

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

(21) BR 10 2013 026253-6 A2



(22) Data de Depósito: 11/10/2013

(43) Data da Publicação: 04/08/2015
(RPI 2326)

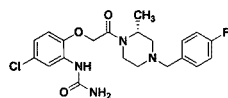
(54) Título: USO DE NOVOS DERIVADOS N-(((ARILPIPERIDIN-4-ILIDENO)HIDRAZINIL)OXOALQUIL)ARILSULFONAMÍDICOS COMO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTI-ASMÁTICOS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS MESMOS E PROCESSOS DE PREPARAÇÃO

(51) Int.Cl.: C07D211/72; C07D307/77; A61K31/443; A61K31/36; A61P29/00; A61P11/06

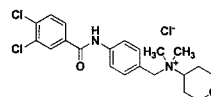
(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

(72) Inventor(es): CARLOS ALBERTO MANSSOUR FRAGA, ELIEZER JESUS DE LACERDA BARREIRO, MARCO AURÉLIO MARTINS, NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JÚNIOR

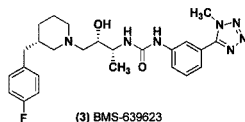
(57) Resumo: USO DE NOVOS DERIVADOS N-(((ARILPIPERIDIN-4-ILIDENO)HIDRAZINIL)OXOALQUIL)ARILSULFONAMÍDICOS COMO ANTI INFLAMATÓRIOS E ANTI-ASMÁTICOS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS MESMOS E PROCESSOS DE PREPARAÇÃO. São descritos novos derivados heterocíclicos, contendo a subunidade apresentando a subunidade N-(((arilpiperidin-4-ilideno) hidrazinil)oxoalquil)arilsulfonamida, que apresentam perfis de atividade anti-inflamatório e antiasmático, in vitro e in vivo, sobre a inibição da migração de leucócitos envolvendo neutrófilos e eosinófilos, sendo portanto úteis no tratamento da resposta inflamatória envolvida na asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e rinite alérgica. Também são descritas composições farmacêuticas contendo os referidos compostos e processos para sua preparação.



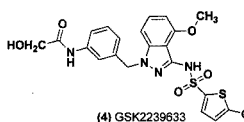
(1) BX471
 K_i (CCR1) = 1 nM
Fase II (esclerose múltipla)
Sem eficácia



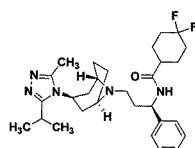
(2) JNJ-17168864
 IC_{50} (CCR2) = 20 nM
Fase II (rinite alérgica)
Sem eficácia



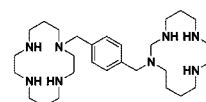
(3) BMS-639623
 IC_{50} (CCR3) = 0,3 nM
Fase I (asma)
Em andamento



(4) GSK2239633
 K_i (CCR4) = 10 nM
Fase I (asma)
Em andamento



(5) Maraviroc
 IC_{50} (CCR5) = 3 nM
Fármaco registrado
(AIDS)



(6) Plerixafor
 IC_{50} (CXCR4) = 74 nM
Fármaco registrado
(mieloma múltiplo / linfoma não-Hodgkin)

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

USO DE NOVOS DERIVADOS N-(((ARILPIPERIDIN-4-ILIDENO)HIDRAZINIL)OXOALQUIL)ARILSULFONAMÍDICOS COMO ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANTI-ASMÁTICOS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS 5 CONTENDO OS MESMOS E PROCESSOS DE PREPARAÇÃO

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção é relacionada a derivados heterocíclicos
10 apresentando a subunidade N-(((arilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)oxoalquil)arilsulfonamida. Mais particularmente, a presente invenção relaciona-se com derivados (S)-1-(benzo[d][1,3]dioxo-5-ilsulfonil)-N'-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)pirrolidino-2-carboidrazídicos, substituídos ou não, e seus isósteros clássicos e não-clássicos, a um processo para sua preparação,
15 a composições farmacêuticas contendo os mesmos e a seu uso como agentes terapêuticos anti-inflamatórios e antiasmáticos, particularmente no tratamento de doenças inflamatórias crônicas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

20 As quimiocinas são pequenas proteínas homologas (8-15 kDa) que, através da interação com receptores cognatos, controlam o tráfego celular em condições fisiológicas (Koelink, P. J.; Overbeek, S. A.; Braber, S. et al. *Pharmacol. Ther.* **2012**, 133, 1.; White, G. E.; Iqbal, A. J.; Greaves, D. R. *Pharmacol. Rev.* **2013**, 65, 47.), e.g. homeostase, imunidade adaptativa e na
25 migração de células inflamatórias, as quais são responsáveis pela reação do organismo contra processos alérgicos e autoimunes crônicos, sendo estas classificadas como quimiocinas homeostáticas. Por outro lado, alguns destes polipeptídeos também participam do controle da migração celular em condições patológicas, e.g. patogênese de tumores, doenças autoimunes e a ampliação
30 de danos relacionados a doenças inflamatórias, sendo portanto, classificados como quimiocinas inflamatórias (D'Ambrosio, D.; Panina-Bordignon, P.; Sinigaglia, F. *J. Immunol. Meth.* **2003**, 273, 3.; Raman, D.; Sobolik-Delmaire, T.; Richmond, A. *Exp. Cell. Res.* **2011**, 317, 575.; Szpakowska, M.; Fievez, V., Arumugan, K. et al. *Biochemical Pharmacology* **2012**, 84, 1366.).

A grande maioria das quimiocinas são secretadas pelas células após biossíntese, com exceção da CX3CL1 (fractalina) e CXCL16 (SR-PSOX), as quais permanecem na superfície celular (White, G. E.; Iqbal, A. J.; Greaves, D. R. *Pharmacol. Rev.* **2013**, 65, 47.). A primeira quimiocina descrita, *i.e.* CXCR8 (IL-8), foi descoberta (Yoshimura, T.; Matsushima, K.; Tanaka, S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, 84, 9233.) como um importante fator de quimioatração de neutrófilos e em seguida várias outras quimiocinas foram descobertas e a elas foi atribuída a modulação da quimiotaxia de grupos específicos de leucócitos.

São descritas na literatura cerca de 50 quimiocinas (Choi, W.T.; Duggineni, S.; Xu, Y. et al. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 977.) relacionadas a espécie humana e estas são classificadas em 4 classes de acordo com a posição da ponte dissulfeto formada entre resíduos de cisteína (Cys, C) presentes na região *N*-terminal do polipeptídeo, a saber: **(a)** CXC, **(b)** CC, **(c)** C e **(d)** CX3C. Estas quatro classes apresentam estrutura terciária conservada e estão intimamente ligadas a classificação dos aproximadamente 20 receptores de quimiocinas conhecidos. Neste contexto, é importante destacar que a subunidade *N*-terminal das quimiocinas possuem um papel crítico na ativação de seus respectivos receptores, podendo suas particularidades e alterações estruturais serem responsáveis por quimiocinas com atividade agonista, inativas ou mesmo capazes de atuarem como antagonistas (Rostène, W.; Kitabgi, P.; Parsadaniantz, S. M. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, 8, 895.; White, G. E.; Iqbal, A. J.; Greaves, D. R. *Pharmacol. Rev.* **2013**, 65, 47.).

Os receptores de quimiocinas são proteínas (8-14 kDa) que pertencem a classe A da superfamília de receptores acoplados a proteína G (GPCRs, do inglês *G protein-coupled receptors*) (Thiele, S.; Malmgaard-Clausen, M.; Engel-Andreasen, J. et al. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 8164.; White, G. E.; Iqbal, A. J.; Greaves, D. R. *Pharmacol. Rev.* **2013**, 65, 47.). Os receptores de quimiocinas podem formar homo- ou heterodímeros (Rodríguez-Frade, J. M.; Mellado, M.; Martínez, A. C. *Trends Immunol.* **2001**, 22, 612.; Raman, D.; Sobolik-Delmaire, T.; Richmond, A. *Exp. Cell Res.* **2011**, 317, 575.), que estão envolvidos em diversos processos inflamatórios de doenças que ainda são um desafio para os químicos medicinais e para a indústria farmacêutica, como por exemplo: artrite reumatóide, esclerose múltipla, asma (Taka, E.; Errahali, Y. J.; Abonyo, B. O. et al. *Cytokine.* **2008**, 44, 342.), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)

(Caramori, G.; Adcock, I. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2003**, 16, 247.), câncer metastático (Gros, S. J.; Kurschat, N.; Drenckhan, A. et al. *Plos One.* **2012**, 7, e47287.), síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *acquired immune deficiency syndrome*) (Planesas, J. M.; Pèrez-Nueno, V. I.; Borrell, J. I. et al. *J. Mol. Graph. Model.* **2012**, 38, 123.) e dor neuropática (White, G. E.; Iqbal, A. J.; Greaves, D. R. *Pharmacol. Rev.* **2013**, 65, 47.).

Neste contexto, estudos envolvendo o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de ligantes deste grupo de GPCRs com padrão estrutural não peptídico têm se mostrado uma abordagem eficiente adotada por vários grupos de pesquisa na academia e em companhias farmacêuticas (Blakeney, J. S.; Reid, R. C.; Le, G. T., et al. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 2960.). Os progressos no desenho de fármacos baseados da estrutura (SBDD, do inglês *structure based drug design*) de diversos GPCRs trouxeram informações valiosas para a compreensão de importantes interações ligante-proteína e para o desenvolvimento de novos ligantes e antagonistas de receptores de quimiocinas (Congreve, M.; Langmead, C. J.; Mason, J. S. et al. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 4283.) como alternativas relevantes para o bloqueio da quimiotaxia e respostas inflamatórias relacionadas aos receptores de quimiocinas, como pode ser visto em vários artigos que exploram a quimiodiversidade dos antagonistas de receptores de quimiocinas (Gao, Z.; Metz, W. A. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 3733.; Pease, J.; Horuk, R. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 9363.), incluindo peptídeos (Mungalpara, J.; Thiele, S.; Eriksen, Ø. et al. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 10287.), anticorpos monoclonais (Catley, M. C.; Coote, J.; Bari, M. et al. *Pharmacol. Ther.* **2011**, 132, 333.) e pequenas moléculas de origem sintética (Thoma, G.; Streiff, M. B; Kovarik, J. et al. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 7915.; Wijtmans, M.; Scholten, D. J.; Esch, I. J. P., et al. *Drug Discov. Today Tech.* **2012**, 9, e229.).

Os receptores do tipo CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5 e CXCR4 são exemplos de receptores de quimiocinas que possuem antagonistas em ensaios farmacológicos pré-clínicos ou como fármacos já registrados pelo órgão regulatório de fármacos nos EUA, o FDA (do inglês *Food and Drug Administration*), como pode ser observado na **Figura 1**. As estruturas mostradas nesta **Figura**, ilustram a recorrente presença de grupos funcionais

amida, sulfonamida e ureia (em vermelho), assim como átomos de nitrogênio básicos ou carregados positivamente (em azul) na arquitetura molecular destes antagonistas. Enquanto os antagonistas BX471 (1) e JNJ-17166864 (2) tiveram seus estudos interrompidos devido a falta de eficácia em estudos clínicos de fase II, os compostos BMS-639623 (3) e GSK2239633 (4) estão com estudos clínicos fase I em andamento. O antagonistas de receptores de quimiocinas maraviroc (5) and plerixafor (6) são fármacos registrados pelo FDA para o tratamento da AIDS e mieloma múltiplo, respectivamente (Pease, J.; Horuk, R. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 9363.; White, G. E.; Iqbal, A. J.; Greaves, D. R. *Pharmacol. Rev.* **2013**, 65, 47.).

Os receptores de quimiocina CC do tipo 3 (CCR3), os quais são expressos em eosinófilos, basófilos, células T, monócitos e macrófagos, foram descritos pela primeira vez em 1996 e estão envolvidos na regulação dos processos inflamatórios da asma, DPOC (Scholten, D. J.; Canals, M.; Maussang, D. et al. *British J. Pharmacol.* **2012**, 165, 1617.) e rinite (Horuk, R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, 8, 23.) através do reconhecimento molecular das quimiocinas CCL5 (RANTES) (Clemetson, K. J.; Clemetson, J. M.; Proudfoot, A. E. I. et al. *Blood.* **2000**, 96, 4046.), CCL6-8, CCL11 (eotaxina), CCL13, CCL15, CCL24 (eotaxina-2) e CCL26 (eotaxina-3) (White, G. E.; Iqbal, A. J.; Greaves, D. R. *Pharmacol. Rev.* **2013**, 65, 47.).

Agonistas plenos, parciais e inversos do receptor CCR3 conhecidos (Wan, Y.; Jakway, J. P.; Qiu, H. et al. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, 456, 1.) e estudos de mutagênese sítio-dirigido envolvendo o antagonista dual CCR1/CCR3 UCB-35625 (*estrutura não mostrada*) (Sabroe, I.; Peck, M. J.; Keulen, B. J. V. et al. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 25985.; Mendonça, F. L.; Fonseca, P. C. A.; Phillips, R. M. et al. *J. Biol. Chem.* **2005**, 11, 4808.) e o agonista CH0076789 (*estrutura não mostrada*) (Wise, E. L. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 27935) contribuíram significativamente para o entendimento de fatores estruturais associados a modulação do receptor CCR3 (Roumen, L.; Scholten, D. J.; Kruijf, P. et al. *Drug Discov. Today Tech.* **2012**, 9, e281.). Em contrapartida, o desenho, a síntese e a avaliação farmacológica de novos antagonistas de receptores CCR3 (Wacker, D. A.; Santella III, J. B.; Gardner, D. S. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1785.; Ting, P. C.; Lee, J. F.; Wu, J. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 1375.; Ting, P. C.; Umland, S.

P.; Aslanian, R. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 3020.; Kauffman, G. S.; Watson, P. S.; Nugent, W. A. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 8975.; Jain, V.; Saravanan, P.; Arvind, A. et al. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, 77, 373.; Allegretti, M.; Cesta, M. C.; Garin, A. et al. *Immunol. Lett.* **2012**, 145, 68.) tem fornecido
5 mais ferramentas para a busca de novos e efetivos antagonistas.

Para grande parte dos antagonistas de CCR3, são observados ao menos uma subunidade amida ou ureia e ao menos um átomo de nitrogênio básico ou carregado positivamente, frequentemente ligado a uma subunidade aromática, como pode ser observado em vários trabalhos da literatura (Pease,
10 J.; Horuk, R. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 9363.; Gardner, D. S.; Santelle, J. B.; Tebben, A. J. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 586.; De Lucca, G. V.; Kim, U. T.; Vargo, B. J. et al. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2194.; Pruitt, J. R.; Batt, D. G.; Wacker, D. A. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 2992.; Sato, I.; Morihira, K.; Inami, H. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 5989.; Cherney, R.
15 J.; Nelson, D. J.; Lo, Y. C. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 5063.; Ting, P. C.; Umland, S. P.; Aslanian, R. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 3020.; Nitta, A.; Iura, Y.; Tomioka, H. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 4951).

A subunidade bispiperidina amida substituída do composto **7** é um
20 exemplo que pode ser usado para investigação da relação estrutura-atividade (REA) envolvendo antagonistas de receptores de quimiocinas CCR3 (**Figura 2**). Quando a subunidade (2-metil)benzila (**A**) é substituída pelas subunidades potencialmente aceptoras de ligação de hidrogênio 4-aminofenila (**8**) ou 3-quinolinila (**9**), observa-se aumento da constante de inibição (K_i), enquanto que
25 substituição pelo grupo 4-quinolinila (**10**), com átomo de nitrogênio menos básico que no composto **9**, não afeta significativamente o perfil de ação antagonista. Por outro lado, a substituição pelo grupo 6-quinolinila (**11**) diminui a constante de inibição em CCR3, mostrando que a funcionalização regioseletiva do grupo quinolina que resulta em maior afastamento entre o
30 átomo de nitrogênio do sistema heterocíclico e o grupo amida resulta em uma interação mais efetiva com o biorreceptor. Por sua vez quando a subunidade 3,4-diclorofenila (**7**) foi substituída por 4-clorofenila (**12**), 3-clorofenila (**13**), 4-fluorofenila (**14**), 4-metoxifenila (**15**) ou 4-bromofenila (**16**) a atividade evidenciada foi menos pronunciada que a do composto **7**, destacando a

importância da subunidade 3,4-diclorofenila para a atividade de antagonistas de receptores CCR3 desta série, o que provavelmente é consequência de suas particulares propriedades eletrônicas e contribuição hidrofóbica (**B**) (em azul) (Ting, P. C.; Umland, S. P.; Aslanian, R. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 5 15, 3020.).

Outro resultado interessante envolveu a descoberta de antagonistas duais de receptores de quimiocina CCR3 e de histamina do subtipo H₁ para o tratamento da asma com risco reduzido de modulação dos canais de potássio Kv 11.1 (hERG), os quais podem estar relacionados a efeitos cardíacos 10 adversos. Quando dois receptores relacionados com a asma são modulados pela ação de antagonistas, espera-se que o processo inflamatório seja mais eficientemente controlado, especialmente devido ao fato de casos reportados na literatura indicarem o benefício em pacientes asmáticos da associação de antagonistas de receptores H₁ com fármacos anti-inflamatórios (Bahl, A.; 15 Barton, P.; Bowers, K. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 6688.). Dessa forma, podemos modular seletividade de antagonistas de receptores CCR3 (Naya, A.; Kobayashi, K.; Ishikawa, M. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1219.), assim como a atividade dual envolvendo ao menos um subtipo de receptor de quimiocina. Este conhecimento pode ser útil no desenvolvimento 20 de antagonistas duais de receptores de quimiocinas (De Lucca, G. V.; Kim, U. T.; Vargo, B. J. et al. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2194.), apesar dos melhores ligantes identificados até o momento falharem nos ensaios pré-clínicos (White, G. E.; Iqbal, A. J.; Greaves, D. R. *Pharmacol. Rev.* **2013**, 65, 47.).

Os receptores de quimiocina CC do tipo 4 (CCR4), os quais são 25 expressos em células T, dendríticas, *natural killer* (NK), basófilos, monócitos e macrófagos, também estão envolvidos na modulação dos processos inflamatórios da asma e inflamação pulmonária alérgica (Mikhak, Z.; Fukui, M.; Farsidjani, A. et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, 67.) através da ativação por ação das quimiocinas CCL17 (TARC), CCL22 e da quimiocina derivada de 30 macrófagos (do inglês *Macrophage-Derived Chemokine*, MDC) (Mantovani, A.; Gray, P. A.; Damme, J. V. et al. *J. Leuk. Biol.* **2000**, 68, 400.; Horuk, R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, 8, 23.; White, G. E.; Iqbal, A. J.; Greaves, D. R. *Pharmacol. Rev.* **2013**, 65, 47.).

Existem várias substâncias sintéticas antagonistas de receptores CCR4 descritos na literatura (Burdi, D. F.; Chi, S.; Mattia, K. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 3141.; Zhao, F.; Xiao, J. H.; Wang, Y.; Li, S. *Chinese Chem. Lett.* **2009**, 20, 296.; Sun, Z.; Tian, L. J.; Lin, Q. et al. *J. Pharmaceutical Anal.* **2011**, 4, 264.; Zhang, S.; Qi, H.; Yakufu, P. et al. *Journal of Chromatography B.* **2011**, 879, 75.; Procopiou, P. A.; Ford, A. J.; Graves, R, H. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 2730.; Procopiou, P. A.; Barrett, J. W.; Barton, N. et al. *J. Med. Chem.* **2013**, published on line 14 February 2013, DOI: 10.1021/jm301572h), incluindo compostos com relevante atividade antagonista frente ao receptor CCR4 que apresentam subunidades heteroaromáticas e aminas terciárias, assim como derivados que combinam subunidades amídicas com aminas terciárias. Essa quimiodiversidade mostra a importância marcante da subunidade amina terciária e ilustra os diferentes grupos funcionais que podem ser explorados no planejamento de novos ligantes para o receptor de quimiocina do tipo CCR4 (Yokoyama, K.; Ishikawa, N.; Igarashi, S. et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 7021.; Yokoyama, K.; Ishikawa, N.; Igarashi, S. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 64.; Wang, X.; Xu, F.; Xu, Q. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2800.; Yang, L.; Zhou, C.; Guo, L. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3735.; Allen, S.; Newhouse, B.; Anderson, A. S. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 1619.).

Estudos com o antagonista dos receptores de quimiocina CCR4 **17** e seus análogos ilustram as contribuições das alterações em várias subunidades estruturais e suas consequências sobre o perfil de bioatividade (**Figura 3**). A substituição da subunidade 2-naftila do composto **17** por outras subunidades aromáticas ou não-aromáticas menos lipofílicas, e.g. 4-isopropilfenila (**18**), isopropila (**19**), fenila (**20**) ou benzila (**21**) resultou em aumento de K_i em relação ao composto protótipo **17**. A troca do grupo sulfona (SO_2) pelo isostero carbonila (**22**) ou por um grupo metileno (**23**) também foi responsável pela diminuição de atividade antagonista, provavelmente devido a perda de dois átomos aceptores de ligação de hidrogênio. Quando a subunidade benzila do composto **17** foi substituída por um átomo de hidrogênio (**24**) ou pelo grupo isopropila (**25**) a atividade antagonista diminuiu, demonstrando a importância da presença de uma subunidade aromática nesta região para interação com o biorreceptor-alvo. Da mesma forma, o antípoda ótico **26**, que apresenta a

configuração absoluta R (não natural) do grupo espaçador prolina também teve sua atividade antagonista expressivamente reduzida. Por outro lado, a *N*-metilação de **17** resultou em aumento de atividade do análogo **27**, indicando a influência de variações conformacionais da ligação peptídica e as
5 consequências no perfil de bioatividade. Além disso, trocas simultâneas, como por exemplo: 5-Cl-2-naftila (mais lipofílica) substituindo 2-naftila, *N*-metilação e a introdução de um espaçador metilênico no grupo benzila (**28**) resultam em aumento significativo da atividade do protótipo **17** (**Figura 3**) (Burdí, D. F.; Chi, S.; Mattia, K. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 3141.).

10 A asma é uma complexa doença inflamatória crônica que afeta mais de 300 milhões de pessoas no mundo e este número tem crescido a cada ano (Maddox, L.; Schwartz, D. A. *Annu. Rev. Med.* **2002**, 53, 477.; Murdoch, J. R.; Lioyd, C. M. *Mutat. Res.* **2010**, 690, 24.). Existem várias abordagens terapêuticas atualmente empregadas capazes de resultar em bons resultados
15 no controle dos episódios de crises da doença (Adcock, I. M.; Caramori, G.; Chung, K. F. *Lancet.* **2008**, 372, 1073.; Moragón, E. M. *Arch. Bronconeumol.* **2010**, 46, 347.), e.g. broncodilatadores (Dalence-Guzmán, M. F.; Toftered, J.; Thornqvist, V. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 4999.), agonistas β_2 -adrenérgicos (Alikhani, V.; Beer, D.; Bentley, D. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*
20 **2004**, 14, 4705.), corticosteróides (Gupta, R.; Jindal, D. P.; Kumar, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 6331.; Millan, D. S.; Ballard, S. A.; Chunn, S. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 5826.), inibidores de fosfodiesterase 4 (PDE-4) (Piaz, V. D.; Giovannoni, M. P. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35, 463.), antagonistas de receptores de leucotrienos (Montuschi, P. *Mini-Rev. Med.*
25 *Chem.* **2008**, 8, 647.), etc. Por outro lado, pacientes que sofrem de asma severa (5-10%) não respondem bem às terapias atualmente disponíveis para o tratamento desta doença (Adcock, I. M.; Caramori, G.; Chung, K. F. *Lancet.* **2008**, 372, 1073.), induzindo a necessidade de se desenvolver novas alternativas terapêuticas eficientes na melhoria da qualidade de vida de
30 pacientes asmáticos.

A fisiopatologia da asma está intimamente ligada com os receptores de quimiocina CCR3 (Teran, L. M. *Rev. Immunol. Today.* **2000**, 21, 235.) e CCR4 (Zimmermann, N.; Hershey, G. K.; Foster, P. S.; Rothenberg, M. E. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, 111, 227.; Smit, J. J.; Lukacs, N. W. *Eur. J. Pharmacol.*

2006, 533, 277.), os quais são abundantemente expressos em eosinófilos e células do tipo T_H2, respectivamente. Estes dois receptores de quimiocinas do tipo CC estão envolvidos no processo fisiopatológico da asma, o qual apresenta três principais características: a inflamação, obstrução reversível e hiperresponsividade das vias aéreas (Barnes, P. J. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, 8, 183.; Koelink, P. J.; Overbeek, S. A.; Braber, S. et al. *Pharmacol. Ther.* **2012**, 133, 1.).

A cascata alérgica da asma, a qual é caracterizada pela ativação de células do tipo T_H2, eosinófilos e mastócitos, inicia-se com a exposição a estímulos externos, e.g. alérgenos inaláveis. Em seguida, estes alérgenos podem desencadear o processo inflamatório da asma de duas formas: (a) ligando-se às imunoglobulinas E presentes em mastócitos, dessa forma, desencadeando a liberação de vários mediadores (e.g. histamina, leucotrienos e prostaglandinas), os quais são responsáveis pela broncoconstrição das células musculares lisas presentes nas vias aéreas; (b) ativando células dendríticas que são responsáveis da liberação das quimiocinas CCL17 e CCL22. A modulação do receptor de quimiocina CCR3 é promovida pela quimiocina CCL11, dessa forma, desencadeando o processo inflamatório em eosinófilos, o qual também está relacionado a IL-5. Em paralelo, a ativação do receptor de quimiocina CCR4 é promovida pelas quimiocinas CCL17 e CCL22, as quais são mais abundantes nas vias aéreas de pacientes asmáticos. A ativação do receptor CCR4 tem como consequência o desencadeamento do processo inflamatório através da liberação das interleucinas IL-4 e IL-9, que se ligam a imunoglobulina E em mastócitos e a liberação das interleucinas IL-13 e IL-5, as quais ativam as células B responsáveis pela produção da imunoglobulina E (IgE) e células responsáveis pela inflamação eosinofílica, respectivamente (Koelink, P. J.; Overbeek, S. A.; Braber, S. et al. *Pharmacol. Ther.* **2012**, 133, 1.).

Pelo exposto, podemos concluir que antagonistas de receptores de quimiocinas do tipo CCR3 podem impedir a ativação promovida pela quimiocina CCL11 e consequentemente a bloqueio da inflamação eosinofílica. Adicionalmente, a ação de antagonistas no receptor de quimiocina do tipo CCR4 bloqueia diversos pontos estratégicos do processo inflamatório da asma: ativação das IgE em mastócitos, que resultam em broncoconstrição (IL-4 e IL-

9), ativação pela IL-13 das células responsáveis pela produção de IgE (células B) e inflamação eosinofílica pela IL-5 (Koelink, P. J.; Overbeek, S. A.; Braber, S. et al. *Pharmacol. Ther.* **2012**, 133, 1.). Portanto, a busca de novos antagonistas duais de receptores de quimiocinas CCR3 e CCR4 mostra-se
5 uma atraente estratégia para o tratamento do processo inflamatório envolvido na asma brônquica.

Descrição das Figuras

10 **Figura 1** - Fármacos e candidatos a fármacos registrados como antagonistas dos receptores de quimiocina dos tipos CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5 e CXCR4.

Figura 2: Relação estrutura-atividade (REA) para derivados bispiperidina amida substituídos antagonistas de receptores CCR3 com base em valores de
15 K_i .

Figura 3. Aspectos da relação estrutura-atividade (REA) com valores de K_i para antagonistas sulfonamídicos do receptor CCR4.

20 **Figura 4:** Micrografia do citocentrifugado do lavado broncoalveolar.

Figura 5: Contagem de leucócitos totais e diferenciais no lavado broncoalveolar. **(A)** Contagem leucócitos totais. **(B)** Contagem de células mononucleares. **(C)** Contagem de neutrófilos recuperados nas amostras de
25 camundongos provocados com salina, LPS, **LASSBio-1641** + LPS e **LASSBio-1642** + LPS. Os valores representam a média \pm EPM de no mínimo 5 animais por grupo. Para execução das análises estatísticas foram realizados os testes one-way ANOVA seguido pelo teste t de Newman Keuls. Os valores de P inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

30 **Figura 6:** Efeito dos compostos **LASSBio-1641** e **LASSBio-1642** sobre o aumento de resistência pulmonar e hiper-reatividade observados após provocação alérgica. Os valores apresentam a média \pm EPM de no mínimo 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo não tratado. [†] $P < 0,05$
35 comparado ao grupo estimulado intranasalmente com salina.

Figura 7: Efeito dos compostos **LASSBio-1641** e **LASSBio-1642** sobre o aumento de elastância pulmonar e hiper-reatividade observados após provocação alérgica. Os valores representam a média \pm EPM de no mínimo 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo não tratado. + $P < 0,05$ comparado ao grupo estimulado intranasalmente com salina.

Figura 8: Efeito do tratamento com composto **LASSBio-1765** nas concentrações de 50 $\mu\text{mol/kg}$ e 100 $\mu\text{mol/kg}$ sobre o aumento de resistência e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos desafiados com OVA. Os valores representam a média \pm EPM de no mínimo 5 animais por grupo. * $p < 0.05$ comparado ao grupo não tratado. + $p < 0.05$ comparado ao grupo estimulado com salina.

Figura 9: Efeito do tratamento com composto **LASSBio-1765** nas concentrações de 50 $\mu\text{mol/kg}$ e 100 $\mu\text{mol/kg}$ sobre o aumento de elastância pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos desafiados com OVA. Os valores representam a média \pm EPM de no mínimo 5 animais por grupo. * $p < 0.05$ comparado ao grupo não tratado. + $p < 0.05$ comparado ao grupo estimulado com salina.

Figura 10: Contagem de leucócitos totais e diferenciais no lavado broncoalveolar. As análises incluem: Leucócitos totais (A); Macrófagos (B); Linfócito (C); Eosinófilos (D); e Neutrófilos (E). O tratamento com **LASSBio-1765** nas doses de 50 $\mu\text{mol/kg}$ e 100 $\mu\text{mol/kg}$, foi realizada por via intraperitoneal. Os valores representam a média \pm EPM de 5 animais por grupo. Para execução das análises estatísticas foram realizados os testes one-way ANOVA seguido pelo teste t de Newman-Keuls. Os valores de p inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

Figura 11: Quantificação das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina-1 em amostras de tecido pulmonar. Os valores representam a média \pm EPM de 5 animais por grupo. Para execução das análises estatísticas foram realizados os testes one-way ANOVA seguido pelo teste t de Newman-Keuls. Os valores de p inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

Figura 12: Efeito do tratamento com **LASSBio-1765** sobre a produção de muco nas vias aéreas de camundongos A/J. A análise da produção de muco foi avaliada por morfometria digital. Os valores representam a média \pm EPM. Para execução das análises estatísticas foram realizados os testes one-way ANOVA seguido pelo teste t de Newman-Keuls. Os valores de p inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

Figura 13: Fotomicrografias representativas do efeito do tratamento com **LASSBio-1765** sobre a produção de muco nas vias aéreas de camundongos A/J. Salina (A); Ova+Tween 80 (0,2%) (B); **LASSBio-1765** (50 μ mol/kg) (C) e **LASSBio-1765** (50 μ mol/kg) (D). O tratamento com **LASSBio-1765** nas doses de 50 μ mol/kg e 100 μ mol/kg, foi realizada por via intraperitoneal.

Figura 14: Efeito do composto **LASSBio-1765** sobre a quimiotaxia de eosinófilos *in vitro* induzida por eotaxina murina. As células foram incubadas com **LASSBio-1765** nas concentrações de 10 μ M e 1 μ M; ou meio ou PEG 0,01%, a 37°C por 10 min e estimulados com eotaxina (0,1 μ M). Os valores representam a média \pm EPM. Para execução das análises estatísticas foram realizados os testes one-way ANOVA seguido pelo teste t de Newman-Keuls. Os valores de p inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos. Para a comparação entre dois grupos experimentais foi utilizado teste "t" de Student para amostras não pareadas. Os valores de p inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

Sumário da Invenção

A presente invenção trata de moléculas com perfis de atividade anti-inflamatória e antiasmática, as quais provavelmente estão relacionadas com a modulação de receptores de quimiocinas do tipo CCR3 e CCR4, dessa forma, objetiva-se o tratamento de doenças inflamatórias crônicas.

Como objetivo adicional, a presente invenção visa proporcionar composições farmacêuticas compreendendo novos compostos para o

tratamento das doenças inflamatórias crônicas, e.g. asma, rinite alérgica e doença pulmonar obstrutiva crônica.

As moléculas **LASSBio-1641** e **LASSBio-1642** apresentam atividade anti-inflamatória, inibindo claramente o acúmulo de neutrófilos nas vias aéreas pulmonares induzido por LPS, com destaque para **LASSBio-1642**, que apresentou inibição significativa nas provas de elastância e resistência pulmonares.

A molécula **LASSBio-1765** inibiu significativamente o acúmulo de eosinófilos e neutrófilos nas vias aéreas de animais desafiados com ovo-albumina, assim como as alterações na função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas. Ademais, **LASSBio-1765** bloqueou a migração de eosinófilos *in vitro* induzida por eotaxina, sugerindo fortemente a modulação de receptores de quimiocina do tipo CCR3.

As etapas sintéticas envolvidas na produção dos compostos da presente invenção são simples e não necessitam de realização de purificação cromatográfica, o que resulta em vantagens do ponto de vista industrial. Portanto, um objetivo adicional da presente invenção é proporcionar processos para a produção das moléculas anti-inflamatórias e antiasmáticas aqui relacionadas.

20

Descrição Detalhada da Invenção

Tendo feito uma breve referência aos objetivos da presente invenção, passaremos agora a descrevê-la em seus detalhes, usando, sempre que oportuno, as concretizações preferenciais da invenção.

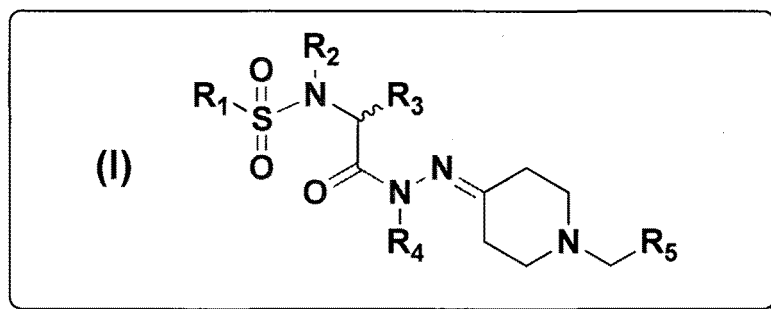
25

Esta invenção tem como uma das características inovadoras, a síntese de novos derivados de núcleo estrutural (((piperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil) sulfonamídicos funcionalizados com estrutura geral **(I)**, apresentando as subunidades: **(a)** sulfonamida, **(b)** aminoácida internalizada e **(c)** *N*-acilidrazona, planejados racionalmente como antagonistas de receptores CCR3 e CCR4, candidatos a protótipos de novos agentes anti-inflamatórios e antiasmáticos. O uso deste padrão estrutural não foi relatado anteriormente, e, portanto, os compostos descritos nesta invenção e sua metodologia sintética representam uma inovação entre os agentes para o tratamento de doenças

30

inflamatórias crônicas, como a asma, rinite alérgica e doença pulmonar obstrutiva crônica.

Os novos compostos de que trata esta invenção pertencem à classe dos derivados (((piperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil) sulfonamídicos funcionalizados e seus isósteros, de estrutura geral (I):



Esquema (I)

10 **R₁** e **R₅** são: fenila, 2-fluorofenila, 3-fluorofenila, 4-fluorofenila, 2,3-difluorofenila, 3,4-difluorofenila, 2-clorofenila, 3-clorofenila, 4-clorofenila, 2,3-diclorofenila, 3,4-clorofenila, 2-bromofenila, 3-bromofenila, 4-bromofenila, 2,3-dibromofenila, 3,4-dibromofenila, 2-metilfenila, 3-metilfenila, 4-metilfenila, 2,3-dimetilfenila, 3,4-dimetilfenila, 1-naftila, 2-naftila, 5-quinoxalina, 6-quinoxalina, 5-
15 benzo[d][1,3]dioxola e 5-(6-metilbenzo[d][1,3]dioxola).

R₂ e **R₃** são substituídos de forma que entre o átomo de enxofre e o átomo de nitrogênio ligado a **R₄**, estejam internalizados na estrutura geral (I) os seguintes aminoácidos: Sarcosina, Glicina, *D*-Prolina, *L*-Prolina, *D*-Alanina, *L*-Alanina, *D*-Leucina, *L*-Leucina, *D*-Isoleucina, *L*-Isoleucina, *D*-Cisteína, *L*-Cisteína, *D*-
20 Metionina, *L*-Metionina, *D*-Arginina, *L*-Arginina, *D*-Homoarginina, *L*-Homoarginina, *D*-Lisina, *L*-Lisina, *D*-Triptofano, *L*-Triptofano, *D*-Serina, *L*-Serina, *D*-Ácido Aspártico, *L*-Ácido Aspártico, *D*-Ácido Glutâmico, *L*-Ácido Glutâmico, *D*-Triptofano, *L*-Triptofano, *D*-Asparagina, *L*-Asparagina, *D*-
25 Fenilalanina, *L*-Fenilalanina, *D*-Histidina, *L*-Histidina, *D*-Tirosina, *L*-Tirosina, *D*-Valina, *L*-Vanila, *D*-Glutamina, *L*-Glutamina.

R₄ é hidrogênio, metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutila, sec-butila e benzila.

Os novos compostos de fórmula (I) foram obtidos em bons rendimentos químicos, empregando-se metodologia sintética aqui descrita, que se caracteriza por apresentar poucas etapas, partindo-se de compostos comercialmente disponíveis, o que qualifica esta metodologia sintética para
5 utilização industrial.

Os compostos da presente invenção foram planejados através de sínteses lineares, utilizando reações clássicas como:

- 10 - Substituição eletrofílica aromática (formação dos sulfonatos de potássio);
- Cloração (formação dos cloretos de sulfonila);
- Esterificação da glicina (formação de ésteres de aminoácidos da forma de cloridratos);
- Adição nucleofílica à sulfona (formação das sulfonamidas);
- 15 - Reação de hidrazinólise de ésteres (formação de hidrazidas);
- Condensação entre hidrazidas e cetonas (formação de *N*-acilidrazonas).

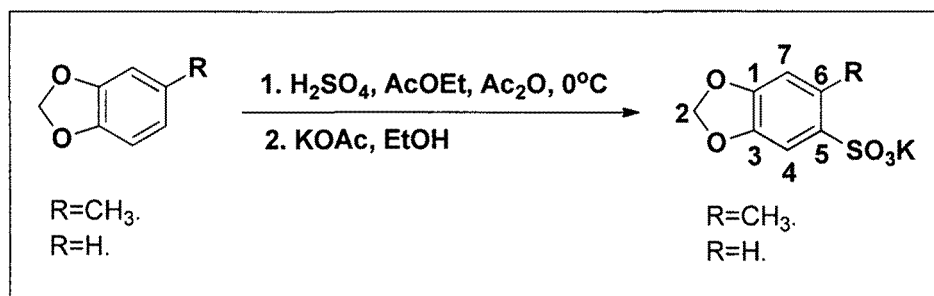
Mais especificamente, os compostos de fórmula (II) da presente
20 invenção podem ser preparados por um processo que compreende as etapas de:

- Substituição eletrofílica aromática em presença de ácido sulfúrico, seguido de tratamento com acetato de potássio (formação dos sulfonatos de potássio);
- 25 - Cloração em cloreto de tionila e *N,N*-dimetilformamida catalítico sob aquecimento (formação dos cloretos de sulfonila);
- Esterificação da glicina em cloreto de tionila e metanol sob refluxo (formação de ésteres de aminoácidos da forma de cloridratos);
- Adição nucleofílica à sulfona em diclorometano à temperatura ambiente
30 (formação das sulfonamidas);
- Reação de hidrazinólise de ésteres com hidrato de hidrazina e etanol sob refluxo (formação de hidrazidas);
- Condensação entre hidrazidas e cetonas com irradiação de micro-ondas em reator de micro-ondas científico (formação de *N*-acilidrazonas).

Uma descrição detalhada dos métodos sintéticos desta invenção para alguns dos compostos reivindicados é relatada a seguir, incluindo-se os dados espectroscópicos relevantes à sua caracterização. Os exemplos seguintes 5 ilustram, mas não limitam a presente invenção.

Exemplo 1

10 **PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DOS SULFONATOS DE POTÁSSIO: 2-METIL-3,4-METILENODIOXIBENZENOSSULFONATO DE POTÁSSIO E DO 3,4-METILENODIOXIBENZENOSSULFONATO DE POTÁSSIO**

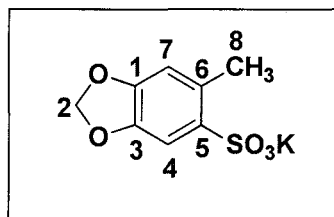


15 Uma solução contendo 29,41 mmol do 3,4-metilenodioxitolueno correspondente e 8,4 mL (88 mmol) de anidrido acético em 88 mL de acetato de etila foi resfriada a 0°C em um balão de fundo redondo de 250 mL de capacidade. Em seguida, uma solução contendo 2,4 mL (37,2 mmol) de ácido sulfúrico concentrado (d=1,84 g/mL) em 12 mL de acetato de etila gelado foi então adicionada a primeira, gota a gota, durante 5 minutos. A mistura 20 reacional foi agitada por 2 horas enquanto aqueceu a temperatura ambiente.

Em seguida, uma solução contendo 4,32 g (44 mmol) de acetato de potássio em 22,4 mL de etanol a 95% foi adicionada, gota a gota, ao meio reacional que permaneceu sob agitação por mais 30 minutos. O produto foi isolado por filtração em funil de Buchner.

25

2-METIL-3,4-METILENODIOXIBENZENOSSULFONATO DE POTÁSSIO

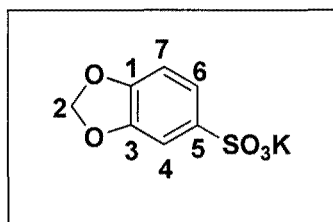


Foram obtidos 7,32 g (98%) do 2-metil-3,4-metilenodioxibenzenossulfonato de potássio como um sólido amorfo de cor branca, P.F. = 192-194°C.

5 **RMN de ^1H à 200 MHz, D_2O (δ -ppm):** 7,46 (1H, s, H-4); 6,92 (1H, s, H-7); 6,10 (2H, s, H-2) e 2,63 (3H, s, H-8).

RMN de ^{13}C à 50 MHz, D_2O (δ -ppm): 149,40 (C-1); 144,96 (C-3); 134,23 (C-6); 131,71 (C-5); 111,94 (C-4); 107,65 (C-7); 102,00 (C-2) e 19,62 (C-8).

10 3,4-METILENODIOXIBENZENOSSULFONATO DE POTÁSSIO



Foram obtidos 6,18 g (87,5%) do 3,4-metilenodioxibenzenossulfonato de potássio como um sólido amorfo de cor branca, P.F. = 231-233°C.

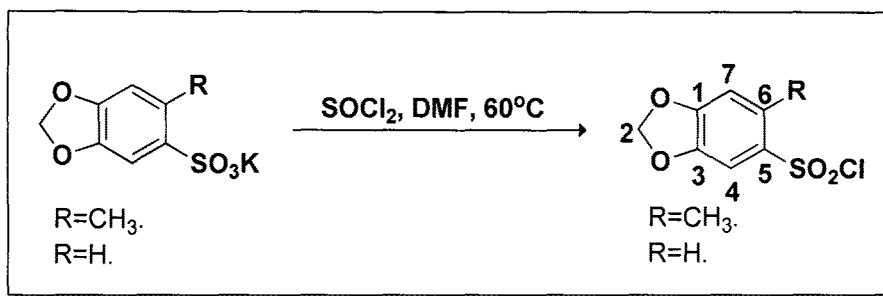
15 **RMN de ^1H à 200 MHz, D_2O (δ -ppm):** 7,405 (1H, dd, H-6, $J^3 = 8,42$ e $J^4 = 1,96$ Hz); 7,305 (1H, d, H-4, $J^4 = 1,96$ Hz); 6,99 (1H, d, H-7, $J^3 = 8,42$ Hz) e 6,10 (2H, s, H-2).

RMN de ^{13}C à 50 MHz, D_2O (δ -ppm): 149,63 (C-1); 147,38 (C-3); 136,13 (C-5); 120,35 (C-6); 108,17 (C-4); 105,96 (C-7) e 102,00 (C-2).

20

Exemplo 2

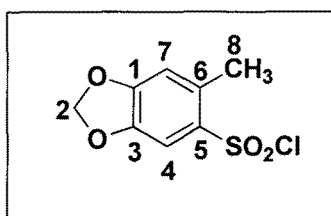
25 **PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DOS CLORETOS DE SULFONILA: CLORETO DE 2-METIL-4,5-METILENODIOXIBENZENOSSULFONILA E CLORETO DE 4,5-METILENODIOXIBENZENOSSULFONILA**



Uma solução contendo 14 mL (22,83 g, 191,7 mmol) de cloreto de tionila e 0,13 mL (0,12 g, 1,64 mmol) de *N,N*-dimetilformamida (DMF) anidra foram rapidamente adicionados a 19,7 mmol do metilenodioxibenzenosulfonato de potássio correspondente previamente pesado em um balão de fundo redondo com 250 mL de capacidade. A mistura resultante foi agitada a 60°C por 3,5 horas. Ao final deste tempo, adicionou-se cuidadosamente quantidade suficiente de gelo picado a mistura, que foi então extraída utilizando-se diclorometano (DCM) (3 x 80 mL) e solução saturada de NaCl (1 x 80 mL).

Em seguida, a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para fornecer o cloreto de benzenossulfonila correspondente.

CLORETO DE 2-METIL-4,5-METILENODIOXIBENZENOSSULFONILA

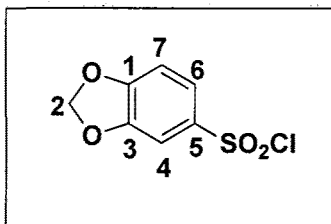


Foram obtidos 3,21 g (69,7%) do cloreto de 2-metil-4,5-metilenodioxibenzenossulfonila como um sólido amorfo de cor marrom clara, P.F. = 58-60°C, $R_f = 0,70$ *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ^1H à 200 MHz, DMSO (δ -ppm): 7,21 (1H, s, H-4); 6,71 (1H, s, H-7); 5,95 (2H, s, H-2) e 2,42 (3H, s, H-8).

RMN de ^{13}C à 50 MHz, DMSO (δ -ppm): 147,39 (C-1); 144,16 (C-3); 139,44 (C-6); 129,99 (C-5); 110,82 (C-4); 107,49 (C-7); 101,06 (C-2) e 19,93 (C-8).

CLORETO DE 4,5-METILENODIOXIBENZENOSSULFONILA



Foram obtidos 2,85 g (65,8%) do cloreto de 4,5-metilenodioxibenzenossulfonila como um sólido amorfo de cor marrom clara, P.F. = 41-43°C, Rf = 0,70 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

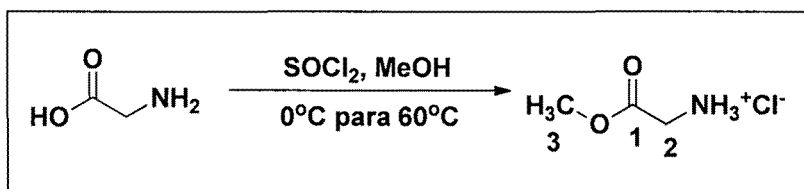
5 **RMN de ^1H à 200 MHz, DMSO (δ -ppm):** 7,105 (1H, dd, H-6, $J^3 = 8,42$ e $J^4 = 1,96$ Hz); 7,045 (1H, d, H-4, $J^4 = 1,96$ Hz); 6,83 (1H, d, H-7, $J^3 = 8,42$ Hz) e 6,01 (2H, s, H-2).

RMN de ^{13}H à 50 MHz, DMSO (δ -ppm): 147,69 (C-1); 146,72 (C-3); 141,89 (C-5); 119,67 (C-6); 117,37 (C-4); 106,34 (C-7) e 101,35 (C-2).

10

Exemplo 3

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DO CLORIDRATO DO ÉSTER METÍLICO DA GLICINA



15

Foram adicionados 3 equivalentes de cloreto de tionila (22 mL, $d = 1,64$ g/cm^3) em uma solução contendo 1 equivalente de glicina (P.F. = 238-240°C) (7,5 g) e 10 equivalentes de metanol (41 mL, $d = 0,79$ g/cm^3) em um balão de fundo redondo de 500 mL de capacidade em banho de gelo. A solução

20 resultante foi então aquecida até temperatura de refluxo em metanol a noite toda. O metanol e o cloreto de tionila em excesso foram então removidos sob pressão reduzida para fornecer o cloridrato do éster metílico da glicina em

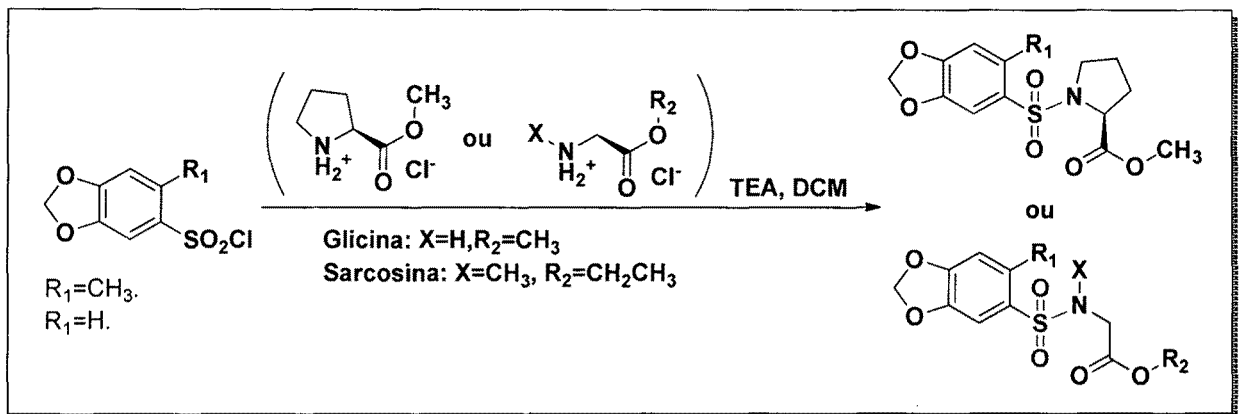
25 **RMN de ^1H à 200 MHz, DMSO (δ -ppm):** 8,62 (3H, s, NH_3^+); 3,75 (2H, s, H-2) e 3,71 (3H, s, H-3).

RMN de ^{13}C à 50 MMHz, DMSO (δ -ppm): 168,02 (C-1); 52,58 (C-2) e 39,52 (C-3).

Exemplo 4

5

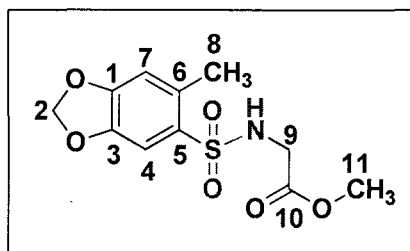
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GERAL PARA PREPARAÇÃO DAS METILENODIOXIBENZENOSSULFONAMIDAS



10 Em um balão de 250 mL de capacidade, contendo 5,54 mmol do
 cloridrato do éster de aminoácido correspondente em 0,85 mL de trietilamina,
 adicionou-se 40 mL de diclorometano e em seguida 5,54 mmol do cloreto de
 metilenodioxibenzenosulfonamida correspondente. A mistura reacional foi
 agitada por 2,5 horas à temperatura ambiente, sendo adicionados 1,22 mL de
 15 trietilamina (1,1 equivalente) após 1 hora do início da reação.

Ao final da reação, evidenciado por cromatografia em camada fina
 (CCF), o produto foi isolado após adição de 100 mL de diclorometano e
 extração com solução de HCl 10% (4 x 40 mL), seguido de extração com
 solução saturada de NaCl (3 x 80 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4
 20 anidro, seguido de evaporação do solvente para fornecer produto desejado na
 faixa de rendimento de 58-86%.

2-(6-METILBENZO[d][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETATO DE METILA

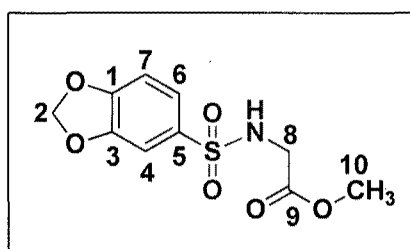


Foram obtidos 1,37 g (86,0%) de 2-(6-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de metila como um sólido amorfo de cor marrom clara, P.F. = 72-74°C, Rf = 0,61 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

5 **RMN de ^1H à 200 MHz, CDCl_3 (δ -ppm):** 7,35 (1H, s, H-4); 6,67 (1H, s, H-7); 5,96 (2H, s, H-2); 5,28 (1H, t, NH, $J^3 = 3,92$ Hz); 3,67 (2H, d, H-9, $J^3 = 3,92$ Hz); 3,61 (3H, s, C-11) e 2,51 (3H, s, H-8).

RMN de ^{13}H à 50 MHz, CDCl_3 (δ -ppm): 169,61 (C-10); 151,31 (C-1); 145,77 (C-3); 133,59 (C-6); 129,84 (C-5); 112,29 (C-4); 110,09 (C-7); 102,22 (C-2);
10 52,70 (C-11); 43,93 (C-9) e 20,30 (C-8).

2-(BENZO[*d*][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETATO DE METILA

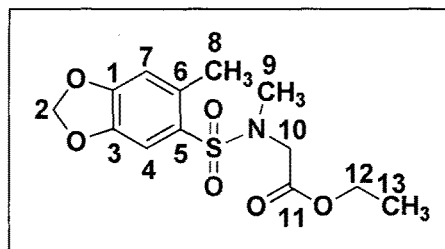


15 Foram obtidos 932 mg (57,9%) de 2-benzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de metila como um sólido amorfo de cor branca, P.F. = 144-146°C, Rf = 0,62 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ^1H à 200 MHz, DMSO (δ -ppm): 8,06 (1H, t, NH, $J^3 = 5,88$ Hz); 7,325 (1H, dd, H-6, $J^3 = 7,84$ e $J^4 = 1,96$ Hz); 7,255 (1H, d, H-4, $J^4 = 1,96$ Hz); 7,055 (1H, d, H-7, $J^3 = 7,84$ Hz); 6,15 (2H, s, H-2); 3,665 (2H, d, H-8, $J^3 = 5,88$ Hz) e
20 3,55 (3H, s, H-10).

RMN de ^{13}H à 50 MHz, DMSO (δ -ppm): 169,37 (C-9); 150,64 (C-1); 147,71 (C-3); 133,83 (C-5); 122,00 (C-6); 108,06 (C-4); 106,52 (C-7); 102,36 (C-2); 51,77 (C-10) e 43,71 (C-8).

2-(N,6-DIMETILBENZO[d][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETATO DE ETILA

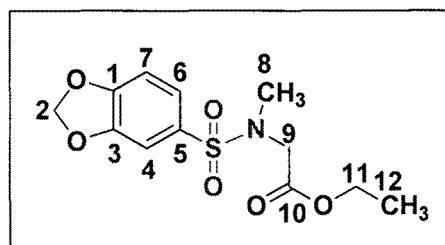


Foram obtidos 1,29 g (77,5%) de 2-(N,6-dimetilbenzo[d][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de metila como um óleo de cor marrom clara, $R_f = 0,70$ *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ^1H à 200 MHz, DMSO (δ -ppm): 7,39 (1H, s, H-4); 6,67 (1H, s, H-7); 5,96 (2H, s, H-2); 4,105 (2H, q, H-12, $J^3 = 5,88$ Hz); 3,93 (2H, s, H-10); 2,82 (3H, s, H-9); 2,46 (3H, s, H-8) e 1,19 (3H, t, H-13, $J^3 = 5,88$ Hz).

RMN de ^{13}H à 50 MHz, DMSO (δ -ppm): 168,82 (C-11); 151,24 (C-1); 145,80 (C-3); 134,22 (C-6); 129,71 (C-5); 112,35 (C-4); 110,51 (C-7); 102,20 (C-2); 61,51 (C-12); 50,40 (C-10); 35,39 (C-9); 20,49 (C-8) e 14,21 (C-13).

2-(N-METILBENZO[d][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETATO DE ETILA

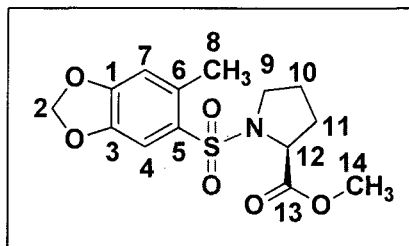


Foram obtidos 1,40 g (82,9%) de 2-(N-metilbenzo[d][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de metila como um óleo de cor marrom clara, $R_f = 0,68$ *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ^1H à 200 MHz, DMSO (δ -ppm): 7,315 (1H, dd, H-6, $J^3 = 7,84$ e $J^4 = 1,96$ Hz); 7,165 (1H, d, H-4, $J^3 = 1,96$ Hz); 6,82 (1H, d, H-7, $J^3 = 7,84$ Hz); 6,01 (2H, s, H-2); 4,07 (2H, q, H-11, $J^3 = 5,88$ Hz); 3,89 (2H, s, H-9); 2,81 (3H, s, H-8) e 1,17 (3H, t, H-12, $J^3 = 5,88$ Hz).

RMN de ^{13}H à 50 MHz, DMSO (δ -ppm): 172,71 (C-10); 151,59 (C-1); 148,33 (C-3); 131,80 (C-5); 123,31 (C-6); 108,33 (C-4); 107,92 (C-7); 102,40 (C-2); 60,47 (C-11); 52,51 (C-9); 31,04 (C-8) e 24,80 (C-12).

(S)-1-((6-METILBENZO[*d*][1,3]DIOXOL-5-IL)SULFONIL)PIRROLIDINA-2-CARBOXILATO DE METILA

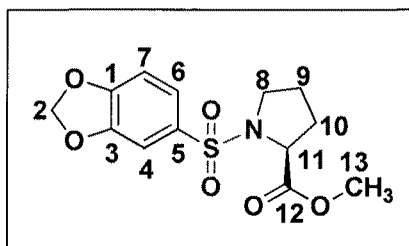


Foram obtidos 1,09 g (60,4%) de (S)-1-((6-dimetilbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)sulfonil)pirrolidina-2-carboxilato de metila como um óleo de cor marrom clara, Rf = 0,64 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ^1H à 200 MHz, CDCl_3 (δ -ppm): 7,39 (1H, s, H-4); 6,66 (1H, s, H-7); 5,95 (2H, s, H-2); 4,34 (1H, dd, H-12, $J = 3,52$ e $8,50$ Hz); 3,55 (3H, s, H-14); 3,45-3,25 (2H, m, H-9); 2,50 (3H, s, H-8) e 2,25-1,75 (4H, m, H-10 e H-11).

RMN de ^{13}C à 50 MHz, CDCl_3 (δ -ppm): 172,62 (C-13); 151,25 (C-1); 145,75 (C-3); 134,72 (C-6); 130,05 (C-5); 112,12 (C-4); 110,30 (C-7); 102,16 (C-2); 59,79 (C-12); 52,27 (C-14); 48,51 (C-9); 31,29 (C-11); 24,88 (C-10) e 20,45 (C-8).

(S)-1-((BENZO[*d*][1,3]DIOXOL-5-IL)SULFONIL)PIRROLIDINA-2-CARBOXILATO DE METILA



Foram obtidos 1,40 g (75,8%) de (S)-1-((benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)sulfonil)pirrolidina-2-carboxilato de metila como um sólido bege, P.F = 83-85°C, Rf = 0,54 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

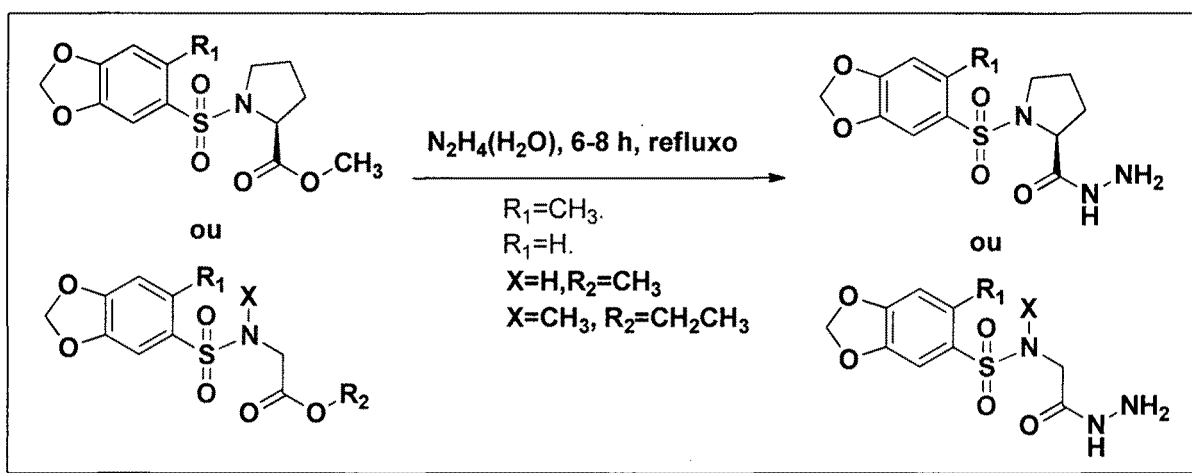
RMN de ^1H à 200 MHz, CDCl_3 (δ -ppm): 7,375 (1H, dd, H-6, $J^3 = 8,26$ e $J^4 = 2,05$ Hz); 7,235 (1H, d, H-4, $J^4 = 2,05$ Hz); 6,82 (1H, d, H-7, $J^3 = 8,26$ Hz); 6,01 (2H, s, H-2); 4,22 (1H, dd, H-11, $J = 8,04$ e $5,20$ Hz); 3,66 (3H, s, H-13); 3,50-3,10 (2H, m, H-8) e 2,20-1,60 (4H, m, H-9 e H-10).

RMN de ^{13}H à 50 MHz, CDCl_3 (δ -ppm): 172,69 (C-12); 151,59 (C-1); 148,33 (C-3); 131,82 (C-5); 123,30 (C-6); 108,32 (C-4); 107,91 (C-7); 102,40 (C-2); 60,47 (C-11); 52,50 (C-13); 48,52 (C-8); 31,04 (C-10) e 24,79 (C-9).

5

Exemplo 5

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GERAL PARA PREPARAÇÃO DAS HIDRAZIDAS METILENODIOXIBENZENOSSULFONAMÍDICAS

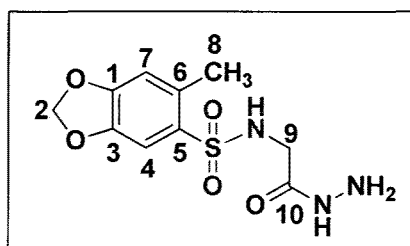


10

Os ésteres aminoácidos *N*-sulfonilsubstituídos (3,48 mmol) foram adicionados, em pequenas porções, a um balão de fundo redondo de 100 mL contendo 1,1 mL de hidrato de hidrazina (65%) em 1,8 mL de etanol sob agitação. A mistura reacional foi aquecida sob refluxo por 6-8 horas. Após isolamento, as hidrazidas correspondentes foram obtidas com faixa de rendimento entre 36,0 e 90,5%.

15

2-(6-METILBENZO[*d*][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETIL HIDRAZIDA



20

Ao término da reação o pH foi ajustado para 8-9, adicionou-se 40 mL de água gelada, o balão foi colocado em banho de gelo por 30 min e o precipitado formado foi filtrado em funil de Buchner. Foram obtidos 790 mg (79,0%) de 2-

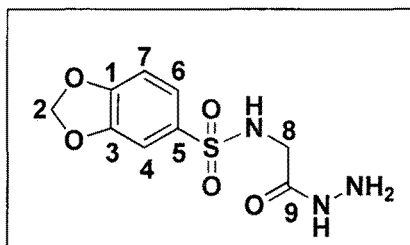
(6-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetil hidrazida como um sólido amorfo de cor amarelo clara, P.F. = 180-182°C, Rf = 0,10 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

5 **RMN de ¹H à 200 MHz, DMSO-*d*₆ (δ-ppm):** 9,01 (1H, s, C=O-NH); 7,86 (1H, s, SO₂-NH); 7,32 (1H, s, H-4); 6,97 (1H, s, H-7); 6,11 (2H, s, H-2); 3,80 (2H, s, NH-NH₂); 3,42 (2H, s, H-9) e 2,50 (3H, s, C-8).

RMN de ¹³H à 50 MHz, DMSO-*d*₆ (δ-ppm): 167,14 (C-10); 150,32 (C-1); 145,19 (C-3); 132,69 (C-6); 131,25 (C-5); 112,04 (C-4); 108,78 (C-7); 102,19 (C-2); 43,57 (C-9) e 19,80 (C-8).

10

2-BENZO[*d*][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETIL HIDRAZIDA



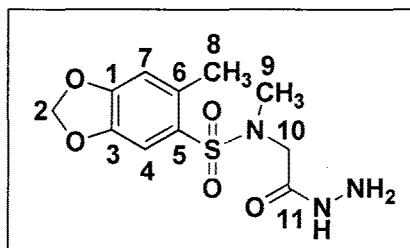
15 Ao término da reação o pH foi ajustado para 8-9, adicionou-se 40 mL de água gelada, o balão foi colocado em banho de gelo por 30 min e o precipitado formado foi filtrado em funil de Buchner. Foram obtidos 363 mg (36,3%) de 2-benzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetil hidrazida como um sólido amorfo de cor branca, P.F. = 126-128°C, Rf = 0,08 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

20 **RMN de ¹H à 200 MHz, DMSO (δ-ppm):** 9,03 (1H, s, C=O-NH); 7,75 (1H, s, SO₂-NH); 7,325 (1H, dd, H-6, J³ = 8,24 e J⁴ = 1,54 Hz); 7,265 (1H, d, H-4, J⁴ = 1,54 Hz); 7,055 (1H, d, H-7, J³ = 8,24 Hz); 6,15 (2H, s, H-2); 4,14 (2H, s, NHNH₂) e 3,34 (2H, s, H-8).

RMN de ¹³H à 50 MHz, DMSO (δ-ppm): 166,83 (C-9); 150,72 (C-1); 147,77 (C-3); 133,54 (C-5); 122,23 (C-6); 108,27 (C-4); 106,73 (C-7); 102,43 (C-2) e 43,95 (C-8).

25

2-(N,6-DIMETILBENZO[*d*][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETIL HIDRAZIDA

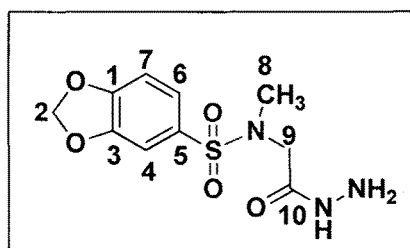


Ao término da reação o pH foi ajustado para 8-9, adicionou-se 40 mL de água gelada e o balão foi colocado em banho de gelo por 30 min, mas não houve precipitação. Em seguida o etanol foi evaporado, adicionou-se 40 mL de solução saturada de cloreto de sódio, o balão foi colocado em banho de gelo e o produto foi finalmente extraído em acetato de etila (3x50 mL). Foram obtidos 552 mg (55,3%) de 2-(N,6-dimetilbenzo[d][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetil hidrazida como um óleo de cor amarela, $R_f = 0,12$ *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ^1H à 200 MHz, DMSO (δ -ppm): 9,13 (1H, s, C=O-NH); 7,35 (1H, s, H-4); 6,69 (1H, s, H-7); 6,12 (2H, s, H-2); 4,25 (2H, s, NHNH₂); 3,73 (2H, s, H-10); 2,77 (3H, s, H-9) e 2,45 (3H, s, H-8).

RMN de ^{13}C à 50 MHz, DMSO (δ -ppm): 166,81 (C-11); 150,62 (C-1); 145,43 (C-3); 133,17 (C-6); 129,57 (C-5); 112,22 (C-4); 109,09 (C-7); 102,33 (C-2); 49,83 (C-10); 35,20 (C-9) e 19,96 (C-8).

2-(N-METILBENZO[d][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETIL HIDRAZIDA

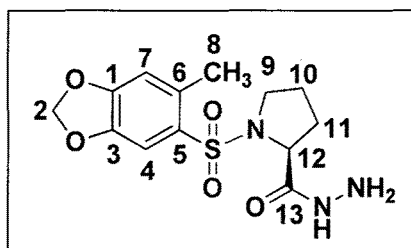


Ao término da reação o pH foi ajustado para 8-9, adicionou-se 40 mL de água gelada, o balão foi colocado em banho de gelo por 30 min e o precipitado formado foi filtrado em funil de Buchner. Foram obtidos 572,5 mg (57,2%) de 2-(N-metilbenzo[d][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetil hidrazida como um sólido de cor branca, P.F. = 156-158°C, $R_f = 0,08$ *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ^1H à 200 MHz, DMSO (δ -ppm): 9,15 (1H, s, C=O-NH); 7,34 (1H, s, H-6); 7,29 (1H, s, H-4); 7,105 (1H, d, H-7, $J^3 = 7,90$ Hz); 6,17 (2H, s, H-2); 4,34 (2H, s, NHNH₂); 3,58 (2H, s, H-9) e 2,67 (3H, s, H-8).

RMN de ^{13}H à 50 MHz, DMSO (δ -ppm): 166,40 (C-10); 151,17 (C-1); 147,98 (C-3); 130,29 (C-5); 123,04 (C-6); 108,44 (C-4); 107,25 (C-7); 102,59 (C-2); 50,94 (C-9) e 35,93 (C-8).

5 **(S)-1-((6-METILBENZO[*d*][1,3]DIOXOL-5-IL)SULFONIL)PIRROLIDINA-2-ACETIL HIDRAZIDA**

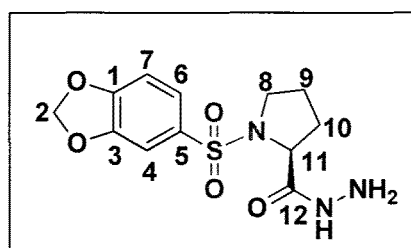


Ao término da reação o pH foi ajustado para 8-9, adicionou-se 40 mL de água gelada e o balão foi colocado em banho de gelo por 30 min, mas não
10 houve precipitação. Em seguida o etanol foi evaporado, adicionou-se 40 mL de solução saturada de cloreto de sódio, o balão foi colocado em banho de gelo e o produto foi finalmente extraído em acetato de etila (3x50 mL). Foram obtidos 775 mg (77,5%) de (S)-1-((6-dimetilbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)sulfonyl)pirrolidina-2-acetil hidrazida como um óleo de cor marrom, Rf = 0,09 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

15 **RMN de ^1H à 200 MHz, CDCl_3 (δ -ppm):** 7,94 (1H, s, C=O-NH); 7,29 (1H, s, H-4); 6,67 (1H, s, H-7); 5,97 (2H, s, H-2); 4,19 (1H, dd, H-12, J = 2,72 e 8,20 Hz); 3,40-3,10 (2H, m, H-9); 2,94 (2H, s, NHNH₂); 2,49 (3H, s, H-8) e 2,25-1,70 (4H, m, H-10 e H-11).

20 **RMN de ^{13}H à 50 MHz, CDCl_3 (δ -ppm):** 171,86 (C-13); 151,72 (C-1); 146,29 (C-3); 134,34 (C-6); 127,91 (C-5); 112,45 (C-4); 110,16 (C-7); 102,43 (C-2); 60,98 (C-12); 49,31 (C-9); 30,51 (C-11); 24,77 (C10) e 21,12 (C-8).

25 **(S)-1-((BENZO[*d*][1,3]DIOXOL-5-IL)SULFONIL)PIRROLIDINA-2-ACETIL HIDRAZIDA**



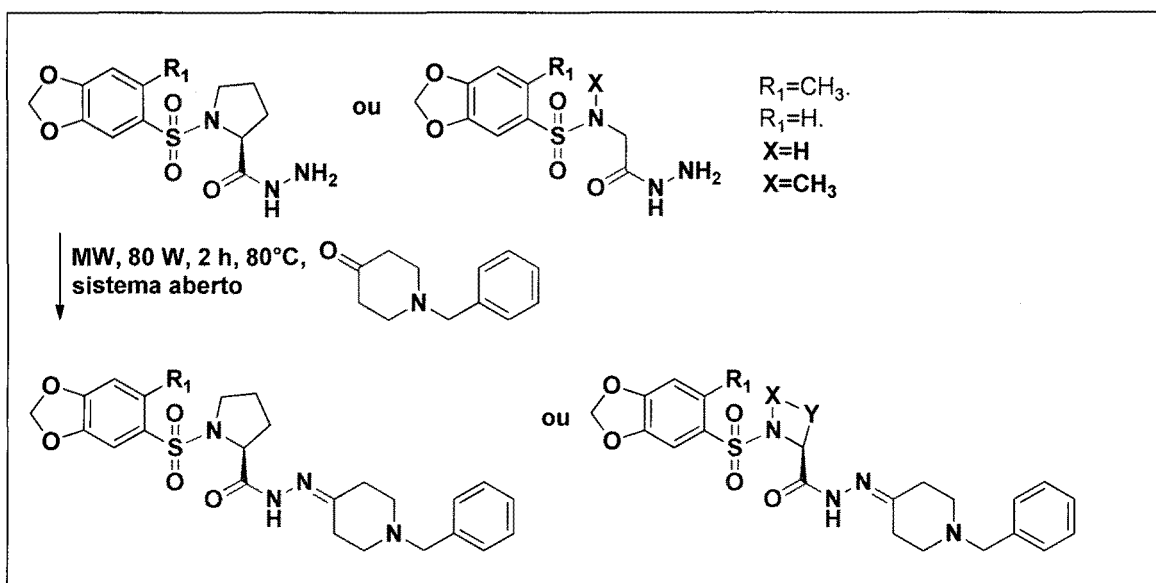
Ao término da reação o pH foi ajustado para 8-9, adicionou-se 40 mL de água gelada e o balão foi colocado em banho de gelo por 30 min, mas não houve precipitação. Em seguida o etanol foi evaporado, adicionou-se 40 mL de solução saturada de cloreto de sódio, o balão foi colocado em banho de gelo e o produto foi finalmente extraído em acetato de etila (3x50 mL). Foram obtidos 905 mg (90,5%) de (S)-1-((benzo[d][1,3]dioxol-5-il)sulfonil)pirrolidina-2-acetil hidrazida como um óleo de cor marrom clara, R_f = 0,08 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ¹H à 200 MHz, CDCl₃ (δ-ppm): 8,22 (1H, s, C=O-NH); 7,335 (1H, dd, H-6, J³ = 8,13 e J⁴ = 2,03 Hz); 7,195 (1H, d, H-4, J⁴ = 2,03 Hz); 6,86 (1H, d, H-7, J³ = 8,13 Hz); 6,04 (2H, s, H-2); 4,20-4,00 (1H, m, H-11); 3,80-3,00 (4H, m, H-8 e NHNH₂) e 2,30-1,50 (4H, m, H-9 e H-10).

RMN de ¹³C à 50 MHz, CDCl₃ (δ-ppm): 171,63 (C-12); 152,14 (C-1); 148,64 (C-3); 129,04 (C-5); 123,73 (C-6); 108,67 (C-4); 107,99 (C-7); 102,62 (C-2); 61,85 (C-11); 49,85 (C-8); 30,27 (C-10) e 24,48 (C-9).

Exemplo 6

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GERAL PARA PREPARAÇÃO DAS N-ACILIDRAZONAS METILENODIOXIBENZENOSSULFONAMÍDICAS



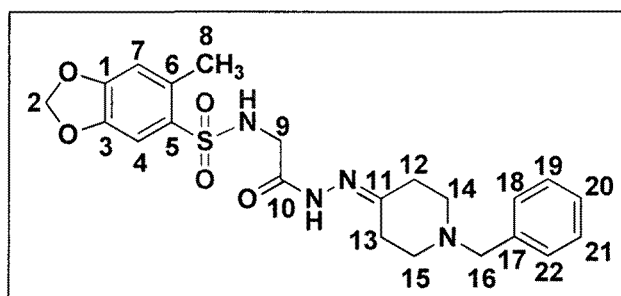
20

Em um tubo para reator de micro-ondas de Pyrex equipado com agitador magnético, adicionou-se 1 equivalente das hidrazidas sulfonamídicas correspondentes e 02 equivalentes da *N*-benzilpiperidona. Visando homogeneização, foram adicionados cerca de 5 mL de diclorometano ao tudo,

agitou-se a mistura reacional por 2 minutos e o solvente foi então evaporado. O tubo foi colocado no reator de micro-ondas científico CEM Discover o qual foi programado com os seguintes parâmetros: Potência = 80 W, Temperatura = 80°C, Tempo = 2 horas e em sistema aberto. O fluxo de ar para resfriamento do sistema foi usado somente para manter a temperatura (80°C) constante durante toda a reação.

Ao término da reação, o sistema foi resfriado até temperatura ambiente, resultando na formação das *N*-acilidrazonas correspondentes. Em seguida, o produto foi lavado com éter etílico em funil de buchner e o solvente residual foi removido em bomba de alto vácuo, fornecendo os derivados com faixa de rendimento de 65,7 a 85,6%.

***N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-6-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida (LASSBio-1843)**



Partindo-se de 500 mg (1,74 mmol) da hidrazida correspondente e 2 equivalentes da *N*-benzilpiperidona, foram obtidos 662 mg (82,96%) de *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-6-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida **LASSBio-1843** como um sólido amorfo de cor bege, P.F. = 162-164°C, $R_f_1 = 0,67$ metanol 100%.

RMN de ^1H à 200 MHz, DMSO (δ -ppm): 10,44 e 10,17 (1H, CONH); 7,90-7,71 (1H, SO_2NH); 7,50-7,10 (6H, m, H-4, H-18, H-19, H-20, H-21 e H-22); 6,93 (1H, s, H-7); 6,07 (2H, s, H-2); 4,00-3,50 (4H, H-16 e H-9) e 2,60-2,00 (11H, m, H-8, H-12, H-13, H-14 e H-15).

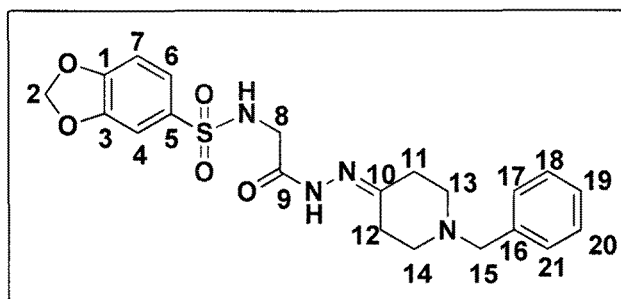
RMN de ^{13}C à 50 MHz, DMSO (δ -ppm): 169,49 e 164,22 (C-10, C=O); 158,90 e 153,70 (C-11); 150,13 (C-1); 145,03 (C-3); 138,26 (C-17); 132,64 (C-6); 131,73 (C-5); 128,78 (C-18 e C-22); 128,23 (C-19 e C-21); 127,01 (C-20); 111,96 (C-4); 108,72 (C-7); 102,08 (C-2); 61,26 (C-16); 53,12 (C-14 e C-15); 51,76 e 43,23 (C-9); 34,22 e 26,55 (C-12 e C-13) e 19,76 (C-8, CH_3).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ -ppm): 128,78 (C-18 e C-22); 128,23 (C-19 e C-21); 127,01 (C-20); 111,96 (C-4); 108,72 (C-7); 102,08 (C-2); 61,26 (C-16); 53,12 (C-14 e C-15); 51,76 e 43,23 (C-9); 34,22 e 26,55 (C-12 e C-13) e 19,76 (C-8, CH₃).

5 **[CLAE]** Tempo de retenção (t_R) = 5,88 min. 99,92% (240 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μ L).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = C₂₂H₂₆N₄O₅S. Massa Monoisotópica: 458,162391 m/z. [M + H] = 459,169667 m/z; [2M + Na] = 939,314002 m/z. Massas encontradas: 459,1713 e 939,3115 m/z.

***N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)benzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida (LASSBio-1831)**



15 Partindo-se de 500 mg (1,83 mmol) da hidrazida correspondente e 2 equivalentes da *N*-benzilpiperidona, foram obtidos 696 mg (85,58%) de *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)benzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida **LASSBio-1831** como um sólido amorfo de cor amarela, P.F. = 79-81°C, R_f = 0,75 metanol 100%.

20 **RMN de ¹H à 200 MHz, DMSO (δ -ppm):** 10,49 e 10,22 (1H, CONH); 7,69 (1H, s, SO₂NH); 7,50-7,20 (7H, m, H-4, H-6, H-17, H-18, H-19, H-20 e H-21); 7,10-6,90 (1H, m, H-7); 6,13 (2H, s, H-2); 4,20-3,50 (4H, m, H-8 e H-15) e 2,75-2,00 (8H, m, H-11, H-12, H-13 e H-14).

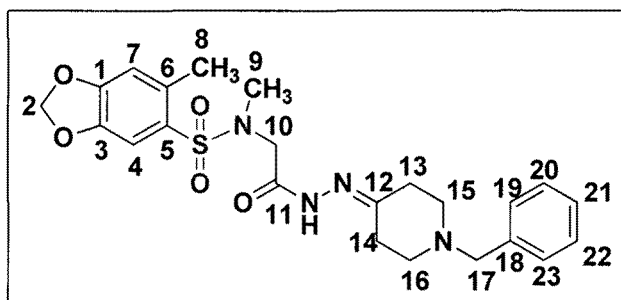
25 **RMN de ¹³H à 50 MHz, DMSO (δ -ppm):** 169,28 e 164,06 (C-9, C=O); 159,07 e 153,88 (C-10); 150,66 (C-1); 147,71 (C-3); 138,27 (C-16); 133,96 (C-5); 128,80 (C-17 e C-21); 128,26 (C-18 e C-20); 127,04 (C-19); 122,21 (C-6); 108,07 (C-4); 106,76 (C-7); 102,40 (C-2); 61,28 (C-15); 53,14 e 52,28 (C-13 e C-14); 44,56 e 40,68 (C-8) e 34,24 e 27,32 (C-11 e C-12).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ -ppm): 128,80 (C-17 e C-21); 128,26 (C-18 e C-20); 127,04 (C-19); 122,21 (C-6); 108,07 (C-4); 106,76 (C-7); 102,40 (C-2); 61,28 (C-15); 53,14 e 52,28 (C-13 e C-14); 44,56 e 40,68 (C-8) e 34,24 e 27,32 (C-11 e C-12).

- 5 **[CLAE]** Tempo de retenção (t_R) = 4,585 min. 98,11% (254 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μ L).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = $C_{21}H_{24}N_4O_5S$. Massa Monoisotópica: 444,146741 m/z. $[M + Na] = 467,135962$ m/z; $[2M + Na] = 911,282702$ m/z. Massas encontradas: 467,1375 e 911,2820 m/z.

***N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-*N*,6-dimetilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida (LASSBio-1642)**



- 15 Partindo-se de 300 mg (0,99 mmol) da hidrazida correspondente e 2 equivalentes da *N*-benzilpiperidona, foram obtidos 376 mg (79,92%) de *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-*N*,6-dimetilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida **LASSBio-1642** como um sólido amorfo de cor branca, P.F. = 84-86°C, $R_f = 0,57$ metanol 100%.

- 20 **RMN de 1H à 200 MMHz, DMSO (δ -ppm):** 10,56 e 10,34 (1H, CONH); 7,50-7,25 (6H, m, H-4, H-19, H-20, H-21, H-22 e H-23); 7,03 (1H, s, H-7); 6,16 (2H, s, H-2); 4,34 e 3,97 (2H, H-17); 3,57 (2H, s, H-10); 2,89 e 2,86 (3H, H-9) e 2,75-2,25 (11H, m, H-8, H-13, H-14, H-15 e H-16).

- RMN de ^{13}H à 50 MMHz, DMSO (δ -ppm):** 169,21 e 163,99 (C-11, C=O); 158,81 e 153,55 (C-12); 150,40 (C-1); 145,30 (C-3); 138,24 (C-18); 132,86 (C-6); 130,48 (C-5); 128,72 (C-19 e C-23); 128,19 (C-20 e C-22); 126,97 (C-21); 112,17 (C-4); 108,81 (C-7); 102,22 (C-2); 61,21 (C-17); 53,09 (C-15 e C-16);

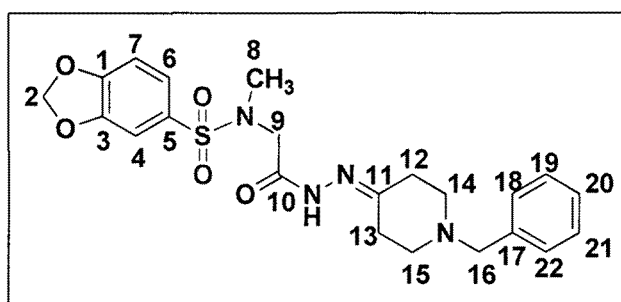
51,78 e 49,83 (C-10); 35,28 (C-9); 34,22 e 26,51 (C-13 E C-14) e 19,79 (C-8, CH₃).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ -ppm): 128,72 (C-19 e C-23); 128,19 (C-20 e C-22); 126,97 (C-21); 112,17 (C-4); 108,81 (C-7); 102,22 (C-2); 61,21 (C-17);
5 53,09 (C-15 e C-16); 51,78 e 49,83 (C-10); 35,28 (C-9); 34,22 e 26,51 (C-13 E C-14) e 19,79 (C-8, CH₃).

[CLAE] Tempo de retenção (t_R) = 6,931 min. 96,25% (254 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μ L).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = C₂₃H₂₈N₄O₅S. Massa Monoisotópica: 472,178041 m/z. [M + H] = 473,185317 m/z; [2M + Na] = 967,345303 m/z. Massas encontradas: 473,1873 e 967,3443 m/z.

***N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-*N*-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida (LASSBio-1765)**



15

Partindo-se de 300 mg (1,04 mmol) da hidrazida correspondente e 2 equivalentes da *N*-benzilpiperidona, foram obtidos 396 mg (82,70%) de *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-*N*-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida **LASSBio-1765** como um sólido amorfo de cor marrom clara, P.F. = 141-143°C, R_f = 0,79 metanol 100%.

20

RMN de ¹H à 200 MMHz, DMSO (δ -ppm): 10,50 e 10,32 (1H, CONH); 7,50-7,00 (8H, m, H-4, H-6, H-7, H-18, H-19, H-20, H-21 e H-22); 6,16 (2H, s, H-2); 4,19 e 3,79 (2H, H-16); 3,60 (2H, H-9); 2,79 e 2,72 (3H, H-8) e 2,60-2,20 (8H, m, H-12, H-13, H-14 e H-15).

25

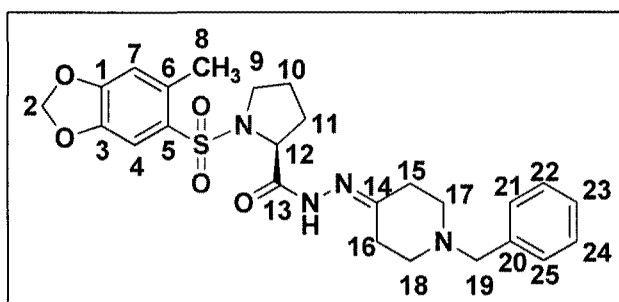
RMN de ¹³C à 50 MMHz, DMSO (δ -ppm): 169,12 e 163,81 (C-10, C=O); 159,32 e 153,67 (C-11); 151,18 (C-1); 147,94 (C-3); 138,29 (C-17); 131,89 (C-5); 128,89 (C-18 e C-22); 128,32 (C-19 e C-21); 127,11 (C-20); 123,03 (C-6); 108,42 (C-4); 107,10 (C-7); 102,57 (C-2); 61,34 (C-16); 53,20 (C-14 e C-15); 51,89 e 50,52 (C-9); 35,85 (C-8) e 34,22 e 26,59 (C-12 e C-13).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ -ppm): 128,89 (C-18 e C-22); 128,32 (C-19 e C-21); 127,11 (C-20); 123,03 (C-6); 108,42 (C-4); 107,10 (C-7); 102,57 (C-2); 61,34 (C-16); 53,20 (C-14 e C-15); 51,89 e 50,52 (C-9); 35,85 (C-8) e 34,22 e 26,59 (C-12 e C-13).

5 **[CLAE]** Tempo de retenção (t_R) = 5,504 min. 98,69% (248 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μ L).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = $C_{22}H_{26}N_4O_5S$. Massa Monoisotópica: 458,162391 m/z. $[M + H] = 459,169667$ m/z; $[2M + H] = 917,332058$ m/z. Massas encontradas: 459,1710 e
10 917,3290 m/z.

(S)-N'-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO)-1-((6-METILBENZO[d][1,3]DIOXOL-5-ILSULFONIL)-PIRROLIDINO-2-CARBOIDRAZIDA (LASSBio-1641)



15 Partindo-se de 500 mg (1,52 mmol) da hidrazida correspondente e 2 equivalentes da *N*-benzilpiperidona, foram obtidos 581 mg (65,66%) de (S)-*N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)-1-((6-metilbenzo[d][1,3]dioxol-5-ilsulfonil)-pirrolidino-2-carboidrazida **LASSBio-1641** como um sólido amorfo de cor marrom, P.F. = 50-52°C, $R_f = 0,61$ metanol 100%.

20 **RMN de 1H à 200 MMHz, DMSO (δ -ppm):** 10,36 e 10,28 (1H, CONH); 7,50-7,10 (6H, m, H-4, H-20, H-21, H-22, H-23 e H-24); 6,98 (1H, s, H-7); 6,11 (2H, s, H-2); 5,25-4,25 (1H, m, H-12); 3,62 e 3,55 (2H, H-19); 3,50-3,20 (2H, m, H-9); 2,75-2,25 (11H, m, H-8, H-15, H-16, H-17 e H-18) e 2025-1,65 (4H, m, H-10 e H-11).

25 **RMN de ^{13}H à 50 MMHz, DMSO (δ -ppm):** 172,73 e 167,55 (C-13, C=O); 160,10 (C-14); 150,29 (C-1); 145,41 (C-3); 138,20 (C-20); 133,76 (C-6); 129,68 (C-5); 128,88 (C-21 e C-25); 128,29 (C-22 e C-24); 127,09 (C-23); 112,13 (C-4); 109,07 (C-7); 102,32 (C-2); 61,30 (C-19); 60,72 e 59,24 (C-12); 52,30 (C-17

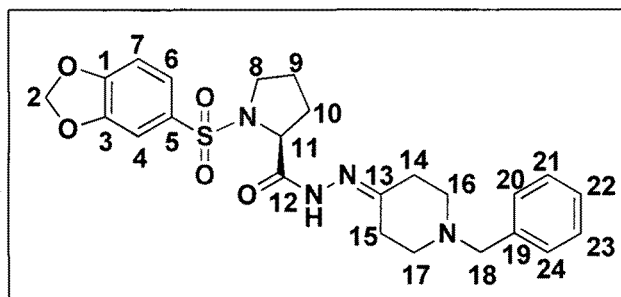
e C-18); 51,85 e 48,56 (C-9); 40,67 (C-15 e C-16); 34,17 e 31,34 (C-11); 27,45 e 24,64 (C-10) e 20,02 (C-8, CH₃).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ-ppm): 128,88 (C-21 e C-25); 128,30 (C-22 e C-24); 127,10 (C-23); 112,14 (C-4); 109,08 (C-7); 102,32 (C-2); 61,31 (C-19);
5 60,72 e 59,23 (C-12); 52,30 (C-17 e C-18); 51,83 e 48,54 (C-9); 40,67 (C-15 e C-16); 34,17 e 31,34 (C-11); 27,46 e 24,65 (C-10) e 20,02 (C-8).

[CLAE] Tempo de retenção (t_R) = 6,353 min. 98,20% (254 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 µL).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular
10 proposta = C₂₅H₃₀N₄O₅S. Massa Monoisotópica: 498,193691 m/z. [M + H] = 499,200967 m/z; [2M + H] = 997,394658 m/z. Massas encontradas: 499,2034 e 997,3936 m/z.

(S)-1-BENZO[d][1,3]DIOXOL-5-ILSULFONIL-N'-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO)PIRROLIDINO-2-CARBOIDRAZIDA (LASSBio-1830)
15



Partindo-se de 500 mg (1,59 mmol) da hidrazida correspondente e 2 equivalentes da *N*-benzilpiperidona, foram obtidos 607 mg (78,85%) de (S)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-ilsulfonil-*N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)pirrolidino-2-carbohidrazida **LASSBio-1830** como um óleo viscoso de cor laranja, R_f = 0,75 metanol 100%.

RMN de ¹H à 200 MMHz, DMSO (δ-ppm): 10,45 e 10,32 (1H, CONH); 7,50-7,00 (8H, m, H-4, H-6, H-7, H-20, H-21, H-22, H-23 e H-24); 6,17 (2H, s, H-2); 5,00-4,00 (1H, m, H-11); 3,59 e 3,54 (2H, H-18); 3,50-3,00 (2H, m, H-8); 2,75-2,25 (8H, m, H-14, H-15, H-16 e H-17) e 2,00-1,25 (4H, m, H-9 e H-10).

RMN de ¹³C à 50 MMHz, DMSO (δ-ppm): 172,79 e 167,57 (C-12, C=O); 160,35 (C-13); 151,35 (C-1); 148,11 (C-3); 138,15 (C-19); 130,36 (C-5); 128,93 (C-20 e C-24); 128,32 (C-21 e C-23); 127,14 (C-22); 123,26 (C-6); 108,49 (C-4); 107,33 (C-7); 102,66 (C-2); 61,31 (C-18); 60,74 e 60,07 (C-11); 52,31 (C-16)

e C-17); 51,90 e 49,10 (C-8); 40,67 (C-14 e C-15); 34,18 e 30,83 (C-10) e 27,48 e 24,50 (C-9).

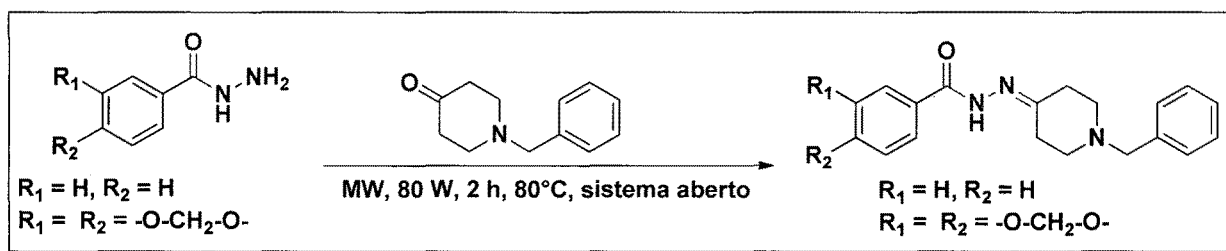
RMN de DEPT-135, DMSO (δ -ppm): 128,93 (C-20 e C-24); 128,32 (C-21 e C-23); 127,13 (C-22); 123,25 (C-6); 108,49 (C-4); 107,31 (C-7); 102,66 (C-2); 61,30 (C-18); 60,73 e 60,05 (C-11); 52,30 (C-16 e C-17); 51,89 e 49,09 (C-8); 40,67 (C-14 e C-15); 34,17 e 30,83 (C-10) e 27,48 e 24,49 (C-9).

[CLAE] Tempo de retenção (t_R) = 5,494 min. 98,80% (248 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μ L).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = $C_{24}H_{28}N_4O_5S$. Massa Monoisotópica: 484,178041 m/z. $[M + Na] = 507,167262$ m/z; $[2M + Na] = 991,345303$ m/z. Massas encontradas: 507,1665 e 991,3392 m/z.

Exemplo 7

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GERAL PARA PREPARAÇÃO DAS *N*-ACILIDRAZONAS MOLECULARMENTE SIMPLIFICADAS (LASSBio-1842) e *N'*-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO-BENZO[*d*][1,3]DIOXOLA-5-CARBOIDRAZIDA

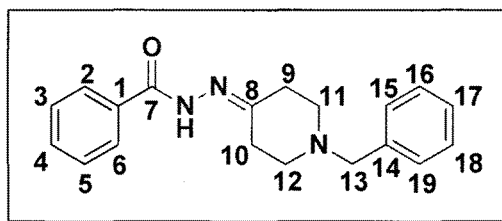


Em um tubo para reator de micro-ondas de Pyrex equipado com agitador magnético, adicionou-se 1 equivalente das hidrazidas sulfonamídicas correspondentes e 02 equivalentes da *N*-benzilpiperidona. Visando homogeneização, foram adicionados cerca de 5 mL de diclorometano ao tudo, agitou-se a mistura reacional por 2 minutos e o solvente foi então evaporado. O tubo foi colocado no reator de micro-ondas científico CEM Discover o qual foi programado com os seguintes parâmetros: Potência = 80 W, Temperatura = 80°C, Tempo = 2 horas e em sistema aberto. O fluxo de ar para resfriamento

do sistema foi usado somente para manter a temperatura (80°C) constante durante toda a reação.

Ao término da reação, o sistema foi resfriado até temperatura ambiente, resultando na formação das *N*-acilidrazonas correspondentes, as quais foram obtidas em grau de pureza adequado após lavagem com éter etílico em funil de buchner e remoção do solvente residual em bomba de alto vácuo.

***N'*-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO)BENZOIDRAZIDA (LASSBio-1842)**



Partindo-se de 700 mg (5,14 mmol) da benzohidrazida e 2 equivalentes da *N*-benzilpiperidona, a *N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)benzoidrazida **LASSBio-1842** foi obtida em rendimento quantitativo (1,58 g, 65,66%) como um sólido amorfo de cor laranja, P.F. = 142-144°C, R_f = 0,64 metanol 100%.

RMN de ¹H à 200 MMHz, DMSO (δ-ppm): 9,05 (1H, CONH); 7,70 (2H, d, H-2 e H-6, J³ = 6,94 Hz); 7,50-7,00 (8H, m, H-3, H-4, H-5, H-15, H-16, H-17, H-18 e H-19); 3,50 (2H, s, H-13) e 2,75-2,25 (8H, m, H-9, H-10, H-11 e H-12).

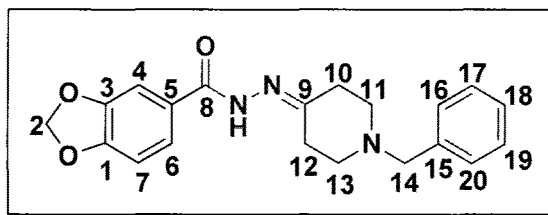
RMN de ¹³C à 50 MMHz, DMSO (δ-ppm): 164,36 e 160,65 (C-7, C=O); 138,09 (C-1 e C-8); 133,65 (C-14); 131,73 (C-2 e C-6); 129,00 (C-15 e C-19); 128,61 (C-3 e C-5); 128,36 (C-16 e C-18); 127,34 (C-4); 127,27 (C-17); 62,36 e 61,97 (C-13); 52,91 e 52,12 (C-11 e C-12) e 41,30 e 34,77 (C-9 e C-10).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ-ppm): 131,75 (C-2 e C-6); 129,02 (C-15 e C-19); 128,63 (C-3 e C-5); 128,38 (C-16 e C-18); 127,36 (C-4); 127,29 (C-17); 62,38 e 61,99 (C-13); 52,93 e 52,14 (C-11 e C-12) e 41,32 e 34,79 (C-9 e C-10).

[CLAE] Tempo de retenção (t_R) = 5,065 min. 96,74% (256 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μL).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = C₁₉H₂₁N₃O. Massa Monoisotópica: 307,168462 m/z. [M + Na] = 330,157683 m/z; [2M + Na] = 637,326146 m/z. Massas encontradas: 330,1588 e 637,3271 m/z.

N'-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO_BENZO[d][1,3]DIOXOLA-5-CARBOIDRAZIDA



Partindo-se de 150 mg (0,83 mmol) da benzo[d][1,3]dioxola-5-carbohidrazida e 2 equivalentes da *N*-benzilpiperidona, a *N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)benzo[d][1,3]dioxola-5-carbohidrazida foi obtida em rendimento quantitativo (292 mg, 78,85%) como um sólido amorfo de cor bege, P.F. = 118-120°C, R_f = 0,64 metanol 100%.

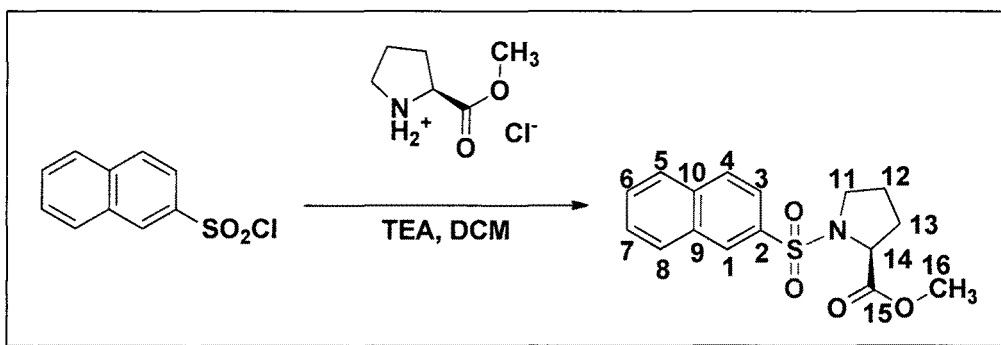
RMN de ¹H à 200 MHz, DMSO (δ-ppm): 8,86 (1H, s, CONH); 7,50-7,20 (7H, m, H-4, H-6, H-16, H-17, H-18, H-19 e H-20); 6,81 (1H, d, H-7, J³ = 8,59 Hz); 6,00 (2H, s, H-2); 3,56 (2H, s, H-14) e 2,75-2,25 (8H, m, H-10, H-11, H-12 e H-13).

RMN de ¹³C à 50 MHz, DMSO (δ-ppm): 168,06 (C-8, C=O); 150,69 (C-1); 148,01 (C-3); 138,15 (C-9); 129,07 (C-16 e C-20); 128,43 (C-17 e C-19); 127,66 (C-5); 127,34 (C-18); 121,72 (C-6); 108,14 (C-4 e C-7); 101,81 (C-2); 62,44 (C-14); 53,01 e 52,16 (C-11 e C-13) e 41,38 e 34,84 (C-10 e C-12).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ-ppm): 129,06 (C-16 e C-20); 128,42 (C-17 e C-19); 127,33 (C-18); 121,71 (C-6); 108,13 (C-4 e C-7); 101,80 (C-2); 62,43 (C-14); 53,00 e 52,15 (C-11 e C-13) e 41,37 e 34,83 (C-10 e C-12).

[CLAE] Tempo de retenção (t_R) = 5,063 min. 98,80% (269 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μL).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = C₂₀H₂₁N₃O₃. Massa Monoisotópica: 351,158292 m/z. [M + Na] = 374,147513 m/z; [2M + Na] = 725,305804 m/z. Massas encontradas: 374,1489 e 725,3062 m/z.

Exemplo 8**PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DO (S)-1-NAFTALEN-2-ILSULFONIL-PIRROLIDINA-2-CARBOXILATO DE METILA**

5

Em um balão de 250 mL de capacidade, contendo 415 mg (2,50 mmol) do cloridrato do éster metílico do aminoácido S-prolina em 0,46 mL de trietilamina, adicionou-se 23 mL de diclorometano e em seguida 567 mg (2,50 mmol) do cloreto de naftaleno-2-sulfonila. A mistura reacional foi agitada por 24 horas à temperatura ambiente, sendo adicionados mais 0,69 mL de trietilamina após uma hora do início da reação.

10

Ao final da reação, evidenciado por cromatografia em camada fina (CCF), o produto foi isolado após adição de 100 mL de diclorometano e extração com solução de HCl 10% (4 x 40 mL), seguido de extração com solução saturada de NaCl (3 x 80 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, seguido de evaporação do solvente para fornecer o (S)-1-naftalen-2-ilsulfonil-pirrolidina-2-carboxilato de metila em rendimento quantitativo (798 mg, 100%) como um sólido amorfo de cor marrom clara, P.F. = 81-83°C, R_f = 0,69 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

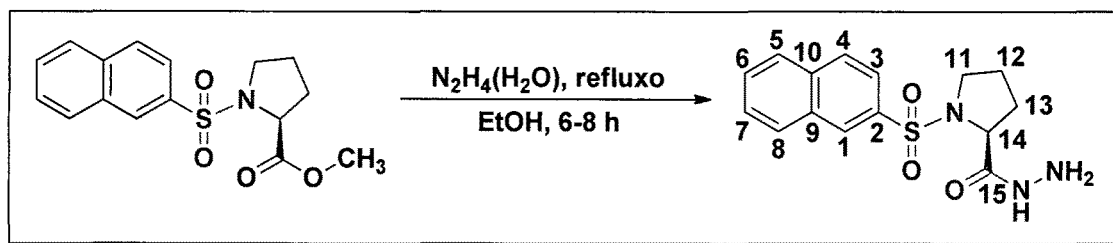
15

RMN de ¹H à 200 MHz, DMSO (δ-ppm): 8,36 (1H, s, H-1); 8,00-7,70 (4H, m, H-3, H-4, H-5 e H-8); 7,65-7,45 (2H, m, H-6 e H-7); 4,33 (1H, t, H-14, J³ = 7,66 Hz); 3,61 (3H, s, H-16); 3,55-3,20 (2H, m, H-11) e 2,10-1,50 (4H, m, H-12 e H-13).

20

RMN de ¹³C à 50 MHz, DMSO (δ-ppm): 172,66 (C-15); 135,47 (C-10); 135,03 (C-2); 132,29 (C-9); 129,42 (C-5); 128,90 (C-7); 128,02 (C-4 e C-8); 127,63 (C-6); 122,90 (C-1 e C-3); 60,57 (C-14); 52,49 (C-16); 48,61 (C-11); 31,04 (C-13) e 24,78 (C-12).

25

Exemplo 9**PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DA (S)-1-(NAFTALEN-2-ILSULFONIL)PIRROLIDINA-2-CARBOIDRAZIDA**

5

O (S)-1-naftalen-2-ilsulfonil-pirrolidina-2-carboxilato de metila (800 mg, 3,50 mmol) foi adicionado, em pequenas porções, a um balão de fundo redondo de 100 mL contendo 5 mL de hidrato de hidrazina (65%) em 15 mL de etanol sob agitação. A mistura reacional foi aquecida sob refluxo por 6-8 horas.

10 Ao término da reação, adicionou-se 40 mL de água gelada e o balão foi colocado em banho de gelo por 30 min, o que resultou na precipitação da (S)-1-(naftalen-2-ilsulfonil)pirrolidina-2-carbohidrazina em 37,50% (300 mg) de rendimento como um sólido amorfo de cor marrom clara, P.F. = 145-147°C, Rf = 0,23 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

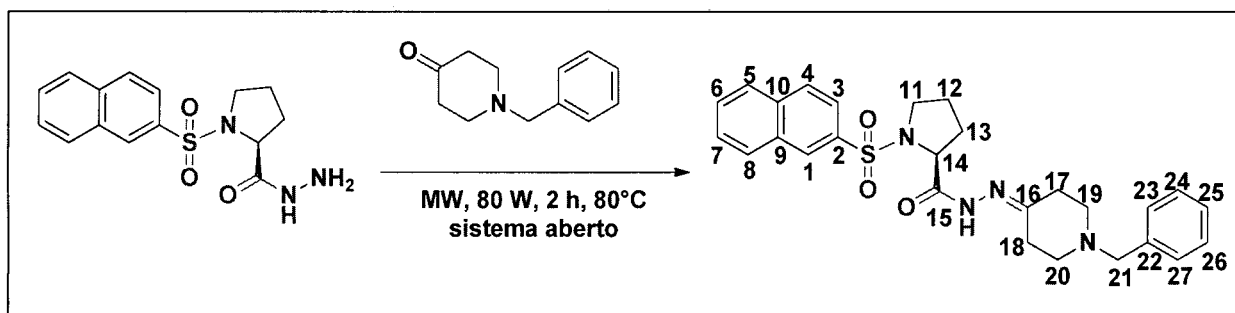
15 **RMN de ¹H à 200 MHz, DMSO (δ-ppm):** 8,36 (1H, s, H-1); 8,80-8,10 (1H, s, CONH); 8,00-7,70 (4H, m, H-3, H-4, H-5 e H-8); 7,70-7,50 (2H, m, H-6 e H-7); 4,205 (1H, dd, H-14, J³ = 8,41 e J⁴ = 3,15 Hz); 4,00-3,00 (2H, s, NHNH₂); 3,75-3,00 (2H, m, H-11); 2,25-1,25 (3H, m, H-12 e H-13).

20 **RMN de ¹³C à 50 MHz, DMSO (δ-ppm):** 171,72 (C-15); 135,29 (C-10); 132,95 (C-2); 132,34 (C-9); 129,90 (C-5); 129,65 (C-7); 129,54 (C-4); 129,38 (C-8); 128,13 (C-6); 128,03 (C-3); 122,86 (C-1); 62,01 (C-14); 49,99 (C-11); 30,32 (C-13) e 24,56 (C-12).

Exemplo 10

25

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DA (S)-N'-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENE)-1-(NAFTALEN-2-ILSULFONIL)PIRROLIDINA-2-CARBOIDRAZIDA (LASSBio-1844)



Em um tubo para reator de micro-ondas de Pyrex equipado com agitador magnético, adicionou-se 300 mg (0,94 mmol) da (S)-1-(naftalen-2-ilsulfonil)pirrolidina-2-carboidrazina e 02 equivalentes da N-benzilpiperidona. Visando homogeneização, foram adicionados cerca de 5 mL de diclorometano ao tudo, agitou-se a mistura reacional por 2 minutos e o solvente foi então evaporado. O tubo foi colocado no reator de micro-ondas científico CEM Discover, o qual foi programado com os seguintes parâmetros: Potência = 80 W, Temperatura = 80°C, Tempo = 2 horas e em sistema aberto. O fluxo de ar para resfriamento do sistema foi usado somente para manter a temperatura constante (80°C) durante toda a reação.

Ao término da reação, o sistema foi resfriado até temperatura ambiente, resultando na formação da (S)-N'-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)-1-(naftalen-2-ilsulfonil)pirrolidina-2-carboidrazida **LASSBio-1844**. Em seguida, o produto foi lavado com éter etílico em funil de buchner e o solvente residual foi removido em bomba de alto vácuo, fornecendo **LASSBio-1844** em 77,15% (414 mg) de rendimento como um óleo viscoso de cor marrom clara, R_f = 0,64 metanol 100%.

RMN de ¹H à 200 MMHz, DMSO (δ-ppm): 10,46 e 10,33 (1H, CONH); 8,51 e 8,46 (1H, H-1); 8,30-7,80 (4H, m, H-3, H-4, H-5 e H-8); 7,33 (5H, m, H-23, H-24, H-25, H-26 e H-27); 5,075 e 4,375 (1H, m, H-14); 3,60 e 3,54 (2H, H-21); 3,70-3,30 (2H, m, H-11); 2,75-2,25 (8H, m, H-17, H-18, H-19 e H-20) e 2,00-1,30 (4H, m, H-12 e H-13).

RMN de ¹³C à 50 MMHz, DMSO (δ-ppm): 172,55 e 167,27 (C-15, C=O); 160,41 (C-16); 138,17 (C-22); 134,45 (C-10); 131,75 (C-2); 129,43 (C-9); 129,37 (C-5); 128,97 (C-7); 128,78 (C-4); 128,71 (C-8); 128,20 (C-23 e C-27); 127,84 (C-24 e C-26); 127,84 (C-6); 127,63 (C-3); 127,00 (C-25); 122,68 (C-1);

61,22 (C-21); 60,64 e 60,09 (C-14); 53,01 e 52,22 (C-19 e C-20); 51,82 e 49,07 (C-11); 40,61 (C-17 e C-18); 34,13 e 30,80 (C-13); 27,45 e 24,34 (C-12).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ -ppm): 129,37 (C-5); 128,97 (C-7); 128,78 (C-4); 128,71 (C-8); 128,20 (C-23 e C-27); 127,84 (C-24 e C-26); 127,84 (C-6); 127,63 (C-3); 127,00 (C-25); 122,68 (C-1); 61,22 (C-21); 60,64 e 60,09 (C-14); 53,01 e 52,22 (C-19 e C-20); 51,82 e 49,07 (C-11); 40,61 (C-17 e C-18); 34,13 e 30,80 (C-13); 27,45 e 24,34 (C-12).

[CLAE] Tempo de retenção (t_R) = 8,936 min. 97,89% (254 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μ L).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = $C_{27}H_{30}N_4O_3S$. Massa Monoisotópica: 490,203862 m/z. $[M + H] = 491,211138$ m/z; $[M + Na] = 513,193083$ m/z; $[2M + H] = 981,5000$ m/z; $[2M + Na] = 1003,396944$ m/z. Massas encontradas: 491,2134; 513,1955; 981,4123 e 1003,3939 m/z.

15 Avaliação Farmacológica

Atividade inibitória da migração de neutrófilos de LASSBio-1641 e LASSBio-1642

Observou-se aumento significativo no número de leucócitos totais recuperados no lavado broncoalveolar dos animais desafiados com LPS, indicando que a provocação com LPS resultou na mobilização maciça de neutrófilos para os pulmões. Nos animais tratados com **LASSBio-1641** ou **LASSBio-1642**, houve inibição significativa dessa mobilização quando comparado com o grupo não tratado e desafiado com LPS (**Figura 4**). Dessa forma, ambos os compostos testados são capazes de atenuar significativamente a migração de neutrófilos para o foco da lesão, assim como também podemos observar que a inibição da migração celular para o tecido pulmonar no grupo tratado com **LASSBio-1642** apresentou tendência de maior inibição do infiltrado, embora não se tenha encontrado diferença estatisticamente significativa na comparação dos efeitos exibidos pelos dois grupos submetidos a tratamento com os compostos **LASSBio-1641** ou **LASSBio-1642** (**Figura 5**).

Atividade inibitória da hiper-reatividade das vias aéreas e elastância pulmonar das vias aéreas periféricas de LASSBio-1641 e LASSBio-1642

Visto que a hiper-reatividade das vias aéreas é uma das principais características da asma, os derivados **LASSBio-1641** e **LASSBio1642** foram avaliados em um modelo experimental de asma em camundongos. Com base nos resultados obtidos, também podemos destacar que a estimulação com LPS resultou em hiper-reatividade das vias aéreas, como mostrado através das respostas de aumento de resistência pulmonar (**Figura 6**) e elastância pulmonar (**Figura 7**), geradas após aerolização de doses crescentes de metacolina. O tratamento intraperitoneal com o derivado **LASSBio-1642** na dose de 100 $\mu\text{mol/Kg}$ inibiu a resposta de hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina, bem como as alterações relacionadas ao aumento de elastância pulmonar (vias aéreas periféricas). Também foi observada a tendência de proteção dessas alterações dos animais tratados com **LASSBio-1641** na dose de 100 $\mu\text{mol/Kg}$, apesar dos valores não serem estatisticamente significativos.

15 **Efeito do composto LASSBio-1765 nas alterações patológicas associadas à inflamação alérgica pulmonar**

Utilizando modelo experimental de asma em camundongos, o tratamento intraperitoneal com **LASSBio-1765** foi avaliado quanto a sua capacidade de modificar o quadro de hiperreatividade brônquica observada nesse modelo. Notou-se que camundongos desafiados por via intranasal com OVA apresentaram uma alteração significativa na função pulmonar, dados estes atestados pelo aumento da resistência das vias aéreas (**Figura 8**) e elastância pulmonar (**Figura 9**), após provocação com metacolina, quando comparados aos animais controles (desafiados com salina).

25 O tratamento com o **LASSBio-1765**, nas doses de 50 e 100 $\mu\text{mol/Kg}$, não alteraram os valores basais de resistência e elastância pulmonares. Entretanto, ambas as doses (50 e 100 $\mu\text{mol/Kg}$) inibiram a hiper-reatividade das vias aéreas, revelada após aerossolização com metacolina.

30 **Avaliação de LASSBio-1765 quanto ao perfil leucocitário no lavado broncoalveolar (BAL)**

O próximo passo, então, foi avaliar o perfil leucocitário presente no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos desafiados com OVA. A provocação alérgica causou um claro aumento no número de leucócitos totais (**Figura 10A**) recuperados no BAL, quando comparado aos camundongos

desafiados apenas com salina. Este aumento se deu principalmente pela migração de eosinófilos (**Figura 10D**) e neutrófilos (**Figura 10E**) para o espaço broncoalveolar. Não foi observada diferença significativa quando avaliamos a população de macrófagos (**Figura 10B**) e linfócitos (**Figura 10C**) no BAL de camundongos desafiados com OVA quando comparados aos animais salina. Também podemos observar que apenas a dose de 100 µmol/Kg de **LASSBio-1765**, foi capaz de inibir de forma significativa o número de leucócitos totais, em eosinófilos e neutrófilos no BAL de camundongos desafiados com OVA.

Avaliação de LASSBio-1765 quanto ao perfil da resposta quanto ao bloqueio de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas

Para complementação dos dados acerca da interferência desse tratamento na inflamação pulmonar alérgica, avaliamos o perfil de resposta do **LASSBio-1765** quanto ao potencial bloqueio de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Para isso, usamos o método de ELISA, através do qual quantificou-se IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina-1 em extratos do tecido pulmonar.

Observamos que o composto **LASSBio-1765**, tanto na dose de 50 µmol/kg, quanto na dose de 100 µmol/kg não modificou os níveis aumentados de IL-5, IL-13 e eotaxina-1, enquanto que os valores de IL-4 permaneceram inalterados mesmo no grupo não tratado (**Figura 11**).

Avaliação de LASSBio-1765 quanto a inibição da produção de muco nas vias aéreas

Os animais provocados, semanalmente, com ovoalbumina apresentaram mudanças estruturais relevantes como a hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes, provocando um aumento significativo na produção de muco, quando comparado ao animais desafiados com salina. O tratamento com **LASSBio-1765** nas doses de 50 µmol/kg e 100 µmol/kg (**Figura 12**), em animais desafiados durante quatro semanas, inibiu, significativamente, a produção de muco nas vias aéreas, como mostrado na **Figura 13** (C e D), respectivamente.

Efeito de LASSBio-1765 na mobilização de eosinófilos *in vitro*

Por último, investigou-se o efeito do **LASSBio-1765** (1 µM e 10 µM) na resposta quimiotática de eosinófilos isolados da cavidade peritoneal de ratos normais expostos ao gradiente quimiotático de eotaxina-1 *in vitro*. Como ilustrado na **Figura 14**, a estimulação com eotaxina-1 murina foi capaz de

aumentar de forma significativa o número de eosinófilos migrados à 30 µm da superfície de contato do filtro de nitrocelulose, posto na interface entre o compartimento contendo a solução de eotaxina e aquele contendo as células. Embora o tratamento das células com o veículo (meio + PEG 0.01%) tenha apresentado uma tendência (não significativa) de reduzir a resposta quimiotática induzida pela quimiocina, a presença do composto **LASSBio-1765**, nas duas concentrações estudadas, reduziu ainda mais essa resposta, inibindo completamente a migração dos eosinófilos.

10 Metodologias utilizadas para os bioensaios

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INTI-INFLAMATÓRIO DOS DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS LASSBIO-1641 E LASSBIO-1642

Os derivados **LASSBio-1641** e **LASSBio-1642** foram avaliados quanto aos seus respectivos efeitos no tratamento sobre o infiltrado de leucócitos nas vias aéreas de camundongos provocados com lipopolissacarídeo (LPS) por instilação intranasal. Avaliou-se também a repercussão desses tratamentos sobre a resposta de hiperreatividade brônquica, que está fortemente associada ao infiltrado inflamatório pulmonar.

Foram utilizados camundongos fêmeas da cepa A/J, pesando entre 17 e 19 g, obtidos da unidade de criação da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram alojados nas caixas em grupos de 5 com suprimento de água e comida, sem restrições, em ambiente com temperatura controlada entre 22 e 25°C e 12h (06:00 – 18:00) de luz. Os procedimentos que envolvem o cuidado e uso de animais de laboratório foram previamente examinados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Fundação Oswaldo Cruz (Licença da CEUA - FIOCRUZ LW23/10, Rio de Janeiro, Brasil).

Foram feitos gráficos no programa GraphPad Prism 5.0. Os dados foram expressos como média e erro padrão da média, e analisados estatisticamente através do teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni. Os valores de *P* inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

INFLAMAÇÃO PULMONAR POR LPS E TRATAMENTOS

Os animais foram anestesiados com halotano (aerossol) para a provocação por instilação nasal com LPS (25 µg/25 µL) ou solução salina

(controle negativo), sendo as análises realizadas 18 h depois. Os compostos **LASSBio-1641** e **LASSBio-1642** foram dissolvidos em solução de NaCl 0.9% (salina) contendo 0,2% de Tween 80 imediatamente antes do uso. O tratamento foi feito por via intraperitoneal (*i.p.*) 1 hora antes de desafio com LPS.

AVALIAÇÃO DA HIPER-REATIVIDADE DAS VIAS AÉREAS

A reatividade à metacolina aerossolizada foi medida utilizando-se pletismografia barométrica de corpo inteiro, pelo método invasivo de monitoramento da função pulmonar. Os animais foram anestesiados com nembutal (60 mg/Kg, *i.p.*) curarizados com brometo de pancurônio (Pavulon, 1 mg/ kg), e em seguida foram traqueostomizados e ventilados mecanicamente. O pneumotacógrafo acoplado à câmara pletismográfica capturou o fluxo respiratório e o transdutor ligado à câmara permitiu que os dados coletados do fluxo fossem transferidos para o computador. O software BioSystem XA processou os dados determinando parâmetros como resistência e elastância. Para analisar o desenvolvimento da hiper-reatividade das vias aéreas, os animais foram submetidos sequencialmente aos aerossóis de PBS e concentrações crescentes de metacolina (3, 9 e 27 mg/mL), em intervalos de 5 minutos.

LAVAGEM BRONCIALVEOLAR (BAL) E CONTAGEM DOS LEUCÓCITOS

Após serem submetidos às medidas de hiper-reatividade, os camundongos foram sacrificados para a realização da lavagem broncoalveolar (BAL). O procedimento consiste na injeção nas vias aéreas de um volume de 800 µL de PBS, contendo EDTA (10 mM), através da traqueia, seguido da aspiração do mesmo. O volume de 2 lavagens foi centrifugado (1500 RPM / 10 min), sendo o sedimento celular ressuspensionado em um volume final de 250 µl de PBS contendo EDTA (10 mM).

Foi realizada a contagem do número de leucócitos totais em câmara de Neubauer. Além disso, foi feita a citocentrifugação da amostra utilizando-se 100 µl de lavado broncoalveolar. Os citocentrifugados foram corados com May-Grunwald e GIEMSA. Após a coloração foi feita a contagem diferencial de leucócitos.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INTI-INFLAMATÓRIO DO DERIVADO N-ACILIDRAZÔNICO LASSBIO-1765 EM MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA

Para a avaliação do potencial anti-inflamatório do derivado *N*-acilidrazônoco **LASSBio-1765** em modelo experimental de asma, foram utilizados camundongos fêmeas da cepa A/J, pesando entre 17g e 20g, e ratos Wistar pesando entre 250-300 g, obtidos da unidade de criação da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram alojados nas caixas em grupos de 5 com suprimento de água e comida, sem restrições, em ambiente com temperatura controlada entre 22°C e 25°C e 12h (06:00 – 18:00) de luz. Os procedimentos que envolvem o cuidado e uso de animais de laboratório foram examinados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA - LW23/10).

O tratamento estatístico dos resultados foi feito no programa GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média, e analisados estatisticamente através do teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keuls. Os valores de *p* inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos. Para a comparação entre dois grupos experimentais foi utilizado teste “t” de Student para amostras não pareadas. Os valores de *p* inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

SENSIBILIZAÇÃO, DESAFIO ANTIGÊNICO E TRATAMENTOS

Os camundongos foram sensibilizados com duas injeções subcutâneas dorsais, de 50 µg de ovoalbumina (OVA) em 0,2 mL de salina estéril (NaCl 0,9%) nos dias 0 e 7. A partir do 14º dia, os animais foram anestesiados com aerossol de halotano e submetidos ao desafio intranasal de OVA (50 µg/25 µL de salina), administrada uma vez por semana durante quatro semanas. Os animais controle foram desafiados apenas com solução de salina.

Os animais foram tratados com **LASSBio-1765** a partir da terceira semana de desafio antigênico nas doses de 50 µmol/kg e 100 µmol/kg, sendo cada dose correspondente a um grupo. O tratamento, por via intra-peritoneal, foi administrado 1 hora antes de cada instilação intranasal de OVA. O grupo controle foi apenas desafiado com solução de salina (NaCl 0,9%). A solubilização do composto **LASSBio-1765** foi feita com Tween 80 (0,2%) e salina (0,9%), imediatamente antes da administração nos animais.

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO PULMONAR E HIPER-REATIVIDADE DAS VIAS AÉREAS

Para avaliação da função pulmonar foi utilizado o sistema de pletismografia de corpo inteiro, sistema invasivo (sistema Buxco). Os animais foram anestesiados com nembusal (60 mg/Kg, *i.p.*) curarizados com brometo de pancurônio (Pavulon, 1 mg/kg), e em seguida foram traqueostomizados e ventilados mecanicamente. O pneumotacógrafo acoplado à câmara pletismográfica capturou o fluxo respiratório e o transdutor ligado à câmara permitiu que os dados coletados do fluxo fossem transferidos para o computador. O software BioSystem XA processou os dados determinando parâmetros como resistência das vias aéreas e elastância pulmonar. Para avaliar o fenômeno de hiper-reatividade das vias aéreas, os animais foram submetidos ao agente broncoconstritor metacolina a concentrações crescentes de metacolina (3, 9 e 27 mg/mL), em intervalos de 5 minutos cada.

TÉCNICA DE LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL)

A lavagem broncoalveolar foi realizada utilizando-se cânula de polietileno inserida na traquéia onde, um volume total de 1,5 mL de solução salina tamponada (PBS) contendo EDTA (10 mM), foi administrado. As amostras foram centrifugadas a 1500 RPM por 10 min e o sobrenadante recolhido e congelado para posterior quantificação de mediadores. O "pellet" celular foi ressuspenso em 0,25 mL (PBS+EDTA) para que fosse realizada a avaliação celular.

CONTAGEM DE LEUCÓCITOS

Leucócitos totais foram analisados mediante diluição das amostras em líquido de Türk (1:10) e a contagem realizada em câmara de Neubauer utilizando-se microscópio de luz. Para a análise diferencial, foram utilizados citoesfregaços corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa, e a avaliação celular feita utilizando-se objetiva de imersão em óleo mineral.

QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS

Os níveis das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e da quimiocina eotaxina-1 foram quantificados por "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA), utilizando-se amostras do tecido pulmonar que foram homogeneizados em 1 mL de PBS, contendo um coquetel de inibidores de proteases (complete-Roche) e centrifugados a 4° C por 15 min a 10.000 g. Os sobrenadantes foram

quantificados usando kits comerciais, seguindo as instruções recomendadas. Para recobrir a placa de 96 poços utilizou-se o anticorpo capturador (nas concentrações recomendadas nos kits), processo realizado por 18 h à temperatura ambiente. A placa foi lavada em tampão "*Coat Buffer*" e bloqueada com PBS-BSA 1% (250 µl por poço), permanecendo em contato com o anticorpo capturador durante 1 h. Após esta incubação outra lavagem foi realizada, seguida da aplicação das amostras e dos padrões com diluição seriada nas concentrações indicadas nos kits (R&D Systems), permanecendo durante 18 h na temperatura de 4°C. Na sequência, a placa foi lavada com tampão "*Assay Buffer*" para posterior adição do anticorpo de detecção, permanecendo incubada por 1 h. Decorrido este tempo, a placa foi novamente lavada com o mesmo tampão e adicionou-se a enzima estreptoavidina, por 1 h. O substrato (K-Blue) foi adicionado e a reação foi interrompida com H₂SO₄ (0,19 M). A leitura da placa foi realizada com a utilização de um espectrofotômetro (450 nm). Os resultados obtidos foram expressos por ng/mg de proteína.

CONFECCÃO DOS CORTES PARA A ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após o teste de hiperreatividade brônquica, os camundongos foram sacrificados, a cavidade peritoneal foi aberta e em seguida a aorta abdominal foi cortada para a liberação do sangue retido. Para a retirada do sangue presente no pulmão, foi utilizada a técnica de perfusão, na qual foi inserido um cateter no ventrículo direito do coração, por onde foi gotejada uma solução de salina com EDTA (20 mM). Em seguida, o pulmão foi retirado e fixado em formalina-Milloning incluído em parafina, seccionado em micrótomo (5 µm) e os fragmentos foram corados em Ácido Periódico de Schiff (PAS) (cora componentes do muco em tonalidade que varia entre púrpura e magenta).

QUANTIFICAÇÃO DO MUCO POR MORFOMETRIA DIGITAL

A análise morfométrica digital foi realizada com o auxílio de microscópio de luz, Olympus BX50, acoplado a uma câmera de vídeo e a um sistema de análise de imagens (software-image Pro-plus). As imagens das vias áreas coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) foram obtidas com o auxílio de objetiva de 40 x, digitalizadas e armazenadas no computador. O software de

análise de imagens permitiu gravar padrões específicos de coloração magenta relacionada à presença de muco nas vias aéreas. Durante a análise de cada imagem digitalizada, delimitou-se a área do epitélio brônquico para quantificar a produção de muco nas células caliciformes. Para cada animal foram analisadas
5 pelo menos oito vias aéreas.

CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

Foi retirada uma alíquota da suspensão celular e adicionado turkey para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. Para a identificação dos diferentes subtipos leucocitários presentes na cavidade peritoneal foram
10 preparados citocentrifugados (Citospin), corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa. Para a confecção dos esfregaços foi utilizado o volume de 100 μ L contendo, aproximadamente, 10^5 células. A contagem foi realizada em microscópio óptico e objetiva de imersão em óleo, contando 100 células por esfregaço. Com isso, fez-se a obtenção do número total de eosinófilos
15 purificados e de seu respectivo grau de pureza (\square 70%).

ESTÍMULO QUIMIOTÁXICO

Para estimulação do processo de migração dos eosinófilos, utilizou-se a Eotaxina murina na concentração de 10^{-7} M, cuja diluição foi feita em solução RPMI (5,2 g/L), contendo bicarbonato de sódio (1 g/L) e Hepes (3,9 g/L).
20 Incubação dos eosinófilos com o veículo apenas foi utilizado como controle negativo de migração celular.

TRATAMENTO DOS EOSINÓFILOS COM LASSBIO-1765

Foram adicionados 2×10^5 células em 50 μ L de RPMI no grupo sem tratamento e, no grupo tratado, 50 μ L contendo 2×10^5 células mais PEG 0,01%
25 ou 2×10^5 células mais **LASSBio-1765** nas concentrações de 10^{-5} M ou 10^{-6} M. Foram colocados em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 , a 37°C por um tempo de 10 min.

QUIMIOTAXIA EM CÂMARA DE BOYDEN MODIFICADA

30 Para a avaliação da resposta quimiotática dos eosinófilos *in vitro*, utilizou-se o sistema de câmara de Boyden modificada de 48 poços (NeuroProbe Inc.). Esta câmara é composta por dois compartimentos: um inferior, com poços que comportam o volume de 29 μ L, no qual são colocados o estímulo quimiotático, e seu respectivo veículo; e, um compartimento superior, no qual são

depositados os eosinófilos com total de 2×10^5 células/50 μ L. No processo de montagem da câmara, sobre o compartimento inferior foi colocado um filtro de nitrocelulose com poro de 3 μ m, previamente umedecido em RPMI, e sobre este uma membrana de silicone (gasket). O compartimento superior foi, então, colocado sobre o sistema acima descrito, e, por meio de parafusos, foi firmemente fixado.

Após a colocação de uma lâmina sobre a câmara, visando impedir a evaporação, esta foi incubada a 37°C, por 2 h, em estufa contendo atmosfera de 5% CO₂.

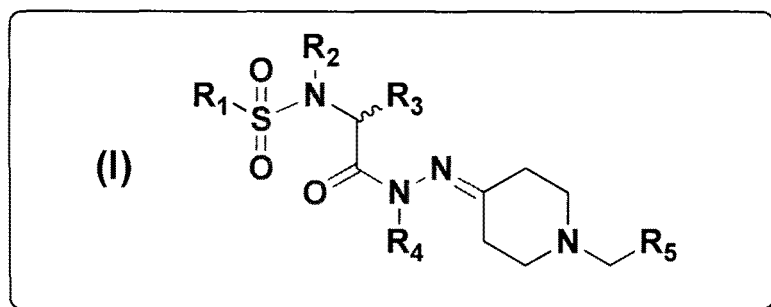
10 **CONTAGEM CELULAR NO FILTRO**

Para a montagem do filtro para contagem, fez-se a colocação do mesmo sobre uma lâmina própria para microscopia, e com auxílio de bálsamo entellan, fixou-se uma lamínula. A contagem dos eosinófilos foi realizada em microscópio óptico e objetiva de imersão em óleo. Os resultados foram expressos como o número de eosinófilos contados em 15 campos consecutivos a uma distância fixa de 30 μ m da superfície do filtro.

Reivindicações

1. Uso de derivados (((piperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil) sulfonamídicos funcionalizados e seus isómeros, de estrutura geral (I):

5



Esquema (I)

R_1 e R_5 são: fenila, 2-fluorofenila, 3-fluorofenila, 4-fluorofenila, 2,3-difluorofenila, 3,4-difluorofenila, 2-clorofenila, 3-clorofenila, 4-clorofenila, 2,3-diclorofenila, 3,4-clorofenila, 2-bromofenila, 3-bromofenila, 4-bromofenila, 2,3-dibromofenila, 3,4-dibromofenila, 2-metilfenila, 3-metilfenila, 4-metilfenila, 2,3-dimetilfenila, 3,4-dimetilfenila, 1-naftila, 2-naftila, 5-quinoxalina, 6-quinoxalina, 5-benzo[d][1,3]dioxola e 5-(6-metilbenzo[d][1,3]dioxola).

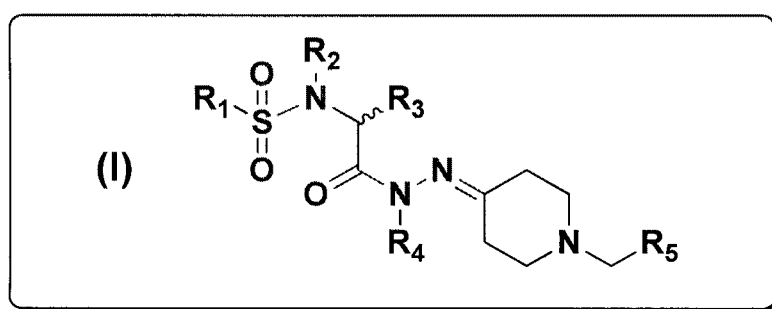
R_2 e R_3 são substituídos de forma que entre o átomo de enxofre e o átomo de nitrogênio ligado a R_4 , estejam internalizados na estrutura geral (I) os seguintes aminoácidos: Sarcosina, Glicina, *D*-Prolina, *L*-Prolina, *D*-Alanina, *L*-Alanina, *D*-Leucina, *L*-Leucina, *D*-Isoleucina, *L*-Isoleucina, *D*-Cisteína, *L*-Cisteína, *D*-Metionina, *L*-Metionina, *D*-Arginina, *L*-Arginina, *D*-Homoarginina, *L*-Homoarginina, *D*-Lisina, *L*-Lisina, *D*-Tryptofano, *L*-Tryptofano, *D*-Serina, *L*-Serina, *D*-Ácido Aspártico, *L*-Ácido Aspártico, *D*-Ácido Glutâmico, *L*-Ácido Glutâmico, *D*-Tryptofano, *L*-Tryptofano, *D*-Asparagina, *L*-Asparagina, *D*-Fenilalanina, *L*-Fenilalanina, *D*-Histidina, *L*-Histidina, *D*-Tirosina, *L*-Tirosina, *D*-Valina, *L*-Vanila, *D*-Glutamina, *L*-Glutamina.

R_4 é hidrogênio, metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutila, sec-butila e benzila.

2. Uso, conforme qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que os referidos derivados são anti-inflamatórios e antiasmáticos com ação

inibitória sobre neutrófilos e eosinófilos destinados ao tratamento dos sintomas da inflamação crônica, em mamíferos, preferencialmente humanos.

3. Uso, conforme reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o referido tratamento destina-se ao alívio dos sintomas da inflamação crônica em mamíferos, preferencialmente humanos. Especificamente, objetivando o tratamento da asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e rinite alérgica.
4. Uso, conforme reivindicação 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que os referidos derivados são anti-inflamatórios e antiasmáticos, com ação inibitória sobre o teor de leucócitos em neutrófilos e eosinófilos, destinados ao tratamento do processo inflamatório associado a asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e rinite alérgica.
5. Composições farmacêuticas destinadas ao tratamento do processo inflamatório associado a asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e rinite alérgica, caracterizadas por compreender pelo menos um carreador e/ou diluente farmacêuticamente aceitável e derivados (((piperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil) sulfonamídicos funcionalizados e seus isómeros, de estrutura geral (I):



Esquema (I)

- R_1 e R_5 são: fenila, 2-fluorofenila, 3-fluorofenila, 4-fluorofenila, 2,3-difluorofenila, 3,4-difluorofenila, 2-clorofenila, 3-clorofenila, 4-clorofenila, 2,3-diclorofenila, 3,4-clorofenila, 2-bromofenila, 3-bromofenila, 4-bromofenila, 2,3-dibromofenila, 3,4-dibromofenila, 2-metilfenila, 3-metilfenila, 4-metilfenila, 2,3-dimetilfenila, 3,4-

dimetilfenila, 1-naftila, 2-naftila, 5-quinoxalina, 6-quinoxalina, 5-benzo[d][1,3]dioxola e 5-(6-metilbenzo[d][1,3]dioxola).

R₂ e **R₃** são substituídos de forma que entre o átomo de enxofre e o átomo de nitrogênio ligado a **R₄**, estejam internalizados na estrutura geral (I) os seguintes

5 aminoácidos: Sarcosina, Glicina, *D*-Prolina, *L*-Prolina, *D*-Alanina, *L*-Alanina, *D*-Leucina, *L*-Leucina, *D*-Isoleucina, *L*-Isoleucina, *D*-Cisteína, *L*-Cisteína, *D*-Metionina, *L*-Metionina, *D*-Arginina, *L*-Arginina, *D*-Homoarginina, *L*-Homoarginina, *D*-Lisina, *L*-Lisina, *D*-Tryptofano, *L*-Tryptofano, *D*-Serina, *L*-Serina, *D*-Ácido Aspártico, *L*-Ácido Aspártico, *D*-Ácido Glutâmico, *L*-Ácido
10 Glutâmico, *D*-Tryptofano, *L*-Tryptofano, *D*-Asparagina, *L*-Asparagina, *D*-Fenilalanina, *L*-Fenilalanina, *D*-Histidina, *L*-Histidina, *D*-Tirosina, *L*-Tirosina, *D*-Valina, *L*-Vanila, *D*-Glutamina, *L*-Glutamina.

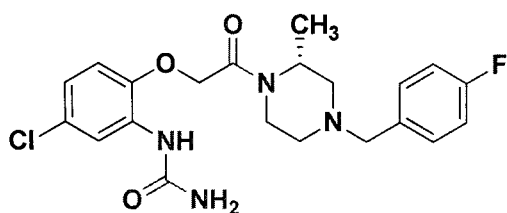
R₄ é hidrogênio, metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutyla, sec-butyla e benzila.

15

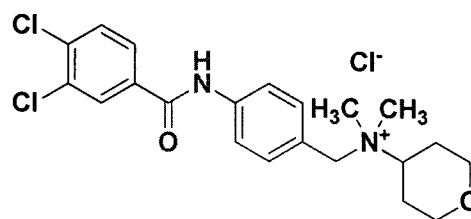
6. Processo para a preparação dos derivados (((piperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil) sulfonamídicos funcionalizados e seus isósteros descritos na reivindicação 1, caracterizado por compreender as etapas de:

- 20 - Substituição eletrofílica aromática (formação dos sulfonatos de potássio);
- Cloração (formação dos cloretos de sulfonila);
- Esterificação da glicina (formação de ésteres de aminoácidos da forma de cloridratos);
- Adição nucleofílica à sulfona (formação das sulfonamidas);
- 25 - Reação de hidrazinólise de ésteres (formação de hidrazidas);
- Condensação entre hidrazidas e cetonas (formação de N-acilidrazonas).

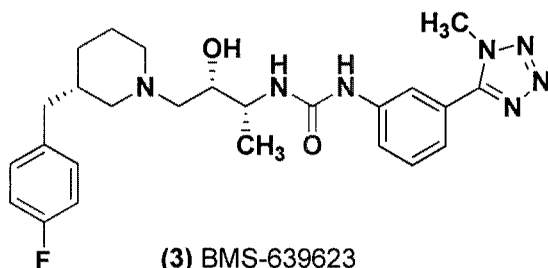
FIGURA 1



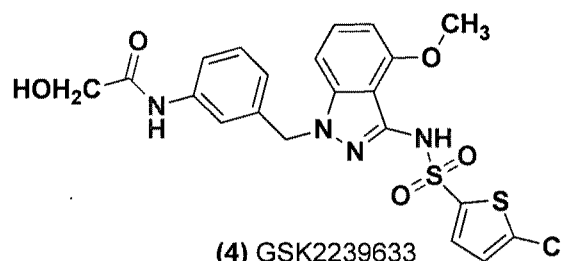
(1) BX471
 K_i (CCR1) = 1 nM
 Fase II (esclerose múltipla)
 Sem eficácia



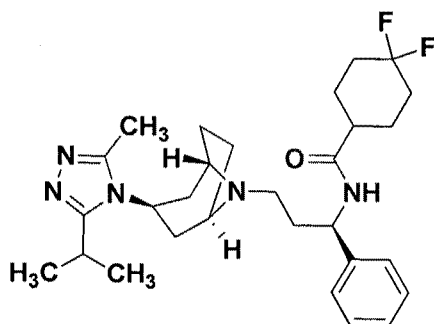
(2) JNJ-17166864
 IC_{50} (CCR2) = 20 nM
 Fase II (rinite alérgica)
 Sem eficácia



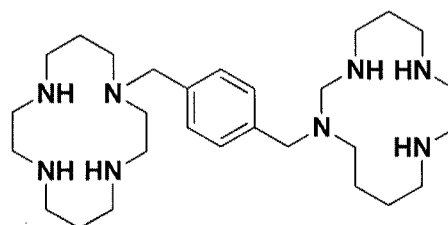
(3) BMS-639623
 IC_{50} (CCR3) = 0,3 nM
 Fase I (asma)
 Em andamento



(4) GSK2239633
 K_i (CCR4) = 10 nM
 Fase I (asma)
 Em andamento



(5) Maraviroc
 IC_{50} (CCR5) = 3 nM
 Fármaco registrado
 (AIDS)



(6) Plerixafor
 IC_{50} (CXCR4) = 74 nM
 Fármaco registrado
 (mieloma múltiplo / linfoma não-Hodgkin)

FIGURA 2

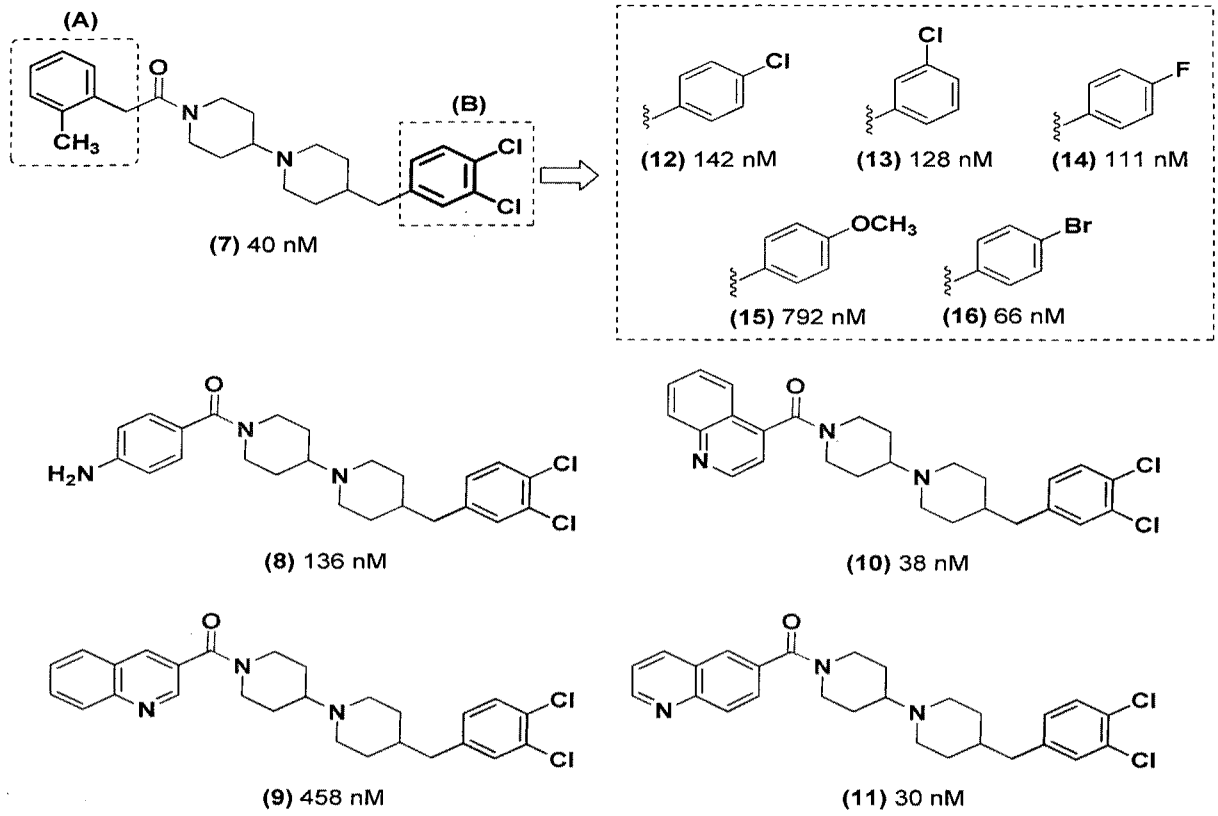


FIGURA 3

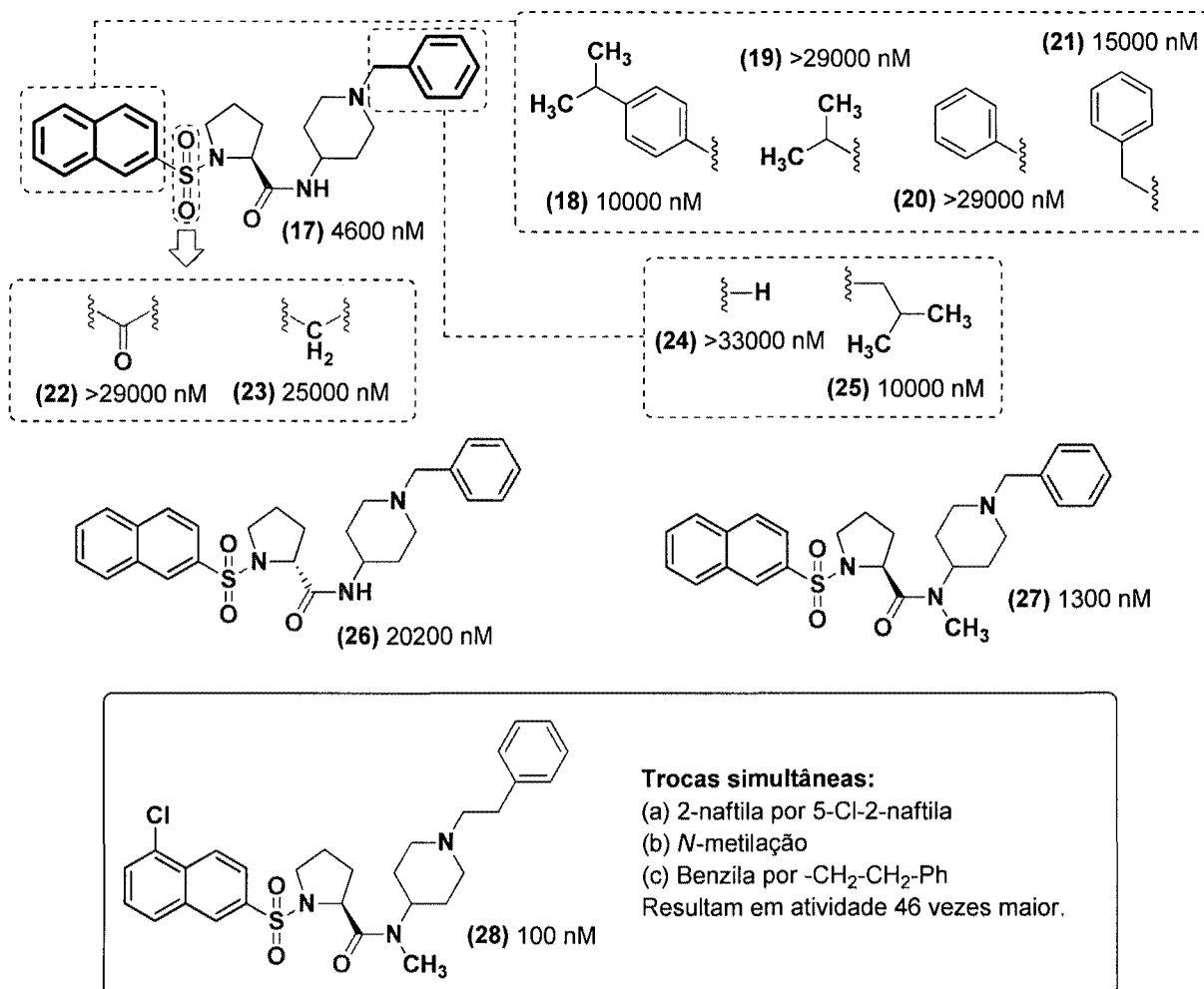


FIGURA 4

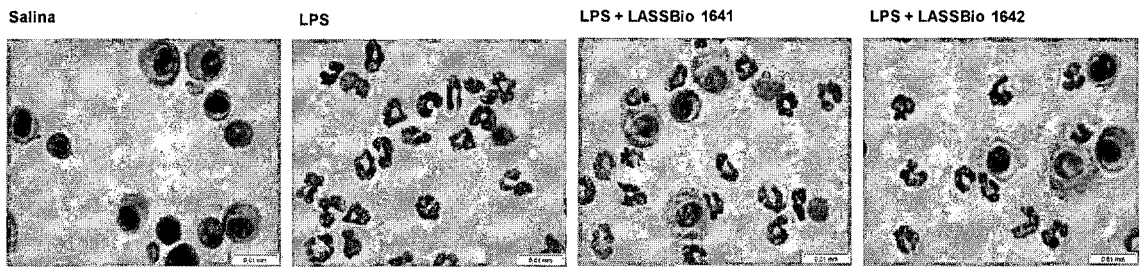


FIGURA 5

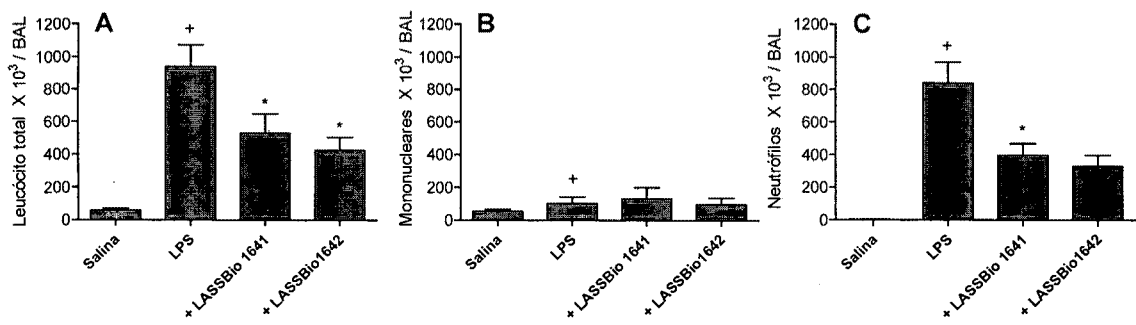


FIGURA 6

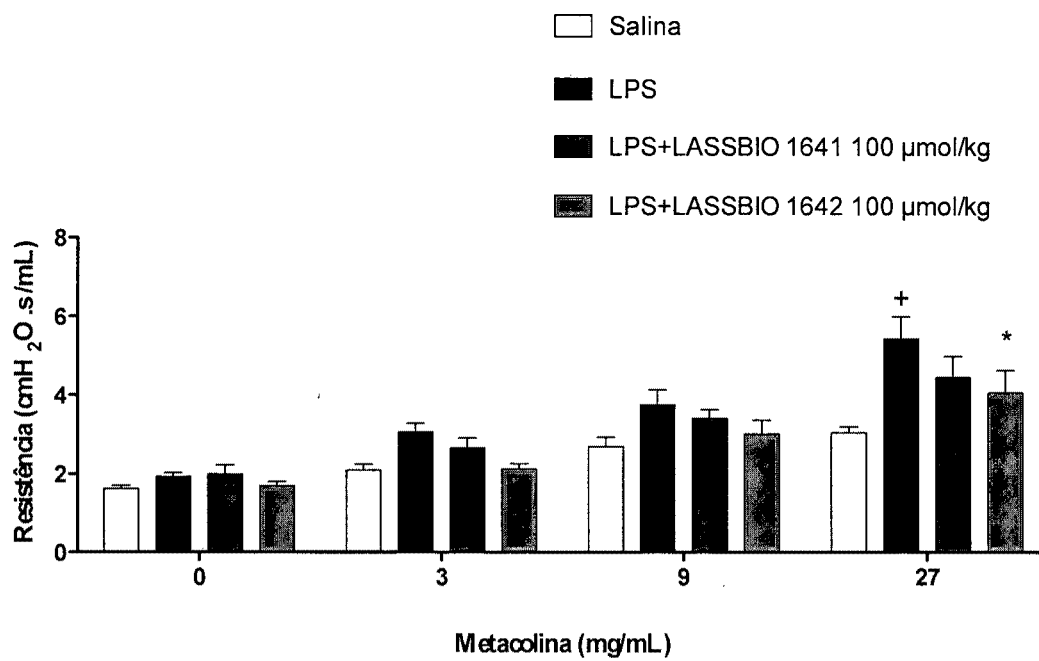


FIGURA 7

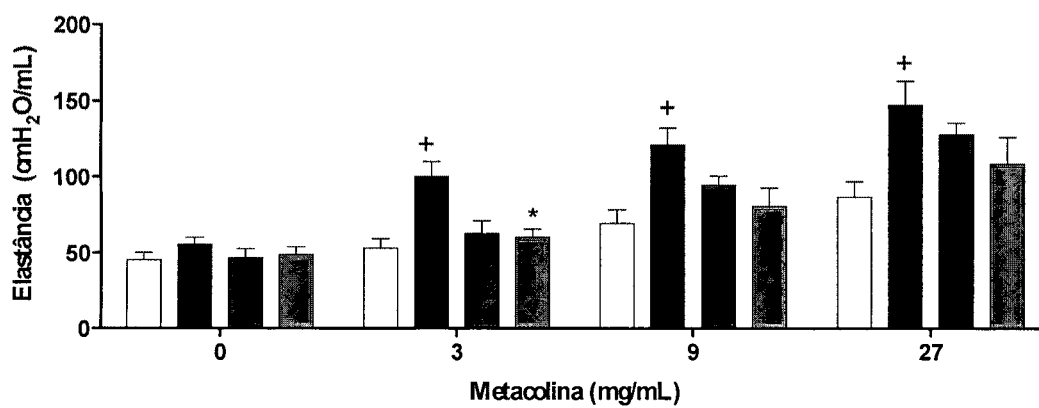


FIGURA 8

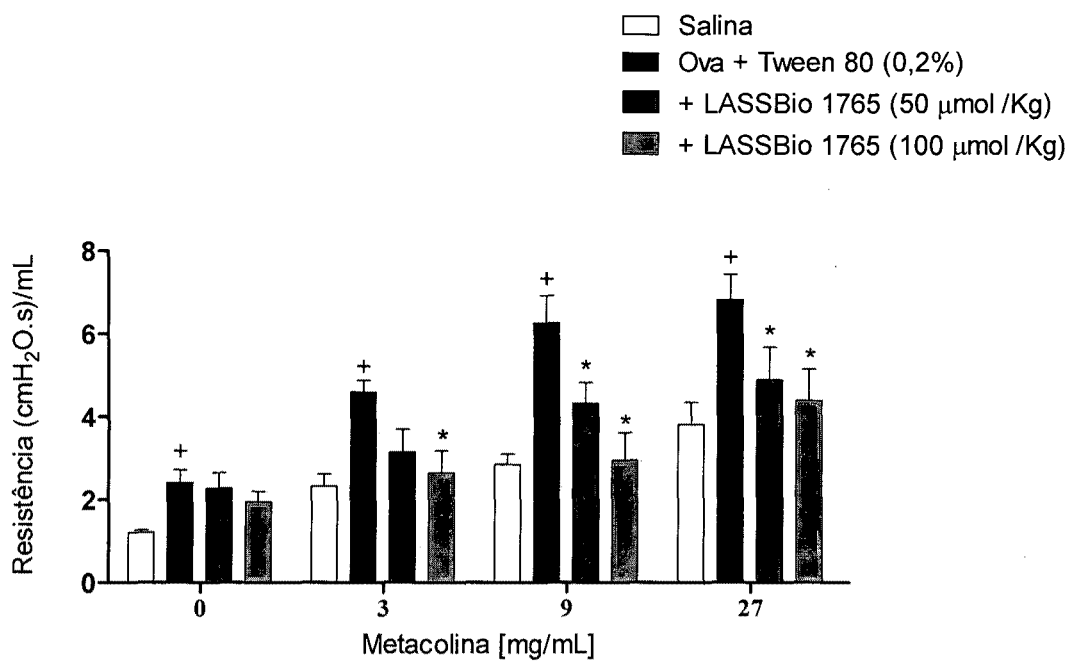


FIGURA 9

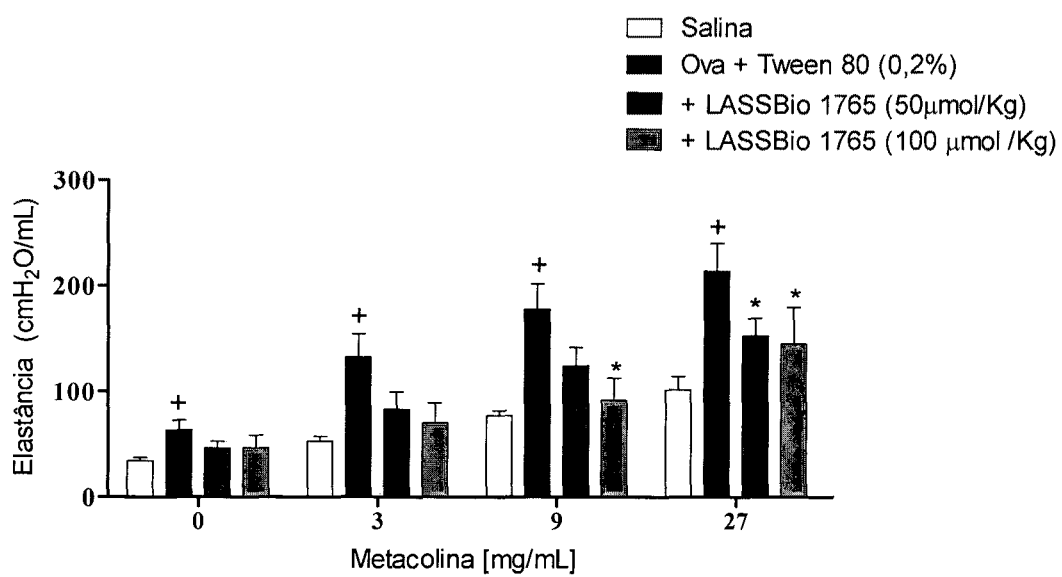


FIGURA 10

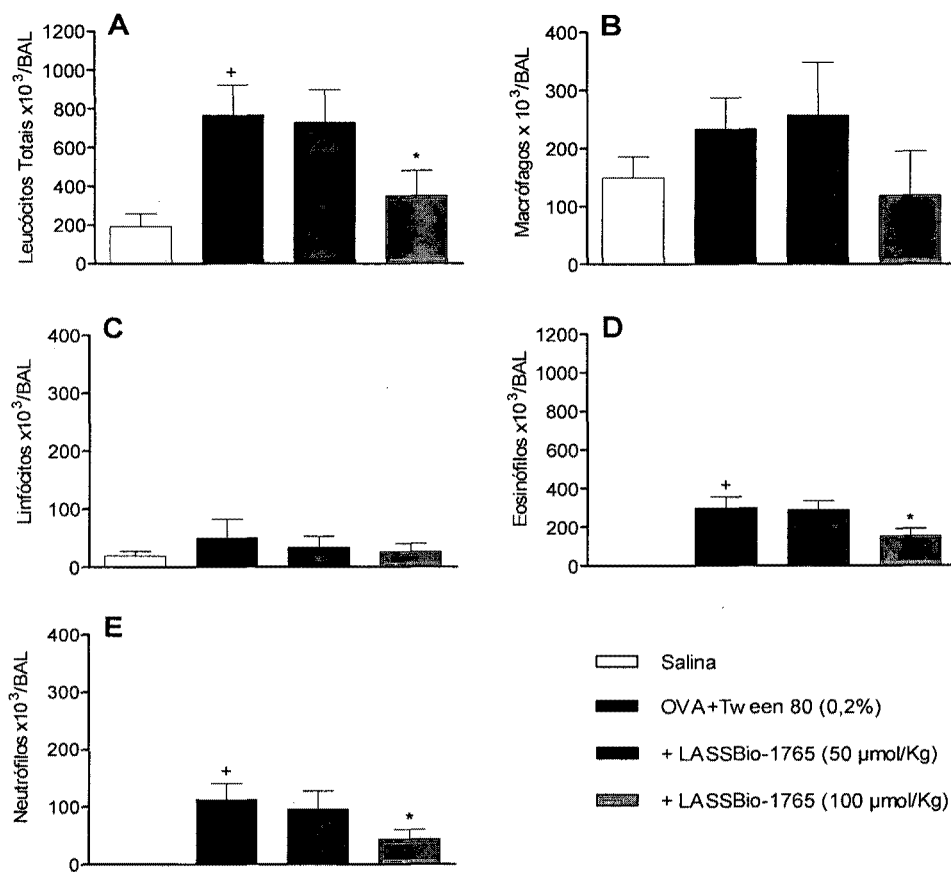


FIGURA 11

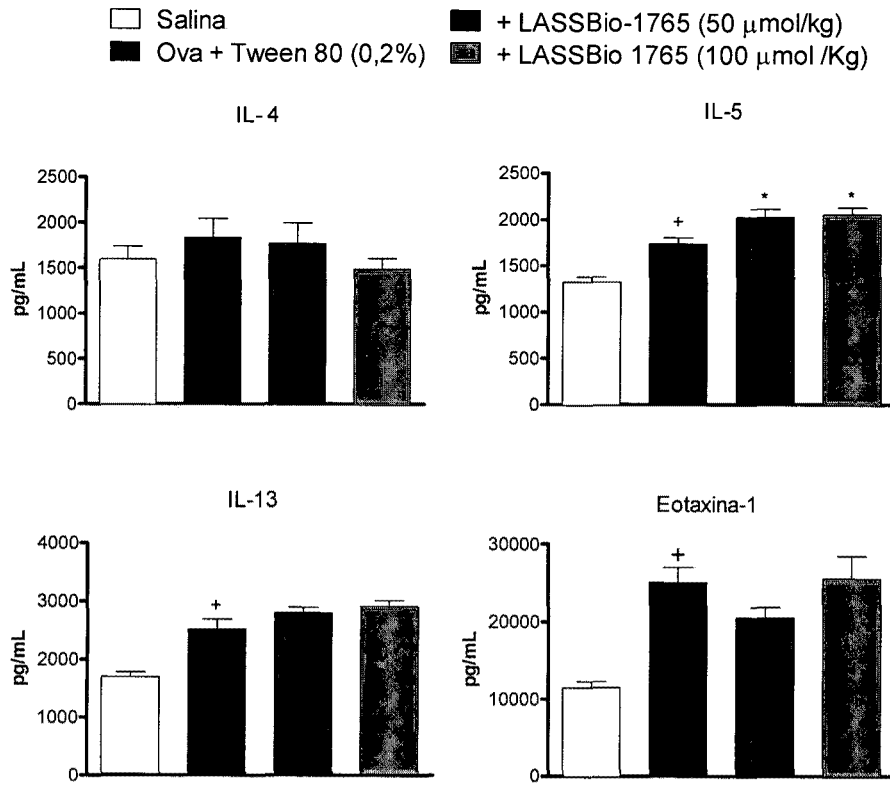


FIGURA 12

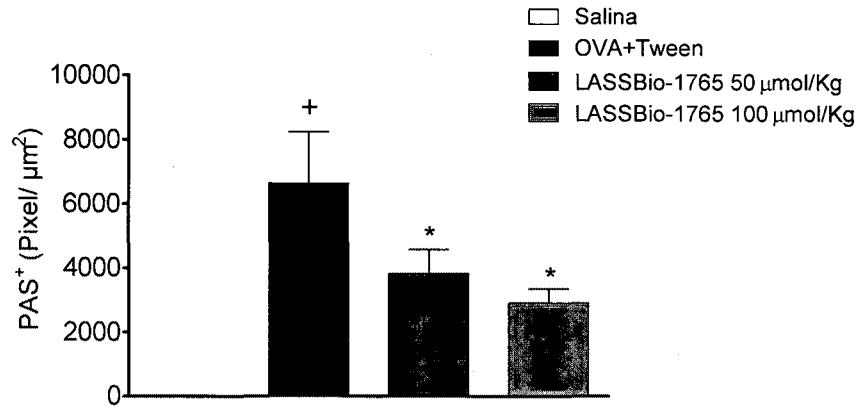


FIGURA 13

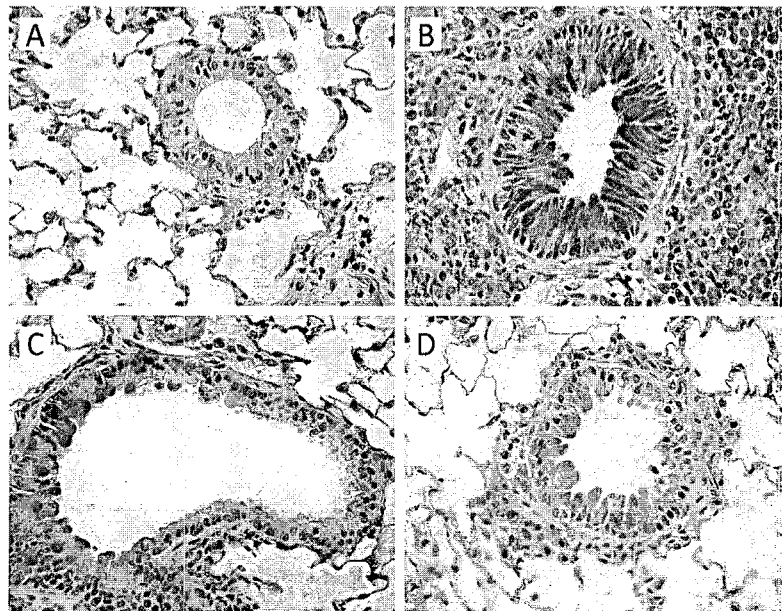
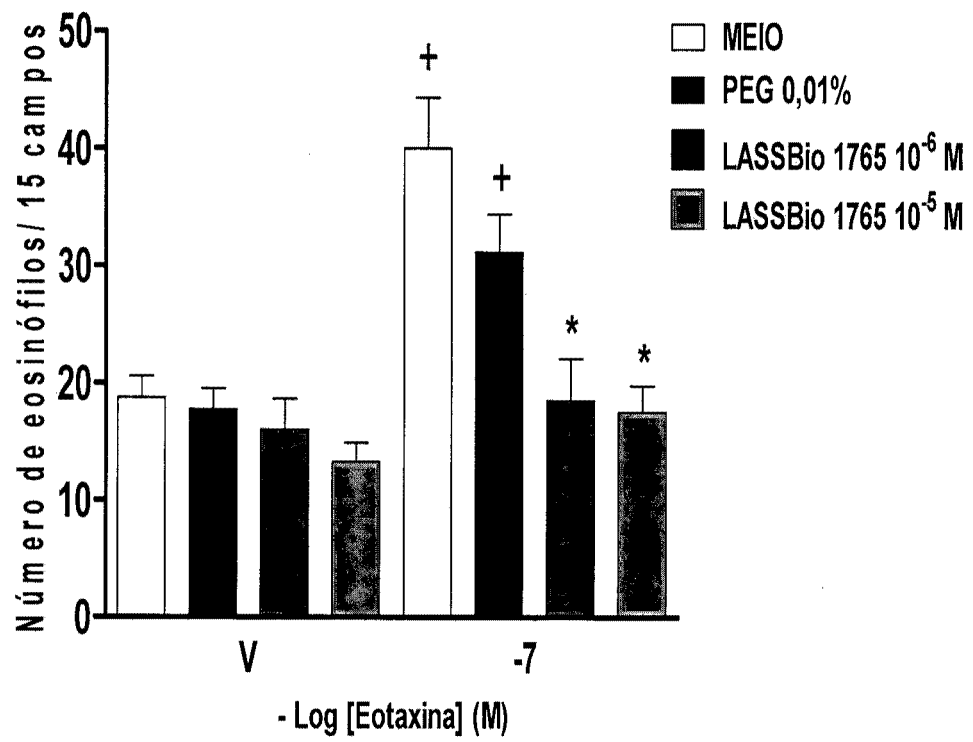


FIGURA 14



USO DE NOVOS DERIVADOS N-(((ARILPIPERIDIN-4-ILIDENO)HIDRAZINIL)OXOALQUIL)ARILSULFONAMÍDICOS COMO ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANTI-ASMÁTICOS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS MESMOS E PROCESSOS DE PREPARAÇÃO

5

Resumo

São descritos novos derivados heterocíclicos, contendo a subunidade $N-(((\text{arilpiperidin-4-ilideno})\text{hidrazinil})\text{oxoalquil})\text{arilsulfonamida}$, apresentando a subunidade $N-(((\text{arilpiperidin-4-ilideno})\text{hidrazinil})\text{oxoalquil})\text{arilsulfonamida}$, que apresentam perfis de atividade anti-inflamatório e antiasmático, *in vitro* e *in vivo*, sobre a inibição da migração de leucócitos envolvendo neutrófilos e eosinófilos, sendo portanto úteis no tratamento da resposta inflamatória envolvida na asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e rinite alérgica. Também são descritas composições farmacêuticas contendo os referidos compostos e processos para sua preparação.