	135,3±12 (0,99)	295,3±28 (0,8)	262±19,1 (1,32)
	0,5	628±40,8 (4,86)	136,3±13 (0,99)	406±14,1 (1,09)	266,7±18 (1,35)
	1	739±25,4 (5,72)	121,5±14 (0,89)	465±10,6 (1,25)	265,7±10 (1,34)
	2	750± 13,6 (5,79)	177±23,6 (1,30)	447±19,8 (1,2)	201±4,7 (1,02)*

5 \*morte celular

- O composto de fórmula IA apresentou razões de mutagenicidade (RM) de 2,45 e 2,34; na linhagem TA100, na ausência de ativação metabólica (112 nmol/placa), e na linhagem TA102, na presença de ativação metabólica (56 nmol/placa), respectivamente.
- 10 Em concentrações superiores a 56 nmol na TA102 (+S9), observa-se toxicidade, com diminuição do número de revertentes por placa (Tabela 01). O composto IA é um derivado alquílico que apresenta carbono metilênico reativo, ou seja, o átomo de carbono apresenta uma carga parcial positiva pela retirada da densidade eletrônica por conta dos grupamentos α mais eletronegativos. A presença desse carbono metilênico, favorece o
- 15 ataque por bionucleófilos, levando à eliminação do nitrato, que rapidamente se decompõe em uma espécie radicalar gerando uma série de efeitos deletérios no DNA do procarionto, que não possui um sistema reparador tão eficiente quanto dos eucariotos. Ademais, pode ocorrer a adição do bionucleófilo ao carbono metilênico reativo resultando na formação

de aduto covalente, modificando de forma irreversível a estrutura original do bionucleófilo em questão.

5 O composto de fórmula IB apresenta nas concentrações utilizadas, mutagenicidade na linhagem de TA100 na presença de ativação metabólica, em todas as concentrações testadas e com as seguintes razões de mutagenicidade (RM): 0,01  $\mu\text{mol}$  (3,4); 0,021  $\mu\text{mol}$  (3,22); 0,042  $\mu\text{mol}$  (3,8); 0,085  $\mu\text{mol}$  (3,8) e 0,17  $\mu\text{mol}$  (2,5) (Tabela 02).  
10 Dentre a série alquílica testada, esse foi o que apresentou maior RM. Quando se compara o composto IB, com o composto IA, é evidente que no primeiro há um menor impedimento ao ataque no carbono metilênico, facilitando o acesso do bionucleófilo. O impedimento no composto IA é maior, devido à presença de grupamentos volumosos nas posições  $\alpha$ . Isso explicaria maior razão de mutagenicidade do composto IB, e nos permite prever que os compostos metilênicos devam ser menos mutagênicos que os compostos etilênicos. Essa hipótese é melhor analisada através dos resultados dos testes com os compostos ID e IE.

15 O composto IC não apresentou mutagenicidade nas concentrações utilizadas, embora no ensaio com a linhagem TA100 na ausência de ativação metabólica e na concentração de 3,58  $\mu\text{mol/placa}$  apresentasse uma razão de mutagenicidade de 1,8; ou seja, indícios de mutagenicidade (Tabela 01). Quando se compara o composto IA com o composto IC, observa-se que esse último – derivado interferilênico – possui menor mutagenicidade já que o índice se mostrou em apenas 3,58  $\mu\text{mol/placa}$ , enquanto no  
20 composto IA, houve mutagenicidade a 112  $\text{nmol/placa}$  com RM de 2,45 (TA100; -S9). Também, quando se compara o composto IC, com o composto IB, observa-se uma menor mutagenicidade do derivado interfenilênico. Esses dados sugerem que os derivados arílicos, ou seja, aqueles que apresentam um anel aromático ligado a  
25 subunidade ftalimídica (compostos IC, ID, IE e IIA) apresentam menor mutagenicidade que os derivados alquílicos, ou seja, aqueles em que a cadeia alquílica está ligada diretamente a subunidade ftalimídica (compostos IA e IB); corroborando a hipótese de que fatores estéricos, impedem o acesso do bionucleófilo ao sítio reativo, modulando a mutagenicidade dos derivados sintetizados.

30 O composto IIA é um derivado sulfonamídico que não apresenta a subunidade nitrato, comum a todos os demais compostos. É relatado na literatura que derivados hidroxilamínicos, ou derivados do ácido hidroxâmico, apresentam mutagenicidade devido principalmente à grande contribuição toxicofórica dessa subunidade (ZHU, X. e col. Mut. Res. v.425, p.153-167, 1999). Durante muito tempo, a subunidade hidroxilamínica foi  
35 apontada como um dos principais metabólitos, gerados na redução do grupo nitro,

responsáveis pela atividade mutagênica de nitrocompostos (ex. cloranfenicol, metronidazol e nitrofuranos). No entanto, constatou-se que são espécies radicalares formadas em etapas anteriores a reduções que geram produtos mutagênicos, e não o derivado hidroxilamínico por si só (TOCHER, J.H. **Gen. Pharmac.** v. 28, n. 4. p.485-487, 5 1997).

Dessa forma, avaliou-se o composto IIA, contendo a subunidade hidroxilamínica, a fim de verificar a contribuição toxicofórica dessa subunidade no composto sintetizado. Esse derivado foi posteriormente reagido com anidrido ftálico para obtenção de um derivado ftalimídico.

10 Na concentração de 15,7  $\mu\text{mol/placa}$  na linhagem de TA100, com ativação metabólica, o composto IIA apresentou razão de mutagenicidade de 2,74. Acima de 15,7  $\mu\text{mol/placa}$ , há diminuição do número de revertentes por toxicidade celular. A possível mutagênese do composto IIA, que só ocorre na presença de ativação metabólica, poderia ser atribuída à formação de um derivado oxidado e/ou radicalar desse composto. Quando 15 se compara, a concentração do composto IIA usado no ensaio com os derivados arílicos (compostos IC, ID e IE) observa-se que, embora apareça mutagênese, esta só é observada em concentrações elevadas, chegando a ser 125 vezes maior, em número de mols, àquela encontrada para o composto IE (0,12  $\mu\text{mol/placa}$ ).

O composto ID apresentou na linhagem TA100, na presença de ativação 20 metabólica e na concentração de 3,58  $\mu\text{mol/placa}$  uma razão de mutagenicidade de 2,03; enquanto na ausência de ativação metabólica, nessa mesma concentração, apresentou indícios de mutagenicidade com valores de RM iguais a 1,94. Na concentração de 1, 8  $\mu\text{mol/placa}$  na ausência de S9, na linhagem TA102, apresentou indícios de mutagenicidade, com RM igual a 1,87 (Tabela 03). Quando se compara o composto ID, 25 regioisômero do composto IC, observamos um discreto perfil de maior mutagenicidade e/ou indício de mutagenicidade do composto ID em relação ao composto IC.

O composto IE, derivado interferilênico do composto IB apresentou na linhagem de TA100 na presença de ativação metabólica, assim como o composto IB, mutagênese nas concentrações de 0,12; 0,25; 0,5; 1 e 2  $\mu\text{mol/placa}$ , com valores de RM de 2,8 ; 3,7; 30 4,86; 5,72 e 5,79 respectivamente (Tabela 03). Embora os valores de RM sejam maiores no composto IE em relação ao composto IB, esse último encontra-se em menor concentração molar. A necessidade de maiores concentrações para o composto IE apresentar mutagênese confirma, em termos estruturais, o que já se havia observado entre os compostos IA e IC de que a presença da fenila ligada à subunidade ftalimídica 35 diminui a mutagenicidade dos compostos.

Quando se compara o composto IE, com o composto ID, ambos *para* substituídos podemos confirmar também, o visualizado entre os compostos IA e IB, de que o espaçamento etílico aumenta a mutagênese, quando comparado ao metílico. Conforme discutido anteriormente, esse fator deve estar relacionado além do fator eletrônico, principalmente ao fator estérico, devido ao melhor acesso por nucleófilos ao carbono  $\alpha$  ao grupamento nitrato.

Quando relacionamos os compostos obtidos, com os padrões talidomida e hidroxiuréia, observamos uma sensibilidade do teste de AMES em responder aos exemplos, quando comparado com HU e talidomida. Essa observação embora sugira uma maior atividade mutagênica dos compostos sintetizados em relação aos padrões do planejamento estrutural, não pode ser conclusiva e necessita-se de mais ensaios para tal afirmação. Ademais, talidomida, HU e compostos sintetizados são estruturalmente distintos e poderiam, por essa peculiaridade química, apresentar perfil mutagênico diferenciado.

Dos conjuntos de resultados obtidos no teste de AMES podemos inferir que:

Os derivados alquílicos (compostos IA e IB) apresentam maior mutagenicidade expressa pela média do número de revertentes/placa que os derivados arílicos (compostos IIA, IC e ID);

Os derivados com espaçamento etilênico, apresentam maior mutagênese que os compostos metilênicos;

Esse conjunto de resultados nos permite concluir que o espaçamento benzílico é o mais adequado à obtenção de compostos com menor mutagenicidade.

Ademais, mesmo para os compostos mutagênicos, razão de mutagenicidade igual a 2, é considerada pequena, se comparada à fármacos utilizados na terapêutica como o metronidazol, que apresenta RM de 14,9 quando ensaiado a 58,4  $\mu\text{mol}$  em TA 100 sem ativação metabólica (SILVA, A.T.A. e col. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 5, p.893-914, 2005). Isso nos permite concluir que embora haja indícios de mutagenicidade para os compostos, ela é muito baixa, e esses resultados podem não refletir em células eucarióticas.

Edema de orelha de camundongo induzido por capsaicina

O ensaio é caracterizado por uma reposta inflamatória aguda da orelha, com desenvolvimento de edema, e foi realizado a fim de avaliar a atividade antiinflamatória dos compostos sintetizados.

Nesse ensaio foi utilizado indometacina como controle a 100 µmol/Kg, e os derivados ftalimídicos foram avaliados inicialmente a 300 µmol/Kg via *i.p.* Pela tabela 4, observa-se que o composto IC e IE apresenta porcentagem de inibição do edema de orelha superior a 64%. O composto IC apresentou porcentagem de inibição em torno de 64,09% no ensaio realizado. Já os demais compostos apresentam uma atividade similar quando comparados à indometacina (figura 01), considerando o erro-padrão. Esses resultados apontam que os compostos sintetizados apresentam atividade antiinflamatória na fase aguda, devido provavelmente a inibição da citocina TNF $\alpha$ , já que se sabe que os derivados ftalimídicos possuem essa atividade.

10 Tabela 4 - Ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina (i.p.)

	Controle +	Composto IA	Composto IB	Composto IC	Composto IIA	Composto ID	Composto IE
N	5	5	5	5	5	5	5
Média da % de inibição	-	53.75	46.55	64.09	49.24	37.18	76.58
EPM	-	8.66	3.49	6.44	10.58	19.38	5.32

\* Animais apresentaram valores maior que os controles

#### Ensaio de peritonite

15 Em um segundo ensaio foi realizada a avaliação do número de leucócitos totais ( $10^6$ /mL), afim de avaliar a capacidade de inibir a infiltração dessas células no processo inflamatório. Todos os derivados ftalimídicos apresentaram atividade na inibição do infiltrado leucocitário (figura 2; Tabela 5) com perfil de atividade semelhante, considerando o erro-padrão. Esses resultados demonstram o potencial antiinflamatório desses compostos.

20 Tabela 5 – Resultados do ensaio de peritonite

	Controle +	Composto IA	Composto IB	Composto IC	Composto IIA	Composto ID	Composto IE
N	3	3	3	3	3	3	3
% de inibição		12,5	51,25*	42,85	28,57	32,14	26,25
Média Nº de cel (x 10 <sup>6</sup> )	5,6	4,9	2,73	3,2	4,0	3,8	4,13
EPM	0,20	0,7	1,0	0,8	0,30	0,2	1,16

# Animal sangrou

- P < 0,05 (Teste T de Studente)

### Contorção abdominal induzida por ácido acético

A fim de avaliar a atividade analgésica periférica dos compostos foi realizado o ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético (Tabela 6). Neste ensaio, podemos inferir que o composto ID apresenta importante atividade analgésica, inibindo em 66% a contorção abdominal. Outros compostos como IA, IIA e IE também apresenta importantes inibições da contorção abdominal induzida por ácido acético, demonstrando o potencial analgésico destes compostos. A atividade analgésica pode estar relacionada à capacidade destes compostos em inibir a citocina TNF $\alpha$ , já que se sabe que este seria um dos mecanismos para explicação da analgesia de moléculas como a talidomida.

10 Tabela 6 - Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético

	Controle +	Composto IA	Composto IB	Composto IIA	Composto ID	Composto IE
<b>Média</b>	47,54	28,6	39,2	30,4	16,2	
<b>% de Inibição</b>	-	39,83	23,22	36,05	66,03	33,95
<b>EPM</b>	3,39	9,25	8,65	7,83	5,24	6,60

Ensaio para avaliação do aumento de gama globina por PCR em cultura de células K562

15 Dos resultados obtidos na avaliação da expressão gênica induzida pelos compostos em cultura de células eritroleucêmicas K562, e quantificadas por PCR Real Time, podemos concluir que:

O composto IE apresenta atividade nesse modelo, aumentando a expressão gênica de gama globina, na presença e na ausência de hemina;

20 Na presença de hemina, o composto IE não apresentou atividade significativamente maior que na ausência de hemina, quando comparados ao controle (Figura 3);

Aparentemente o composto IE apresenta efeito na expressão de gama-globina em baixa concentração (5  $\mu$ M e 30  $\mu$ M);

25 O composto IE mostrou altas porcentagens de viabilidade celular (maior que 90%) nos ensaios com e sem hemina, demonstrando ausência de efeitos tóxicos nas concentrações utilizadas;

O composto IIA apresentou atividade superior ao controle na expressão de gama-globina (Figura 4).

O aumento da expressão de gama globina induzida pelo composto IIA, é maior que o aumento gerado pelo composto IE, sugerindo que o composto IIA, é mais eficiente no aumento da expressão gênica de gama-globina.

Quando se compara o composto IIA com os dados de literatura de HU, observamos que o composto IIA, a 5 µM no tempo de 48 horas apresenta atividade, enquanto HU para produzir atividade comparável é utilizado a 10 µM no mesmo tempo.

A viabilidade celular em 0 h foi de 97%, e esse mesmo padrão foi mantido durante a realização do ensaio, demonstrando ausência de toxicidade do composto IIA (Figura 5).

Metodologias usadas para ensaios farmacológicos:

10 Procedimentos para avaliação da atividade mutagênica (Teste de AMES)

O procedimento foi inicialmente desenvolvido por (MARON, D.M. e AMES, B.N. **Mut. Res.** v.113, p.173-215, 1983)

Linhagens utilizadas no ensaio:

15 Há diversas linhagens de *Salmonella typhimurium* modificadas geneticamente a fim de detectar um tipo predominante de mutação, entre elas podemos citar: TA97, TA98, TA100 e TA102. TA100 e TA102 detectam mutações que causam substituição de pares de base, TA 98 e TA 97 detectam alterações onde há defasagem no quadro de leituras do DNA (MARON & AMES, 1983).

20 Utilizou-se para esse ensaio cepas de *Salmonella typhimurium* TA100 e TA102 do laboratório de mutagenicidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP Araraquara. Tais linhagens possuem as seguintes características: (AMES, 1983)

1- São auxotróficas em relação à histidina;

2- Possuem diversas mutações operon de histidina, as quais são alvos para mutação reversa;

25 3- Detectam diversos agentes mutagênicos que causam deslocamento no quadro de leitura do DNA, os quais restauram o quadro de leitura correto para síntese de histidina;

4 – Mutação no gene *hisG46*, esta no quadro de leitura do gene *hisG*, o qual codifica a primeira enzima para a síntese de histidina, específica da TA 100;

30 5-Mutação no gene *hisD3052*, constituído de 8 resíduos repetidos de -GC-, próximo ao local da mutação de deslocamento no quadro de leitura do gene *hisD*, o qual codifica a enzima histidinol desidrogenase, específica da TA 98;

6 – Mutação (*rfa*), que gera perda parcial da barreira lipopolissacarídica, aumentando a permeabilidade da parede celular bacteriana, facilitando a difusão de grandes moléculas para o interior da célula;

5 7- Mutação (*urvB*), que provoca dano no sistema de reparo por excisão, resultando no aumento da sensibilidade na detecção de diversos agentes mutagênicos. Fazendo também, com que a bactéria torne-se dependente de biotina para crescer;

8 – Plasmídeo pKM101, o qual favorece a resistência a ampicilina, assim como, aumenta a mutagênese espontânea e química, por estímulo ao sistema de reparo do DNA error-prone.

#### 10 Manutenção e estoque das linhagens

As cepas de *Salmonella typhimurium* estão armazenadas em freezer a -80°C, em frascos para congelamento com 0,9 mL de cultura e 0,1 mL de DMSO como agente crioprotetor, para que se mantenham inalteradas todas suas características genéticas.

15 Antes do congelamento todas as linhagens tiveram seus genótipos confirmados (auxotrofia para histidina, mutação *rfa*, plasmídeo pKM101, deleção *uvrB* e taxa de reversão espontânea).

Preparo dos meios de cultura e soluções

Meio Vogel Bonner E (VB)

20 Dissolveu-se 0,25 g de sulfato de magnésio, 2,5g de ácido cítrico, 12,5g de fosfato de potássio dibásico e 4,375g de fosfato de sódio e amônio em 16,75 mL de água destilada a 45°C (quantidades suficientes para 25 mL de solução VB). A solução foi esterelizada em autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Glicose 40%

25 Preparou-se 50 mL de uma solução de glicose 40%, que foi esterelizada em autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Ágar mínimo glicosado (AMG)

Dissolveu-se 7,5g de ágar em 465 mL de água destilada, em seguida esterelizou-se a solução em autoclave durante 15 minutos a 121°C.

30 Posteriormente adiciona-se em fluxo laminar estéril, 10 mL de VB e 25 mL de glicose 40%.

Top ágar ou ágar de superfície

Dissolveu-se 0,5 g de cloreto de sódio e 0,6g de ágar em 100 mL água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Solução biotina/histidina 0,05 mM (10 mL/100 mL de top ágar)

5 Dissolveu-se 0,00123g de biotina e 0,00096g de histidina em 10 mL de água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Caldo Nutriente Oxoid n.2.

Dissolveu-se 0,75g de meio Oxoid em 30 mL de água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Controles positivos e negativos

10 O controle negativo, é o solvente utilizado para dissolver a amostra, utilizando-se como volume padrão, o maior volume da amostra testada 100 µL, que também é a quantidade necessária para dissolver a concentração máxima utilizada do fármaco.

Os controles positivos são compostos mutagênicos específicos para cada cepa e condição do ensaio, sendo 25 µL/placa azida sódica (1,25 µg/placa) e 100 µL de mitomicina (0,5 µg/placa) os controles para a TA100 e TA102, respectivamente, na ausência de ativação metabólica. Para os ensaios com ativação metabólica o controle positivo para a TA100 é 50µL 2-antramina (1,25µg/placa) e o para TA102 é 50µL 2-aminofluoreno (1,25µg/placa).

Procedimento do ensaio sem o sistema de ativação metabólica (-S9)

20 Utilizou-se o método de pré-incubação.

1º dia

Preparam-se todas as soluções e meios de cultura anteriormente descritos. Em fluxo laminar, foi adicionado ao material estéril (AMG) 10 mL de solução de VB e 25 mL de solução de glicose a 40% (previamente preparadas), homogeneizou-se, e distribuiu-se cerca de 25 mL de AMG em cada placa.

O AMG distribuído nas placas foi deixado em repouso por 48 horas em estufa a 37°C para posterior utilização.

2º dia

30 Em fluxo laminar, as cepas de Salmonella typhimurium (TA100 e TA 102) foram inoculadas separadamente com alça de platina, nos respectivos caldos nutrientes e mantidas a 37°C, sob agitação constante (160 rpm) durante 14 horas, de modo a se obter uma densidade de 1 a  $2 \times 10^9$  bactérias/mL.

3º dia

Diferentes concentrações dos compostos foram adicionadas a 100 µL da cultura de bactérias e 100 µL de tampão fosfato 0,2M pH 7,4 (ou 500 µL da mistura S9 em ensaios de ativação metabólica) e incubados por 20-30 minutos a 37°C. As soluções contendo os compostos tinham DMSO como solvente. Após esse tempo, adicionou-se 2 mL de agar superfície ("top ágar") suplementado com trações de histidina e biotina, homogeneizou-se levemente e plaqueou-se em meio mínimo glicosado. Após solidificação do "top ágar", as placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C. Após esse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. Todas as concentrações testadas, controles positivos e negativos foram realizados em triplicatas.

5º dia

Após 48 horas, foi realizada a contagem manual das colônias revertentes, para o controle positivo utilizou-se o sistema protoCOL Colony Counter Version 3.15.630 (1998-2001) SYNBIOSIS LTD.

15 Avaliação e interpretação dos resultados

Os dados finais obtidos do ensaio foram analisados utilizando-se o programa estatístico Salanal (Salmonella Assay Analysis) versão 1.0 do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA. Tal programa permite avaliar o efeito dose-resposta por meio de cálculos 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, L. e col. **Mutat. Res.** v. 97, p. 267-281, 1982.). A inclinação da reta da parte linear da curva dose-resposta é também fornecida por esse programa e corresponde ao número de revertentes induzidos por unidade de medida da amostra analisada.

A partir dos resultados foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose analisada de cada composto. A RM é dada pela seguinte equação:

$$RM = \frac{\text{média nº revertentes por placa teste (espontâneos + induzidos)}}{\text{média nº revertentes por placa do controle negativo (espontâneos)}}$$

30 O crescimento espontâneo significa que o número de revertentes que desenvolveram na placa, independente de serem ou não induzidos, onde considera-se como resposta positiva valores maiores ou iguais a 2 (VALENT, G.V. e col. **Env. Toxicol. Water Quality.** v.8, p.371-381, 1993.).

### Procedimento do ensaio com sistema de ativação metabólica (+S9)

O teste de mutagenicidade com sistema de ativação metabólica é realizado com fração microsomal S9 (S9 mix) preparadas a partir do homogeneizado de fígado de ratos Sprague Dawley, previamente tratados com Aroclor 1254, adquiridos sob a forma liofilizada.

São preparados 50 mL de S9 mix utilizando-se as seguintes soluções mostradas na Tabela 7 a seguir:

Tabela 7 – Soluções utilizadas para a preparação de S9 mix.

Água estéril	19,75 mL
Tampão fosfato 0,2M	25 mL
NADP 0,1M	2 mL (freezer)
G-6-P 1M	250µL (geladeira)
MgCl 0,4M	500 µL (geladeira)
KCl 1,65M	500 µL
Fração S9	Dissolvida em 2 mL de água miliQ estéril

10 O procedimento para este ensaio é o mesmo, no entanto, ao invés do tampão, deve adicionar 500 µL da mistura S9.

A mistura S9 tem viabilidade de 4 horas a partir do preparo quando mantida em gelo. As placas são então incubadas por 48 horas a 37°C. Transcorrido o tempo necessário foi efetuada a contagem das colônias revertentes. Todas as concentrações testadas, controles positivo e negativo foram realizados em triplicatas.

### Procedimentos para o ensaio em cultura de células K562

Foi usada a linhagem celular de leucemia humana K562 ATCC (American Type Culture Collection), Filadélfia, PA, EUA. As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, USA) contendo 10 % de soro bovino fetal e glutamina. As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera com 5 % de CO<sub>2</sub>. Para os experimentos as células foram incubadas na densidade de 1 x 10<sup>5</sup> células/mL. Para realização da cultura com hemina (30µM), esta foi adicionada 72 horas antes do início do experimento com o composto desejado.

O tempo de 0 hora consistiu na retirada de células K562 não tratadas. A partir desse ponto, foi adicionado os respectivos compostos nas concentrações desejadas (5, 30, 60 e 100uM), as células foram então mantidas por 7 dias em cultura, sem nova adição de composto ou substituição de meio de cultura. Foram realizadas coletas de células nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas. A morfologia das células foi analisada nestes pontos através de lâminas de cito-spin coradas com Leishman e a viabilidade celular foi realizada através da coloração com azul de trypan em câmara de Neubauer.

#### Extração de RNA

Para obtenção do RNA de K562 foi utilizado o método de extração com o reagente TRIzol (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) de acordo com as instruções do fabricante. A amostra contendo K562 e TRIzol foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, a fim de que houvesse completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos, 200 µL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) foi adicionado e agitado vigorosamente sendo realizada nova incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 15 minutos a 19.000g em temperatura de 4°C, o sobrenadante foi retirado e acondicionado em outro tubo, procedendo imediatamente para a etapa de precipitação com 500 µL de isopropanol gelado. Após homogeneização, foi realizada nova incubação por 10 minutos em temperatura ambiente seguida de centrifugação por 10 minutos a 19.000g à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado adicionou-se 800 µL de etanol gelado a 70%, sendo realizada nova centrifugação por 5 minutos a 14.000g à 4°C. Finalmente, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado de RNA colocado para secar por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo então ressuspendido em água estéril contendo dietilpirocarbonato (DEPC) e incubado a 55°C por 10 minutos e posteriormente colocado em gelo para solubilização total do RNA.

A integridade da amostra foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose à 1,2%. As amostras com qualidade adequada de RNA apresentavam íntegras as duas subunidades ribossomais: 18S e 28S. Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80°C.

#### Síntese de DNA complementar (cDNA)

As amostras de RNA obtidas, foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit Superscript III RTTM (Invitrogen, Life Technologies). Após leitura em espectrofotômetro (Gene Quant-Pharmacia, USA) e quantificação, 3 µg de RNA foram tratados com a enzima DNase I (Invitrogen, Life Technologies), para remoção de DNA contaminante. Foi adicionado 1,0 µL de 1 u/µL DNase I, 1,0 µL de 10x DNase I

Reaction Buffer (200 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl<sub>2</sub>) e água suficiente para um volume final de 10,0 µL de reação. A reação foi realizada por 15 minutos a temperatura ambiente e paralisada com 1,0 µL de 25 mM EDTA, e incubado por 10 minutos a 65°C.

5            Para a síntese do cDNA adicionou-se a seguir 1,0 µL de 50 µM oligo (dT) 20 e 1,0 µL de 10 mM dNTP's. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65°C, seguidos por 1 minuto a 4°C. A cada amostra adicionou-se 10,0 µL da seguinte mistura de reação: 2 µL de 10x RT buffer, 4,0 µL de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,0 µL de 0,1 M DTT, 1,0 µL de 40 U/µL RNase OUTTM e 1,0 µL de 200 U/µL Superscript III RTTM. A reação ocorreu por 50  
10 minutos a 50°C, seguido de 5 minutos a 85°C. A seguir, foi adicionado 1,0 µL de 2 U/µL E. coli RNase H por 20 minutos a 37°C.

#### Verificação da síntese de DNA complementar

A verificação da síntese de cDNA foi feita por meio de PCR para amplificação do gene da beta-actina (BAC). Realizou-se as reações com: 5,0 µL de 10x PCR buffer (20  
15 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 1,5 µL de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0 µL de 10 mM dNTP's, 1,0 µL de 10 mM de primer BACF (5'- AAGAGATGGCCACGGCTGCT - 3'), 1,0 µL de 10 mM de primer BACR (5'- TCGCTCCAACCGACTGCTGT - 3'), 0,5 µL de Taq DNA polimerase, 1,0 µL de cDNA e 39 µL de água, para um volume final de 50 µL. O programa foi iniciado por 2 minutos à 94°C, seguido de 35 ciclos: 94°C/ 30 segundos - 58°C/ 45 segundos -  
20 72°C/ 40 segundos, sendo finalizado por 72°C/ 7 minutos. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 1% para verificação da ampliação de 640pb.

#### Desenho dos Primers para a reação do PCR quantitativo em tempo real

Os primers utilizados nas reações do PCR Quantitativo em Tempo Real, foram desenhados com o software "Primer Express" (Applied Biosystems), analisados no  
25 programa Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) para verificação das condições de formação de estruturas como hairpins e dimers.

#### Padronizações necessárias para o PCR quantitativo em tempo real

##### Concentração de Primer

30 A concentração ótima de primer a ser utilizada na PCR quantitativa em tempo real, deve ser mínima o suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do gene presentes na amostra. Utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos primers (sense e anti-sense) na concentração final de 150nM, 300nM, 600nM e 900nM. O ciclo no qual se detecta fluorescência acima do limite basal

estabelecido (threshold) é denominado ciclo de threshold ou Ct. Considerando que se utilizou a mesma quantidade de amostra em todas as reações, o Ct não deveria variar. Se o aumento da concentração de primer ocasionou diminuição de Ct, então a quantidade deste reagente na reação ainda era insuficiente. Assim, a concentração ótima escolhida foi a mínima, associada ao menor Ct.

A seqüência e tamanho dos fragmentos amplificados de cada par de primer utilizado na amplificação dos genes estudados na técnica de PCR quantitativo em tempo real é mostrada na tabela 8.

Tabela 8 - Seqüência e tamanho dos fragmentos amplificados

Gene	Seqüência Primer	Tamanho do fragmento amplificado
Gama-Glob - F	5'- CCAGCTGAGTGAAGTCACTGT - 3'	81 pb
Gama-Glob - R	5'- ACGGTCACCAGCACATTTCC - 3'	
$\beta$ - actina - F	5'- AGGCCAACCGCGAGAAG - 3'	79 pb
$\beta$ - actina - R	5'-ACAGCCTGGATAGCAACGTACA- 3'	
GAPDH - F	5'- GCACCGTCAAGGCTGAGAAC - 3'	89 pb
GAPDH - R	5'- CCACTTGATTTGGAGGGATCT -3'	

As concentrações de primers utilizadas na amplificação dos genes de estudo e eficiência de amplificação obtida é mostrada na Tabela 9. As concentrações foram definidas pela eficiência de amplificação gerada nas condições testadas.

Tabela 9 – Concentrações de primers

Primer	Concentração utilizada	Eficiência do primer
Gama-glob	150nM	100%
$\beta$ - actina	300nM	100%
GAPDH	300nM	100%

#### 15 Eficiência de Reação

Para que a reação de PCR em tempo real seja confiável e reprodutivas são necessárias condições ótimas de reação, ou seja, que as amplificações apresentem 100% de eficiência de amplificação a cada ciclo, ocorrendo duplicação da amostra. A eficiência de amplificação é obtida da fórmula  $10^{-1/\text{slope}}$ , onde slope significa o valor da inclinação da curva. A otimização acontece utilizando a concentração ótima de primer com 7 quantidades conhecidas de amostra, em escala logarítmica: 2ng (2x100), 6,32ng

(2x100,5), 20ng (2x101), 63,2ng (2x101,5), 120ng, 200ng (2x102) e 632ng (2x102,5). Os resultados são utilizados para construção de uma curva padrão Ct versus quantidade de amostra.

#### PCR quantitativo em tempo real – “Real Time PCR”

5 Após leitura em espectrofotômetro (Gene Quant-Pharmacia, USA) e quantificação, alíquotas de cDNA foram utilizadas como molde em reações de PCR quantitativa em tempo real. A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR, através da ligação de uma sonda específica ou um corante, na fita recém sintetizada.

10 As reações, feitas sempre em duplicata, foram realizadas utilizando o reagente SYBERGreen PCR Master Mix® (Applied Biosystems), que além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTP's, MgCL2, tampão, Taq Ampli-Gold), contém o corante SYBERGreen, componente intercalante de dupla fita necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo. Além disso, utiliza-se amostras de cDNA e primers específicos para o gene analisado.

15 A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System® (Applied Biosystems) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. Quanto maior a expressão de um gene, ou seja, quanto mais cópias existirem no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e, consequentemente, menor é o Ct.

25 As reações realizadas continham 12,5 µL do reagente SYBERGreen PCR Master Mix®, 25 ng de amostra de cDNA e a concentração ótima de primer determinada, perfazendo um volume final de 25 µL. Em todos os casos foram feitos controles negativos, contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa foi iniciado por 95°C/ 10 minutos, seguido de 45 ciclos: 95°C/ 15 segundos – 60°C/ 1 minuto. Ao final de uma amplificação normal adiciona-se um passo de degradação durante o qual a temperatura aumenta gradualmente de 60°C para 95°C. À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento da temperatura, cai o sinal fluorescente do SYBR Green. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de TM (melting temperature) entre os produtos de PCR amplificados, essa diferença é causada pelo número e composição de bases de cada produto.

### Análise dos dados do real time

A expressão dos genes de interesse foram determinadas de uma forma relativa, sendo normalizadas com relação a genes chamados calibradores, neste estudo foram utilizados a  $\beta$ -actina e o GAPDH, que são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições. No entanto, alguns trabalhos vêm demonstrando que a expressão desses genes pode variar consideravelmente. Dos valores de Ct obtidos, foi calculada média aritmética das duplicatas do Ct. A seguir foi obtida a quantidade de expressão (Q), por meio da fórmula  $Q = E^{\Delta Ct}$ , onde E = eficiência de reação e  $\Delta Ct = \text{menor Ct observado} - \text{Ct da amostra}$ . Desta forma a expressão foi relacionada à amostra que apresentou maior expressão (Menor Ct observado), que recebeu valor  $Q = 1$ . Os valores de Q dos genes calibradores de cada amostra foram submetidos ao programa Gnorm, que calcula a média geométrica entre eles, valor este denominado Fator de Normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra é dada pela razão entre o valor Q do gene de interesse da amostra e Fator de Normalização a amostra. O dado obtido é expresso em unidades arbitrárias ou valor absoluto de expressão.

### Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O perfil da antinociceptivo foi avaliado através do ensaio de contorções abdominais induzidos por ácido acético em camundongos. Neste ensaio utilizou-se camundongos suíços de ambos os sexos pesando entre 21 e 28 gramas, mantidos em jejum por um período de aproximadamente 8 horas. A substância-teste foi administrada por via oral e tinham como veículo a goma arábica 5%. Uma hora após, foi feita a administração de ácido acético 0,1N (0,1 mL/10g de peso) na cavidade peritoneal dos animais. Dez minutos após a injeção do ácido acético, as contorções foram contadas durante 20 minutos. Foram feitos controles do veículo (goma arábica) e este não apresenta atividade farmacológica.

### Edema de orelha de camundongo induzido por capsaicina

O ensaio foi realizado utilizando camundongos suíços de ambos os sexos pesando entre 18 e 30 gramas. Os animais foram mantidos em jejum por 8 horas e com livre acesso a água. Este ensaio consiste na administração local (orelha direita) de 20 $\mu$ l de uma solução de capsaicina (250  $\mu$ g/orelha) diluído em acetona, 1 hora após a administração por via i.p (diluído em goma arábica 0,5%). A orelha esquerda (controle) recebia o veículo no qual era diluído a capsaicina (acetona) e a direita a capsaicina. O

ensaio é caracterizado por uma resposta inflamatória aguda da orelha, com desenvolvimento de edema. Os animais foram sacrificados e suas orelhas pesadas para obtenção do índice de inflamação. Foi realizada uma biópsia da orelha de 8 mm de diâmetro. Em seguida os pesos das orelhas inflamadas foram comparados com os pesos da orelha contra-lateral (orelha controle) que não foram tratadas com o agente flogístico. A porcentagem de inibição do edema era calculado por subtração da orelha tratada com veículo da tratada com capsaicina de cada grupo de animais tratados com as substâncias testes, e então era dividido pela diferença entre os grupos dos agentes irritantes e dos grupos controles. O resultado era subtraído de 1 e multiplicado por 100 sendo mostrado na Tabela 4.

#### Ensaio de peritonite

Os camundongos foram tratados com as substâncias em análise ou veículo e após 1h de administração oral foram submetidos simultaneamente ao ensaio de peritonite, por administração i.p de 1 ml de uma solução de tioglicolato a 3%. Após 4 da injeção de tioglicolato, a cavidade peritoneal foi lavada com 3 ml de uma solução HANKS (Solução de salina balanceada, livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ). Em seguida foi analisado o lavado peritoneal e foi feita a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer em microscópio ótico em objetiva de 40x. Os resultados são mostrados na Tabela 5.

#### Análise Estatística

Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram feitos utilizando-se o Teste *T* de Student. Os valores foram considerados significativos quando  $*P < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, conforme indicado nas legendas das figuras.

#### Ensaio de citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo

A determinação da viabilidade celular (Figura 5) foi realizado através da suspensão de macrófagos peritoneais em solução de RPMI, ajustados a uma concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  em cada cavidade de placas para cultivo de tecidos de 96 cavidades, sendo incubado com os fármacos e pró-fármacos nas concentrações de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  mM durante 24 horas à  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível a 540 nm com filtro de referência a 620 nm (Microplate Reader-Model 550-BIORAD).

#### Obtenção e cultura das células do exsudato peritoneal:

Camundongos foram previamente inoculados com 3,0 mL de tioglicolato 3% pela via intraperitoneal com a finalidade de estimular os macrófagos desta cavidade. Após 3 dias de estímulo, os animais foram sacrificados e os macrófagos peritoneais coletados.

5 As células foram então lavadas de 2 a 3 vezes por centrifugação a 358 g (Centrífuga Fanem Excelsa II 206MP) durante 5 minutos em PBS estéril e, em seguida, ressuspensas em 1 mL de RPMI-1640 para contagem em câmara de Neubauer. Após a contagem, ajustou-se a concentração em  $5 \times 10^6$  células/ml e as mesmas foram

10 distribuídas em placas descartáveis estéreis de 96 cavidades. As placas contendo então a concentração adequada das células foram levadas à incubação por 24 horas em estufa a 37°C, contendo 95 % de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> na presença dos antiinflamatórios e dos derivados de taurina nas respectivas concentrações:  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-4}$  mM ou mesmo na presença de apenas meio RPMI-1640. O LPS foi utilizado como controle

15 positivo e o meio RPMI-1640 como controle de células. Os sobrenadantes das culturas foram, ao final do período de incubação, coletados para determinação dos níveis de óxido nítrico nos mesmos. O RPMI-1640 utilizado durante todo esse processo foi

suplementado com *L*-glutamina a 2 mM, penicilina (100U/ml), estreptomicina (100 ug/ml), 5% de soro fetal bovino e 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-2}$ M (RPMI-1640-C).

#### Dosagem de óxido nítrico

20 Após obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos, como descrito anteriormente, avaliou-se a concentração de óxido nítrico. Esta avaliação foi feita medindo-se a concentração de nitrito acumulado (produto estável de degradação do

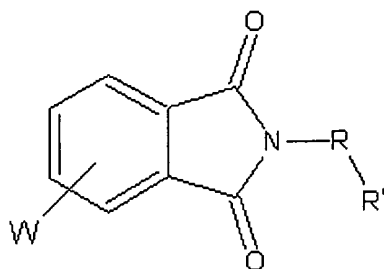
óxido nítrico) através da reação de diazotização com o reagente de Griess (sulfanilamida 1 %, dicloridrato de naftilenodiamina 0,1 %, em 5 % de ácido fosfórico), conforme o método

25 de Green et al. (1982). Para tal, 50 µl do sobrenadante de cultura foi incubado com igual volume de reagente de Griess à temperatura ambiente (10 minutos) e, em seguida, as absorbâncias foram medidas a 550 nm em leitor de ELISA (Microplate Reader-Model 550-BIORAD). As concentrações de nitrito foram obtidas a partir de uma curva padrão

30 previamente preparada com concentrações molares conhecidas de NaNO<sub>2</sub>. Os testes foram feitos em triplicata e os valores expressos em micromol de NO<sup>2</sup>/5x10<sup>5</sup> células. Os resultados são mostrados na Figura 6.

## Reivindicações

1 - Uso de um composto de fórmula geral (I)



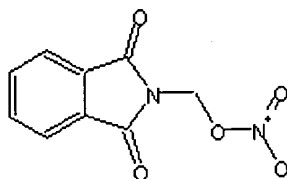
5

(I)

Onde:

W= H, halogênio, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, OH, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alcoxi, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> haloalcoxi, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> haloalquila;  
 R corresponde a C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> alquila, 2-fenila, 3-fenila, 4-fenila, 2-benzila, 3-benzila, 4-benzila,  
 2-etilbenzila, 3-etilbenzila, 4-etilbenzila benzila, tiofeno, furano, pirrol, 2-piridina, 3-piridina,  
 10 4-piridina, pirazina, pirimidina, benzotiofeno, benzofurano, indol, quinolina, isoquinolina,  
 naftaleno, CH<sub>2</sub>-2-tiofeno, CH<sub>2</sub>-3-tiofeno, CH<sub>2</sub>-2-furano, CH<sub>2</sub>-3-furano, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-2-tiofeno,  
 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-3-tiofeno, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-2-furano, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-3-furano; R' corresponde a O-NO<sub>2</sub> ou  
 SO<sub>2</sub>NHOH ou furoxano ou de um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo,  
 15 que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF-α e a necessidade de uma  
 fonte exógena de óxido nítrico.

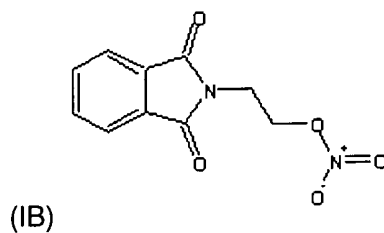
2 – Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do composto ser de fórmula (IA)



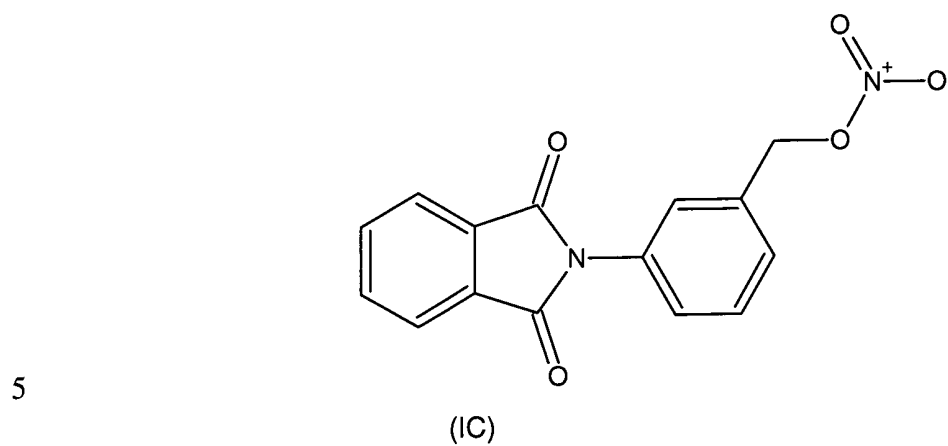
20

(IA)

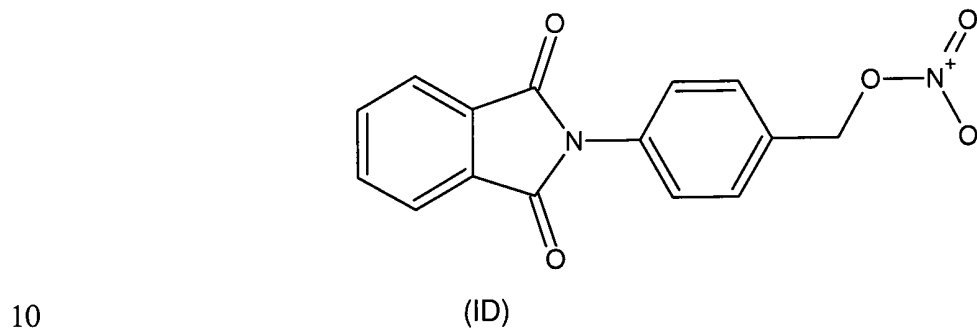
3 – Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do composto ser de fórmula (IB)



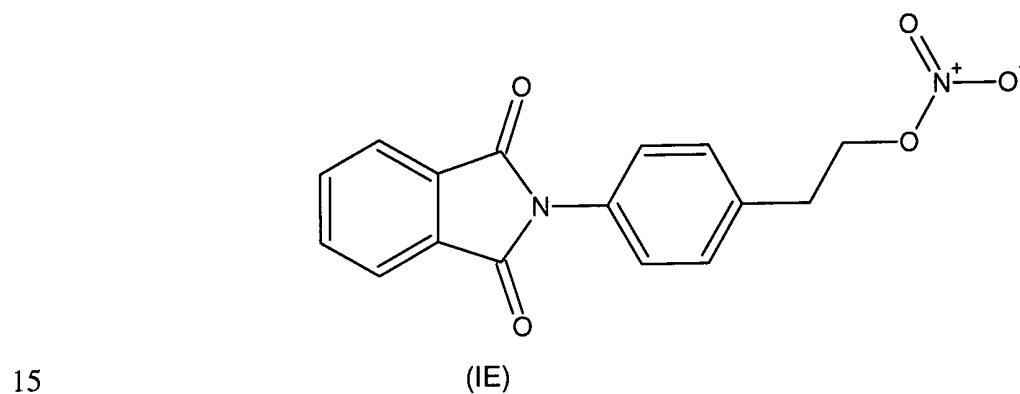
4 – Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do composto ser de fórmula (IC)



5 – Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do composto ser de fórmula (ID)



6 – Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do composto ser de fórmula (IE)



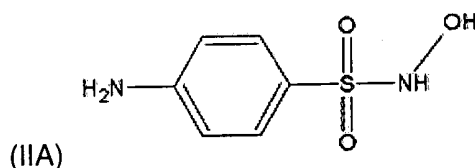
## 7 - Uso de um composto de fórmula geral (II)



5 onde W= H, halogênio, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, OH, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alcoxi, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> haloalcoxi, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> haloalquila ,  
 R<sub>1</sub> corresponde 2-fenila ,3 fenila, 4-fenila, 2-benzila, 3-benzila, 4-benzila, 2-etilbenzila, 3-  
 etilbenzila ,4-etilbenzila, benzila, tiofeno, furano, pirrol, 2-piridina, 3-piridina, 4-piridina,  
 pirazina, pirimidina, benzotiofeno, benzofurano, indol, quinolina, isoquinolina, naftaleno,  
 CH<sub>2</sub>-2-tiofeno, CH<sub>2</sub>-3-tiofeno, CH<sub>2</sub>-2-furano, CH<sub>2</sub>-3-furano, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-2-tiofeno, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-3-  
 10 tiofeno, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-2-furano, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-3-furano, R<sub>2</sub> corresponde a OH, H, C(=O)NHOH,  
 C(=S)NHOH, C(=O)NOH (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); ou de um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo,  
 caracterizado por ser na preparação de um medicamento para tratamento de doenças em  
 que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF-α e a necessidade de uma  
 fonte exógena de óxido nítrico.

15

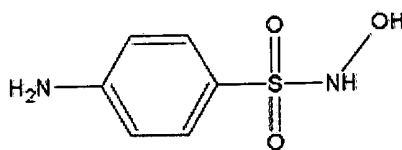
8 – Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato do composto ser  
 de fórmula (IIA)



20 9 – Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo  
 fato de ser para o tratamento de anemia falciforme.

10 – Composição farmacêutica para tratamento de doenças em que há a  
 necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF-α e a necessidade de uma fonte  
 exógena de óxido nítrico caracterizada pelo fato de que compreende composto definido  
 em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 ou uma combinação dos mesmos em um  
 25 veículo farmacêuticamente aceitável.

11 – Método de obtenção do composto de fórmula (IIA)



(IIA)

30

Caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

- a) mistura, em recipiente apropriado, de cloridrato de hidroxilamina, bicarbonato de sódio e água;
- b) adição de etanol à mistura obtida na etapa a;
- c) adição do cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il) benzenosulfonil à mistura obtida na etapa b.

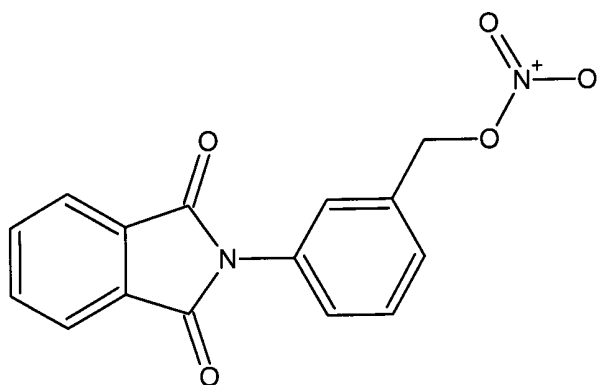
5

12 – Método de obtenção de acordo com reivindicação 11 caracterizado pelo fato de que a adição de etanol na etapa b) ocorre somente após a eliminação de  $\text{CO}_2$  liberado na etapa a)

13 - Método de obtenção de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 e 12 caracterizado pelo fato de que após a etapa c), o solvente é evaporado e o produto obtido lavado com diclorometano a quente.

10

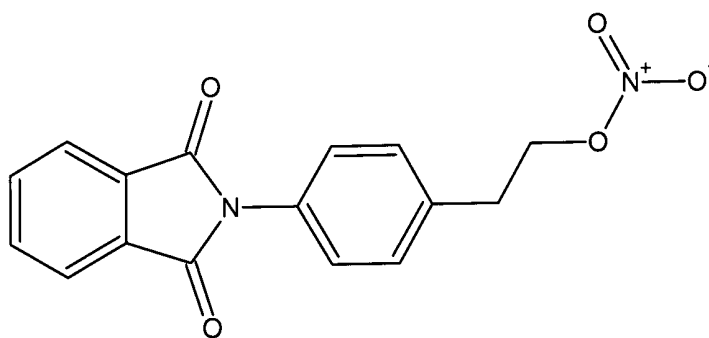
14 – Composto caracterizado pelo fato de ser de fórmula (IC) :



(IC)

15

15– Composto caracterizado pelo fato de ser de fórmula :



(IE)

20

25

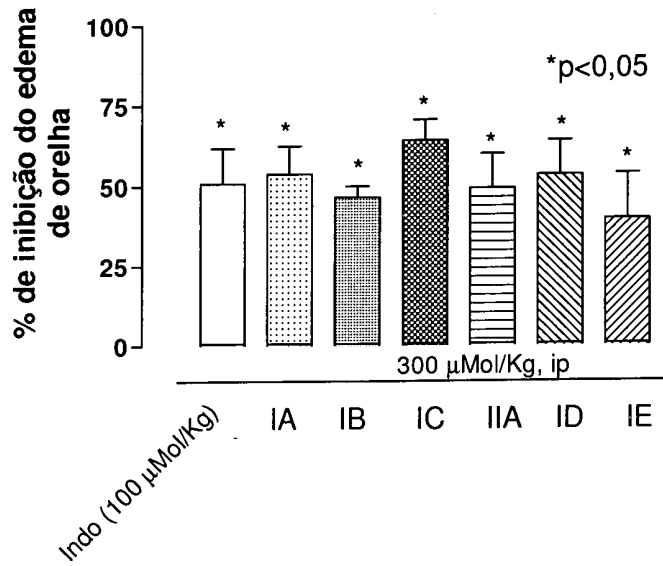


Figura 1

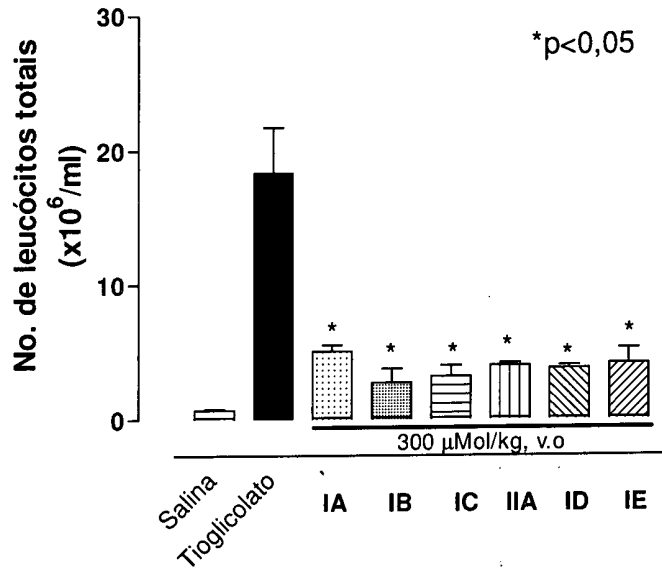


Figura 2

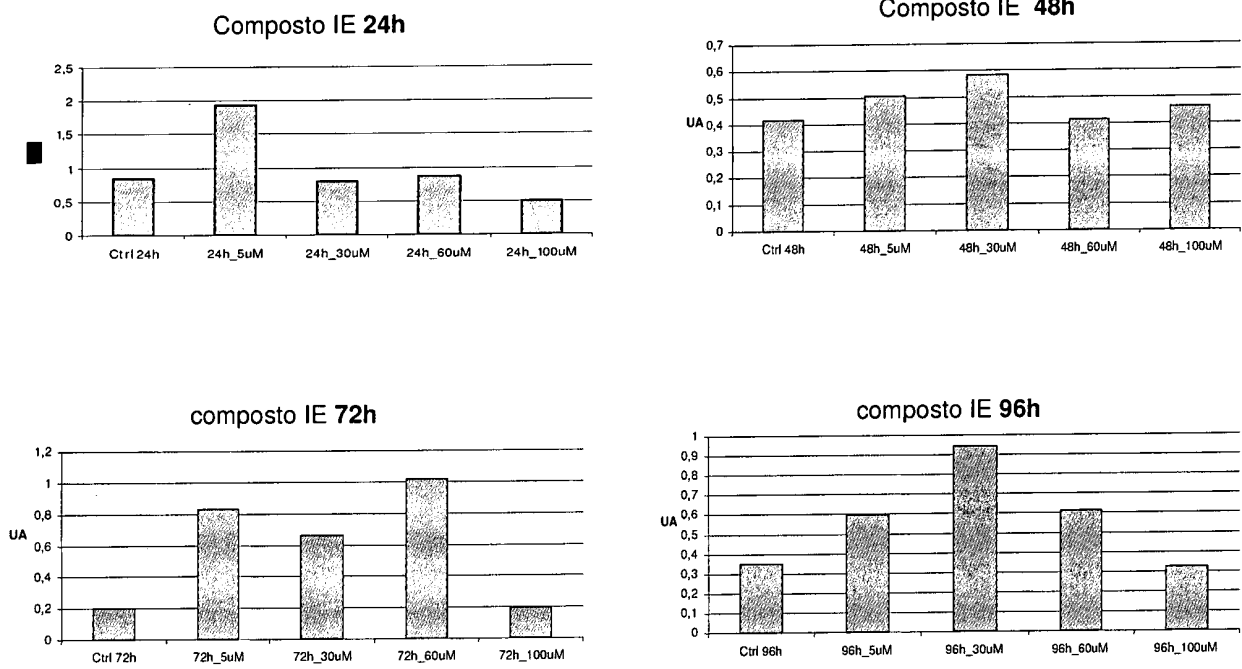


Figura 3

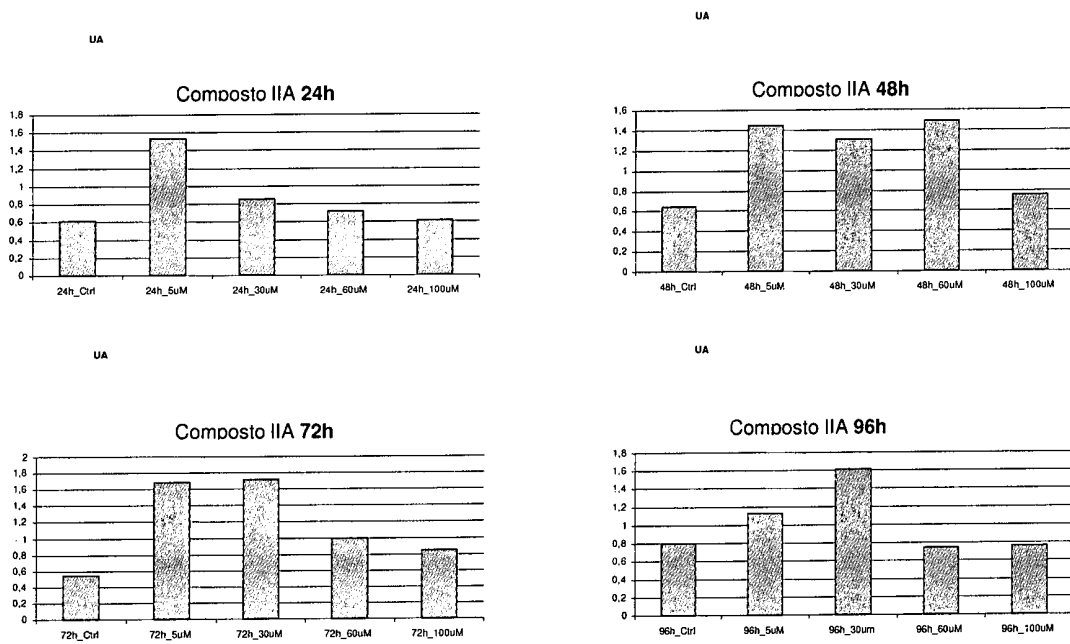


Figura 04

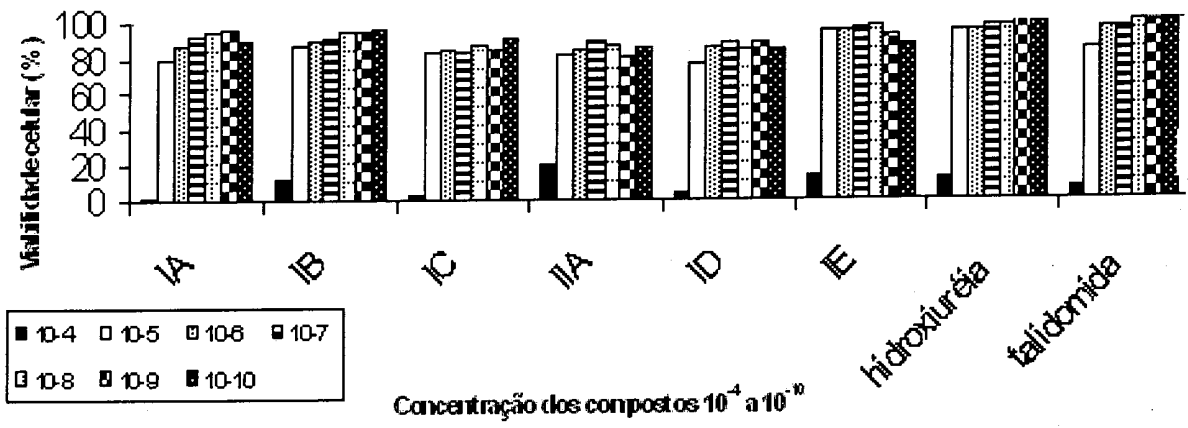


Figura 05

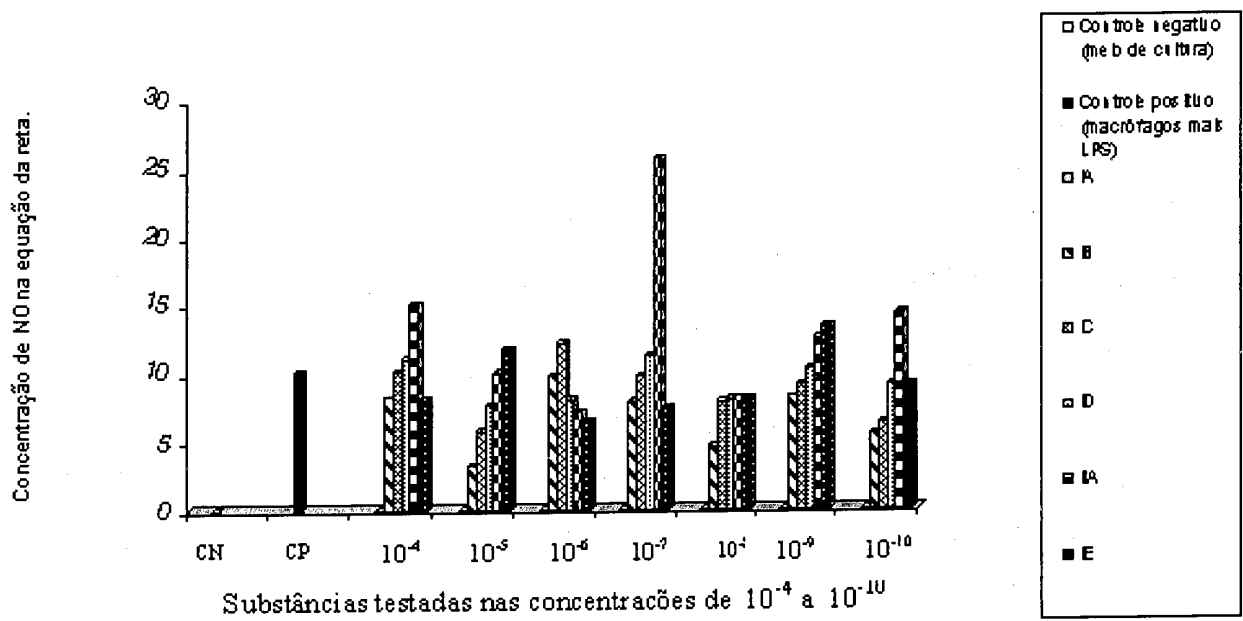


Figura 06

Resumo

PI07 05396-7

Patente de Invenção para "USO DE COMPOSTOS DERIVADOS FTALIMÍDICOS  
5 E/OU SULFONAMÍDICOS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS EM QUE HÁ A  
NECESSIDADE DE DIMINUIÇÃO DOS NÍVEIS DO FATOR TNF- $\alpha$  E A NECESSIDADE  
DE UMA FONTE EXÓGENA DE ÓXIDO NÍTRICO, COMPOSTOS DERIVADOS  
FTALIMÍDICOS, COMPOSTOS DERIVADOS SULFONAMÍDICOS, MÉTODO DE  
OBTENÇÃO DE UM COMPOSTO DERIVADO SULFONAMÍDICO"

10 A presente invenção se refere ao uso de compostos derivados ftalimídicos e/ou  
sulfonamídicos com propriedades doadoras de óxido nítrico, os quais apresentam  
importantes atividades no aumento da expressão gênica de gama globina e atividades  
antiinflamatórias e analgésicas, potenciais ao tratamento de doenças hematológicas em  
que há a necessidade de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma  
15 fonte exógena de óxido nítrico. Mais particularmente, a presente invenção descreve o uso  
de tais derivados ftalimídicos e/ou sulfonamídicos para o tratamento de anemia  
falciforme. A invenção também apresenta como característica inovadora, a descrição de  
novos derivados ftalimídicos funcionalizados, desenhados a partir dos protótipos  
talidomida e hidroxiuréia e planejados racionalmente através da estratégia de hibridação  
20 molecular para o tratamento das doenças citadas. A invenção apresenta ainda um novo  
método de obtenção de um derivado sulfonamídico específico que pode ser utilizado na  
preparação de um medicamento para tratamento de doenças em que há a necessidade  
de diminuição dos níveis do fator TNF- $\alpha$  e a necessidade de uma fonte exógena de óxido  
nítrico.

25

30

35

40