



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102012019095-8

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102012019095-8

(22) Data do Depósito: 31/07/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 13/01/2015

(51) Classificação Internacional: C07D 309/38; C07D 307/76; C07D 317/64; C07C 281/14; A61K 31/165; A61K 31/175; A61K 31/345; A61K 31/36; A61P 33/02.

(54) Título: COMPOSTOS HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPOSTOS HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS, USO DE COMPOSTOS A PARTIR DE HIDRAZINA-N-ACILIDRAZONAS PARA TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E DOENÇA DE CHAGAS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS OBTIDAS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ, Brasileira. CGC/CPF: 33663683000116. Endereço: Av. Pedro Calmon, 550, 2º andar - Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, BRASIL(BR), 21941-901, Brasileira; UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS. CGC/CPF: 24464109000148. Endereço: BR 104 Norte KM 97, Tabuleiro do Martins, Cidade Universitária, Maceió, AL, BRASIL(BR), 57072 970

(72) Inventor: MARINA AMARAL ALVES; ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ; HUGO EDUARDO CERECETTO MEYER; MARIA MERCEDES GONZÁLEZ HORMAIZTEGUY; LIDIA MOREIRA LIMA; ELIEZER JESUS DE LACERDA BARREIRO; MAGNA SUZANA ALEXANDRE MOREIRA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 31/07/2012, observadas as condições legais

Expedida em: 23/03/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

**COMPOSTOS HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE
COMPOSTOS HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS, USO DE COMPOSTOS A
PARTIR DE HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS PARA TRATAMENTO DE
LEISHMANIOSE E DOENÇA DE CHAGAS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS
OBTIDAS**

DESCRIÇÃO RESUMIDA

A presente solicitação de patente de invenção descreve a obtenção de inibidores de cisteína proteinases envolvidas nos processos infecciosos causados pelos parasitas *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania* sp.

INTRODUÇÃO

A introdução tem por pretensão apresentar o escopo principal da invenção. Uma vez que a invenção se desdobra em aplicações terapêuticas para dois tipos de parasitose e, ainda, no desenvolvimento de novos compostos com atividade específica, serão dedicadas subseções para cada um dos temas aqui sublinhados.

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

Doença de Chagas e Leishmaniose:

Cerca de três mil pessoas diariamente morrem no mundo vítimas de doenças negligenciadas como leishmaniose, doença de Chagas, malária, e doença do sono. São mais de 1 milhão de mortes por ano, de acordo com dados da FINEP. Esse número elevado de óbitos é reflexo da precariedade no diagnóstico e tratamento destas doenças. Os mais afetados por essa negligência são as populações mais empobrecidas dos países menos desenvolvidos, e, portanto, não constituindo um mercado lucrativo para as indústrias farmacêuticas. Apenas 1,3% dos medicamentos

disponibilizados entre 1975 e 2004 foram para as doenças negligenciadas, o que representa 21 medicamentos, apesar de representarem 12% da carga global de doenças.

O Gráfico 1 representa o Percentual de medicamentos desenvolvidos entre 1975 e 2004.

De acordo com estudos realizados pelo Instituto George para Saúde Internacional, os investimentos de instituições privadas na área de doenças negligenciadas correspondem a apenas 5% dos recursos globais para pesquisa e desenvolvimento (P&D), sobrando para as instituições filantrópicas (54%), e públicas (41%), que não conseguem, na maioria das vezes, dar sustentabilidade a esses investimentos ao longo dos anos.

No Brasil, em torno de R\$ 75 milhões ao ano vem sendo gasto com incentivos governamentais para P&D em doenças negligenciadas, devido aos incentivos feitos pelo Ministério da Ciência e Tecnologia, por meio de suas duas principais agências de fomento: o CNPq e a FINEP. Em 2008, elas investiram mais de R\$ 25 milhões em projetos de P&D para as doenças negligenciadas.

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, teve como seu descobridor o pesquisador brasileiro Carlos Chagas. É uma doença parasitária causada pela infecção do protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, cujos insetos triatomíneos são seus vetores. As formas mais importantes de transmissão da doença de Chagas ainda são as vetoriais, que são aquelas ligadas diretamente ao vetor, à transfusão de sangue, à via congênita, e mais recentemente, as que ocorrem via oral, pela ingestão de alimentos contaminados, pela picada na mucosa ocular ou oral, contudo apresentam também importância epidemiológica a transmissão transfusional e congênita.

Dados da OMS indicam a existência de 16-18 milhões de infectados pelo T. cruzi, dentre eles, 12-14 milhões de indivíduos na América Latina, sendo ainda encontrados indivíduos contaminados em países da Europa e América do Norte, na maioria das vezes resultante da migração de indivíduos infectados em busca de melhores condições de vida.

Entre as mais de 120 espécies de insetos vetores, 12 espécies da subfamília Triatominae, são as mais importantes para a infecção humana, devido a sua capacidade de invasão e procriação dentro das casas.

O diagnóstico, tanto na fase aguda quanto nas formas crônicas da doença de Chagas, é realizado pela detecção do parasito por métodos parasitológicos (diretos ou indiretos) e pela presença de anticorpos no soro, através de testes sorológicos sendo os mais utilizados a imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação (HAI) e enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Poderão ser realizados também testes moleculares, utilizando polymerase chain reaction (PCR) acoplado à hibridização com sondas moleculares, e o Western blot (WB), como teste confirmatório tanto na fase aguda como nas formas crônicas da doença. Após a infecção, a maioria dos indivíduos apresenta fase aguda assintomática. Pacientes desenvolvem formas sintomáticas da fase crônica da doença anos, ou mesmo décadas, após a fase aguda da infecção em aproximadamente 40% dos pacientes.

O caso crônico pode permanecer assintomático durante dez a vinte anos. No entanto, neste período, o parasita está se reproduzindo continuamente em baixos números, causando danos irreversíveis em órgãos como o sistema nervoso e o coração. Já o fígado, por ser capaz de se regenerar, os problemas são raros. As consequências poderão ser observadas após uma ou duas décadas de progressão, com aparecimento gradual de demência (3% dos casos iniciais), cardiomiopatia (em

30% dos casos), ou dilatação do trato digestivo (megaesôfago ou megacólon (6%), devido à destruição da inervação e das células musculares destes órgãos, responsável pelo seu tônus muscular. No cérebro há frequentemente formação de granulomas. Neste estágio a doença é frequentemente fatal, mesmo com tratamento, geralmente devido à cardiomiopatia (insuficiência cardíaca). No entanto o tratamento pode aumentar a esperança e qualidade de vida.

1 - Doença de Chagas

A doença de Chagas constitui-se pela sua vasta distribuição, altos índices de prevalência e gravidade de evolução, um dos maiores problemas de Saúde Pública em países do cone sul das Américas (DIAS, 2001; REY, 2001). A tripanossomíase americana, denominada doença de Chagas, é uma importante doença parasitária resultante da infecção pelo protozoário parasito hemoflagelado. As formas mais importantes de transmissão da doença de Chagas ainda são as vetoriais (seja via lesão resultante da picada, seja por mucosa ocular ou oral), contudo apresentam também importância epidemiológica a transmissão transfusional e congênita (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). A doença é uma zoonose endêmica em 21 países, com estimativa de 16 a 18 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*. A etapa mais importante de transmissão do *T. cruzi* é efetuada por insetos da família Reduviidae, incluindo as espécies *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*. No Brasil, o transmissor *T. infestans* é conhecido vulgarmente como "barbeiro".

O ciclo de vida do *T. cruzi* compreende três estágios ou formas principais, dotadas de características morfológicas e biológicas distintas: epimastigota (encontrada no tubo digestivo do vetor), tripomastigota (encontrada no vetor e no sangue e espaço

intercelular do hospedeiro vertebrado) e amastigota (encontrada no interior de células do hospedeiro vertebrado) definidas com base na forma geral da célula (esférica, piriforme, alongada), na posição relativa entre o núcleo e o cinetoplasto (anterior, lateral e posterior) e na maneira da saída do flagelo da bolsa flagelar (central ou lateral) (SOUZA, 1999).

O ciclo biológico do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado inicia-se quando o sangue de animais infectados é ingerido durante o repasto sanguíneo. Ao chegar ao estômago, a forma tripomastigota transforma-se gradualmente em formas arredondadas, algumas com um longo flagelo colado ao corpo e outras com um curto flagelo, chamadas de esferomastigotas e epimastigotas respectivamente.

Em seguida, os parasitas migram para o intestino, onde se multiplicam como formas epimastigotas. Após, migram para a parte mais posterior, atingindo o reto, e transformam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são eliminados junto com as fezes e urina do triatomíneo (SOUZA, 1999). A infecção pelo *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado inicia-se quando os parasitas eliminados pelo inseto na forma tripomastigota metacíclico, são inoculados na pele ou mucosas do vertebrado. A maneira mais comum é a vetorial, através da picada do barbeiro, que, durante o processo de ingestão do sangue, deposita suas fezes próximas ao local da picada (SOUZA, 1999).

A doença de Chagas pode se manifestar de forma aguda, indeterminada e crônica. Os primeiros sintomas da fase aguda se apresentam, geralmente, entre 7 a 10 dias após a infecção pelo parasita. No local de entrada do parasita ocorre um processo inflamatório, nem sempre visível. No entanto, em infecções pela mucosa ocular, observa-se um sinal característico da fase aguda da doença de Chagas,

denominado sinal de Romanã que consiste no inchaço de ambas as pálpebras do olho infectado (NEVES, 2002).

A fase aguda da doença pode durar de um mês a um ano, podendo o paciente evoluir para a fase crônica ou indeterminada. A fase indeterminada trata-se de uma fase crônica com baixa parasitemia e alto teor de anticorpos, assintomática e sem manifestações clínicas. Após a fase aguda, a maioria dos pacientes evolui durante uma ou duas décadas nesta forma indeterminada, na qual, embora exista a infecção ativa, praticamente não há lesões clinicamente demonstráveis e os órgãos e sistemas se encontram preservados em sua anatomia e sua reserva funcional (DIAS, 2001). Cerca de um terço dos casos agudos da doença de Chagas evolui para a fase crônica. A fase crônica da doença em alguns casos segue imediatamente o período agudo; em outros, instala-se depois de um intervalo assintomático de duração variável (REY, 2001; BLACK, 2002).

A forma crônica da doença de Chagas é representada por diversas formas clínicas, afetando um ou mais órgãos de forma irreversível, destacando-se as alterações cardíacas como as principais. A cardiopatia crônica e o aparecimento dos megas, megaesôfago e megacólon, principalmente, representam formas clínicas de considerável gravidade (SZAJNMAN et al., 2000; CAZZULO et al., 2001; MONCAYO, 2003).

A prevalência das manifestações digestivas ou cardíacas na doença de Chagas depende principalmente da região endêmica. É comum encontrar casos de megaesôfago na região central do Brasil, sendo essa manifestação rara em outras áreas. A forma cardíaca apresenta como principais sintomas a arritmia (75.000 casos/ano), a insuficiência cardíaca e o tromboembolismo. As manifestações digestivas ocorrem pelo comprometimento das funções do órgão afetado. No caso

do megaesôfago (45.000 casos/ano), observa-se o aumento do diâmetro do órgão e alterações na motilidade, além de sintomas como dores epigástricas, regurgitação e hipertrofia das glândulas salivares. O megacólon (30.000 casos/ano) apresenta como principal característica a obstipação do órgão, que pode durar semanas (WENDEL et al., 1992; MONCAYO, 2003).

2 - Leishmaniose

As leishmanioses são antroponoses consideradas um grande problema de saúde pública, representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica.

Observa-se a existência de três perfis epidemiológicos: a) Silvestre – em que ocorre a transmissão em áreas de vegetação primária (zoonose de animais silvestres); b) Ocupacional ou lazer – em que a transmissão está associada a exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, ecoturismo; (antroponose) e c) Rural ou periurbana – em áreas de colonização (zoonose de matas residuais) ou periurbana, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (zoonose de matas residuais e/ou antroponose).

Protozoários do gênero *Leishmania* apresentam duas formas durante o seu ciclo evolutivo, as amastigotas que não possuem flagelo livre e são parasitos intracelulares obrigatórios preferencialmente do sistema fagocítico mononuclear de hospedeiros vertebrados, onde se dividem por divisão binária simples e nas formas flageladas promastigotas que são encontradas no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados.

As formas promastigotas possuem o cinetoplasto anteriormente à porção livre do flagelo, que tem o mesmo comprimento do corpo. Outras organelas peculiares em tripanossomatídeos são os glicosomas e os megasomas, que são encontradas em ambas as formas. Os glicosomas compartimentalizam as enzimas da via glicolítica, enquanto que em eucariotos normalmente estão localizados no citoplasma. Os megasomas são corpúsculos arredondados com pH ácido onde estão localizadas, dentre outras enzimas, as cisteíno-proteinases e são abundantes nas formas amastigotas. Estes parasitos pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*.

- 10 As *Leishmanias* diferem nos padrões de desenvolvimento nos hospedeiros invertebrados naturais, o que foi usado de base para a revisão proposta por Lainson e Shaw, permitindo a divisão do gênero *Leishmania* em dois grupos: o subgênero *Viannia* e o subgênero *Leishmania*. As principais espécies do subgênero *Viannia* estão distribuídas apenas no Novo Mundo e são *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. naiffi*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. colombiensis*, *L. equatorensis*.

As espécies do subgênero *Leishmania* distribuídas no Novo Mundo são *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. chagasi*, *L. venezuelensis*, *L. pifanoi*, *L. hertigi*, *L. enriettii*, *L. deanei*, *L. aristidei*, *L. garnhami*, *L. forattinii*, e as espécies do Velho Mundo são *L. donovani*, *L. tropica*, *L. infantum*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. arabica* e *L. turanica*.

A diferenciação entre as várias espécies de *Leishmania* dentro de um subgênero inclui a morfologia na microscopia ótica e eletrônica, o comportamento nos hospedeiros, a identificação tanto por anticorpos monoclonais como por isoenzimas e a análise de DNA. Os hospedeiros invertebrados parecem estar limitados

estritamente a insetos hematófagos. Os dípteros do gênero *Lutzomyia* são os vetores de transmissão de *Leishmanias* nas Américas e os dípteros do gênero *Phlebotomus* estão envolvidos com a transmissão no Velho Mundo. Mais de 20 espécies de *Leishmania* têm sido identificadas como causadoras de doenças em humanos e cada uma apresenta fontes de infecção específicas.

A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre quando a fêmea do vetor pica um vertebrado infectado durante o repasto sanguíneo e, juntamente com o sangue, ingere macrófagos parasitados. Durante o trajeto pelo trato digestivo, os macrófagos se rompem liberando as amastigotas que se transformam em promastigotas, multiplicam-se ainda no sangue ingerido que é envolto pela membrana peritrófica secretada pelas células do estômago do inseto. Após a digestão do sangue, a membrana peritrófica se rompe e as formas promastigotas ficam livres, dividem-se intensamente e transformam-se em promastigotas metacíclicas sem a capacidade de divisão binária, migrando então para a probóscida do inseto. Com a probóscida bloqueada pelas *Leishmanias*, o inseto tem dificuldade de se alimentar e, quando pica, regurgita os parasitos para o interior da pele do hospedeiro vertebrado, inoculando-os no local da picada, ocorrendo assim a transmissão. Os flagelados inoculados são fagocitados por macrófagos teciduais do hospedeiro formando, assim, o vacúolo parasitóforo. Rapidamente os promastigotas diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se no interior destes vacúolos, até que o macrófago se rompe, liberando amastigotas no tecido, sendo novamente fagocitadas, iniciando no local um novo ciclo intracelular e causando, assim, as leishmanioses.

Os parasitos do gênero *Leishmania* determinam doenças do sistema fagocítico mononuclear que apresentam características clínicas e epidemiológicas diversas, por isso foram reunidas em quatro grupos (Tabela 1):

Tabela 1

Leishmaníase Tegumentar Americana			Leishmaníase Visceral Americana
Cutânea	Cutâneo-mucosa	Cutâneo-difusa	
Complexo <i>Braziliensis</i>	Complexo <i>Braziliensis</i>	Complexo <i>mexicana</i>	Complexo <i>Donovan</i>
<i>L. (V.) braziliensis</i> *	<i>L. (V.) braziliensis</i> *	<i>L. (L.) mexicana</i>	<i>L. (L.) chagasi</i> *
<i>L. (V.) peruviana</i>		<i>L. (L.) pifanoi</i>	<i>L. (L.) donovani</i>
<i>L. (V.) guyanensis</i> *		<i>L. (L.) amazonensis</i> *	<i>L. (L.) infantum</i>
<i>L. (V.) panamensis</i>			
Complexo <i>Mexicana</i>			
<i>L. (L.) mexicana</i>			
<i>L. (L.) pifanoi</i>			
<i>L. (L.) amazonensis</i> *			
<i>L. (L.) venezuelensis</i>			

- Leishmaníase cutânea - produz exclusivamente lesões cutâneas limitadas.
- Leishmaníase cutâneo-mucosa - freqüentemente se complicam pelo aparecimento de lesões destrutivas em algumas mucosas.
- 5 • Leishmaníase visceral ou Calazar - o parasito tem tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear de órgãos como o fígado, o baço e a medula, que se tornam hipertrofiados.
- Leishmaníase cutânea difusa - formas cutâneas disseminadas.

Os antimoniais pentavalentes (Sb5+) têm sido utilizados no tratamento das leishmanioses humanas desde o início do século XX e continuam sendo as drogas de escolha para a doença cutânea e visceral. Em 1937, o estibogluconato de sódio (A, Pentostan®, um derivado do ácido estibônico complexado ao Sb5+) foi utilizado, também por via intramuscular, reduzindo os efeitos colaterais e a toxicidade e no

Brasil, atualmente, o fármaco utilizado é o antimoniato de meglumina (B, Glucantime®). O mecanismo de ação destes compostos é a inibição das enzimas da via glicolítica e da β -oxidação em amastigotas, mas sendo um metal pesado, acredita-se que interfira em outras vias metabólicas da *Leishmania*, bem como com a do hospedeiro. Também foi observado que são capazes de inibir a topoisomerase II de *L. panamensis* e de *L. donovani*.

Além das dificuldades de administração e do alto custo, os antimoniais pentavalentes apresentam importantes efeitos colaterais que incluem mialgia, artralgia, aumento sérico das enzimas hepáticas, pancreatite, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias, pancitopenia, insuficiência renal reversível e cardiotoxicidade. A cura clínica não é acompanhada de cura parasitológica, pois têm sido observados parasitos na cicatriz de indivíduos clinicamente curados após tratamento. A anfotericina B, a pentamídina, o miltefosine e a paramomicina têm sido as drogas alternativas nos casos de resistência aos antimoniais, mas não possuem um índice terapêutico tão favorável e também apresentam importantes reações adversas. A tabela 2 resume as opções terapêuticas supra mencionadas.

	Reactions in patients with cutaneous or visceral leishmaniasis	Comments†
Pentavalent antimony		
Intralesional for CL ¹²¹	Pain, erythema, oedema	Frequent, transient
Parenteral ^{121,122,123}	Raised amylase/lipase or LFTs	Very frequent. Pancreatitis often asymptomatic
	Myalgias and arthralgias	Frequent. Mild-moderate
	Abdominal pain, nausea	Frequent. Mild-moderate
	Thrombocytopenia or leucopenia	Infrequent. Mild decreases
	ECG changes or cardiotoxicity	Infrequent. Mild in CL, mild to severe (even fatal) in VL
Paromomycin		
Topical for CL	Erythema, pain, oedema, blisters	Infrequent, transient. Reactions vary by formulation
Parenteral for VL ¹²¹	Ototoxicity‡	Infrequent. Nephrotoxicity not observed‡
Miltefosine^{124,125}		
	Nausea, vomiting and/or diarrhoea	Frequent. Usually mild and transient
	Raised creatinine	Frequent. Mild increases
	Raised LFTs	CL, infrequent; VL, frequent. Mild increases
Pentamidine^{122,123}		
	Nausea, vomiting or diarrhoea	Very frequent
	Hyperglycaemia	Infrequent. Can be severe in VL
	Cardiotoxicity	Infrequent. Can be severe in VL
Amphotericin B for VL^{122,124}		
	Infusion-related§	Very frequent
	Azotaemia§	Frequent
	Anaemia or hypokalaemia§	Infrequent

Adaptado de Lainson; Shaw, 1987; Mazorchi, 1989.

3. Tratamento da doença de Chagas/Leishmaniose e Desenvolvimento de novas drogas

- 5 Drogas para o tratamento da doença de Chagas não são do interesse de indústrias farmacêuticas, estando na raiz do problema o alto custo dos investimentos e a falta de um mercado potencial e seguro nos países em desenvolvimento. De um modo geral, o desenvolvimento de uma quimioterapia antiparasitária ocorre (i) pelo estabelecimento de princípios ativos de plantas utilizadas na medicina popular, (ii)
- 10 pela investigação de drogas já aprovadas para o tratamento de outras doenças, uma vez que elas já foram submetidas a ensaios clínicos muito dispendiosos, ou, (iii)

através da determinação de alvo(s) específico(s) identificado(s) em vias metabólicas chave para o parasito.

Estudos recentes têm permitido a identificação de alvos potenciais em *T. cruzi* e que incluem o metabolismo de esteróis, o DNA e diferentes enzimas.

5 Nifurtimox e benznidazol foram introduzidos na clínica no tratamento da doença de Chagas nas décadas de 60-70, mas atualmente somente o benznidazol se encontra disponíveis comercialmente no Brasil, apesar de apresentar sérios efeitos colaterais e requererem administração por longos períodos de tempo sob supervisão médica.

Nas formas visceral e mucocutânea de leishmaniose, o tratamento medicamentoso é
10 indicado principalmente nos casos de lesões incapacitantes ou desfigurantes. Existem vários esquemas terapêuticos baseados de forma geral em Antimônios, Anfotericina B, Paromomicina, Imunoterapia e Pentamida. Cetoconazol e Itraconazol, entre outros, também são usados.

3.1 Resposta imune nas infecções causadas por protozoários.

15 Os protozoários são agentes infecciosos intracelulares que habitualmente infectam o hospedeiro por longo período de tempo, em virtude de possuir mecanismos que lhes permitem escapar das agressões mediadas pelo sistema imune. Já foi observado que as infecções causadas por protozoários não atingem toda a parcela da população infectada, tendo o sistema imune um papel fundamental, impedindo a
20 multiplicação e a disseminação do vetor. A não ser que ocorra uma depressão imune, onde seria desencadeado uma resposta imunológica, esses agentes podem permanecer no hospedeiro por toda a vida.

Vários componentes da resposta imune inata podem participar do mecanismo de defesa contra os protozoários, mas esses microorganismos escapam dessa defesa.

25 O *Trypanosoma cruzi* tem a propriedade de impedir ativação do complemento, desde

que se encubra com moléculas do hospedeiro como o fator acelerador da degradação (DAF). Da mesma forma, as formas infectantes de *Leishmania* resistem a sua ação do complemento, embora *in vitro* as promastigotas de *Leishmania* sejam altamente sensíveis ao complemento,. As leishmanias são também susceptíveis à ação de neutrófilos, células com grande potencial de produzir peróxido de hidrogênio e NO, mas que, ao penetrar o hospedeiro, infectam os macrófagos, livrando-se do ataque dos neutrófilos.

A resposta adaptativa contra os protozoários ocorre após a apresentação de antígenos por macrófagos e células dendríticas, via MHC classe II para as células T.

Como outras células podem ser infectadas, e os macrófagos e células dendríticas também expressam moléculas de MHC classe I, nas infecções por protozoários há também ativação das células TCD8+. A tabela 3 mostra os mecanismos imunológicos de defesa contra alguns protozoários de importância clínica.

Tabela 3: Principais mecanismos de defesa contra protozoários.

Protozoários <i>Protozoans</i>	Células predominantemente infectadas <i>Predominantly infected cells</i>	Mecanismos de defesa <i>Protection Mechanism</i>
<i>Leishmania</i>	Macrófagos / <i>Macrophages</i>	Produção de IFN- γ , NO e citotoxicidade por célula CD8 <i>Production of IFN-γ, NO and cytotoxicity by CD8 cell</i>
<i>Ameba</i> <i>T. cruzi</i>	Neutrófilos, macrófagos / <i>Neutrophils, macrophages</i> Cardiomiócitos / <i>Cardiomyocytes</i>	Produção de IFN- γ e NO / <i>Production of IFN-γ and NO</i> Citotoxicidade por células CD8, ativação de macrófagos por células CD4 e produção de NO <i>Cytotoxicity by CD8 cells, activation of macrophages by CD4 cells and NO production</i>
<i>Toxoplasma gondii</i>	Células do SNC, olhos, músculos, outras <i>SNC cells, eyes, muscles, others</i>	Produção de NO por macrófagos ativados pelas células TCD4+ e TCD8+ <i>NO production by macrophages activated by TCD4+ and TCD8+ cells</i>
<i>Plasmodium</i>	Hepatócitos / <i>Hepatocytes</i>	Citotoxicidade por células TCD8+ e produção de IFN- γ , TNF- α e NO <i>Cytotoxicity by TCD8+ cells and production of IFN-γ, TNF-α and NO</i>

É fundamental a resposta imune celular na defesa contra infecções causadas por protozoários. Embora uma resposta imune desviada para o pólo Th2 seja maléfica, porque aumenta a susceptibilidade às infecções e permite a multiplicação e

disseminação do parasito, o conceito de que uma potente resposta Th1 seja protetora deve ser visto com cautela. Em várias protozooses, é verificado que a resposta imune exacerbada está envolvida no dano tecidual: na doença de Chagas é mediado por células CD4+ e CD8+; uma maciça produção de TNF- α e NO, é observada na patogenia da malária cerebral. Tais fatos confirmam que uma atuação equilibrada do sistema imunológico é muito importante para a contenção do parasita sem destruição tecidual, fazendo com que, embora possa continuar presente, o agente infectante não cause doença no homem. A patogênese das diversas formas clínicas da leishmaniose exemplifica bem a importância da resposta Th1 tanto no controle como na gênese da lesão tecidual. Após a inoculação da *Leishmania* na pele e invasão macrofágica, nos indivíduos que não têm a capacidade de produzir IFN- γ e ativar macrófagos, a *Leishmania* dissemina-se e, na dependência da espécie, causa a leishmaniose visceral (*L. chagasi*) ou a leishmaniose cutânea difusa (*L. amazonensis*). Devido a deficiência de IFN- γ e alta produção de IL-10 ocorre o desenvolvimento da doença. A restauração da resposta imune in vitro na leishmaniose visceral pode ser observada pela neutralização de IL-10 ou pela adição de IL-12 às culturas de células mononucleares de sangue periférico (CMSP).

Já na leishmaniose cutânea e na leishmaniose mucosa, onde é observado um forte desvio Th1 e, embora o número de parasitas no tecido seja escasso ou até ausente, há desenvolvimento de lesão. CMSP de indivíduos com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa estimuladas com antígeno de *Leishmania* produzem grande quantidade de IFN- γ , IL-2 e TNF- α , e pouca IL-10. Como habitualmente o sistema imune não consegue destruir completamente as leishmanias, essa forte resposta Th1 termina por levar a ocorrência de uma reação inflamatória muito intensa e a dano aos tecidos próprios, resultando no aparecimento de úlceras na pele e na

mucosa. Tem participação importante nesse dano tecidual a produção acentuada de TNF- α e de NO. Evidências de que a resposta imune celular participa da patogenia da leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa inclui: 1) o tratamento precoce da infecção não impede o aparecimento da lesão; 2) existência de forte reação inflamatória no tecido com expressão aumentada de TNF- α , IFN- γ e poucos parasitos na lesão; 3) associação de antimonial com droga inibidora de TNF- α cura pacientes com leishmaniose mucosa que são refratários ao tratamento com antimonial.

3.2: Relação parasita-hospedeiro:

Os cinetoplastídeos distinguem-se dos outros grupos principalmente pela presença de cinetoplastos, um grânulo que contém ADN, o "kDNA". Tal estrutura está localizada na mitocôndria, que é única nesse grupo de organismos, e está associada com a base dos flagelos.

Trypanosomatidae possui citosomas reduzidos ou ausentes, alimentando-se inteiramente por absorção, e cinetoplastos menores que os de outras espécies. Normalmente possui complexos ciclos de vida, que compreendem mais de um hospedeiro e com várias etapas morfológicas. A mais distintiva destas, é a fase de Tripomastigota, cujo flagelo se estende ao longo do comprimento da célula e conecta-se a membrana celular, formando uma membrana ondulante. As doenças causadas pelos Trypanosomatidae incluem a doença do sono e a doença de Chagas, causadas por espécies de Trypanosoma, e a leishmaniose, por espécies de Leishmania.

A sequência completa do genoma dos cinetoplastídeos T.brucei, T. cruzi e L. major, foram publicadas em 2005. Como protozoários, Leishmania e Trypanosoma têm genomas relativamente grande de 25-55 Mb, a codificação para 8-12,000 genes. A

principal característica é que seus genomas possuem um nível excepcionalmente elevado de conservação entre eles, apesar de uma divergência evolutiva estimado 2.500 anos atrás. Na verdade, *Leishmania* e *Trypanosoma* compartilham cerca de 80-93% de seus genes, e apenas um número limitado de genes são espécie-específicos. Isto é ainda mais notável quando se comparam as três espécies de *Leishmania*, que compartilham mais de 99% de seus genes, de modo que apenas 5 genes são específicos para *L. major*, *L. infantum* para 27 e 49 *L. brasiliensis*.

3.3 O papel das peptidases na biologia do parasita e na patogênese

Todos os parasitas devem infectar seu hospedeiro (s) para sobreviver e se propagar, e as peptidases são componentes essenciais nestes processos.

Historicamente, peptidases são citadas como proteases, e são profundamente estudadas em parasitologia por várias décadas. Peptidases permitem que os parasitas perfurem barreiras celular, tecidual e a degradação de proteínas do hospedeiro para a alimentação. Também são usados para manipular o sistema imune de o hospedeiro e iludir a resposta imune. Além disso, peptidases parasitais estão envolvidas no processamento de proteína que fazem modificações secundárias e são usados como marcadores de imunodiagnóstico de infecção.

Tripanossomas e *Leishmania* contêm uma abundância de cisteína proteinases (CPs) que são membros da superfamília da papaína. As enzimas com maior atividade foram designados Tipo I CPs. Uma característica que distingue enzimas do tipo I de tripanossomatídeos a partir de outros CPs da superfamília da papaína, é a presença de uma extensão terminal carboxi-incomuns, a função dos quais ainda é desconhecida. Em *Leishmania mexicana* esses CPs Tipo I são codificadas pelos genes RPB, e tem sua expressão máxima na forma amastigota do parasita que vive nos macrófagos do hospedeiro.

As CPs do *Trypanosoma cruzi* são geralmente conhecido pelo nome comum (ou os sinônimos cruzipaina e gp57/51) e são expressos em todo o ciclo de vida do parasita, embora sejam mais abundantemente expressas na fase de multiplicação, especialmente na epimastigota.

Os inibidores da cruzipaina provocam mudança na localização da enzima dentro do complexo de Golgi, reduzindo em 70% o transporte desta para os lisossomos. Com a diminuição da catálise e digestão desta, há acúmulo de cruzipaina no interior da célula, diminuindo a mobilidade das membranas do complexo de Golgi, resultando em distensões periféricas de suas cisternas. Tais alterações provocariam a morte do parasita.

Estudos indicam que a cathepsina, uma outra cisteína-protease presente em *Leishmania* sp teria importância similar ao da cruzipaina, no ciclo de vida do parasita.

Portanto, inibidores de cisteína-proteases representam um alvo interessante para concepção de drogas tripanomicidas e leishmanicidas.

4 - Cisteína protease

Proteinases formam um grupo de moléculas biológicas que constituem, aproximadamente, 2% de todos os produtos de genes identificados nos diversos programas de sequenciamento do genoma. Elas estão envolvidas numa enorme gama de processos biológicos, mediante seus efeitos pela clivagem de pontes de amino peptídeos em diversas proteínas encontradas na natureza.

Esta ação hidrolítica é realizada pela identificação e posterior ligação a uma superfície tridimensional particular, produzida pela proteína, que alinha a ponte para clivagem precisamente dentro do site catalítico da proteinase. A hidrólise catalítica então se inicia através do ataque nucleofílico da ponte de amido para ser clivada

pela cadeia de aminoácidos da própria proteinase ou através de ação de moléculas de água ligadas a cadeia de aminoácidos e ativada pela proteinase.

Proteinases em que o resíduo é um Cis são classificadas como cisteína proteinases.

As cisteína-proteinases não são encontradas tão amplamente como as serina- e as

5 aspártico-proteinases. Entretanto, em protozoários da família Trypanosomatidae elas são muito distribuídas, assim como as metaloproteinases, já tendo sido detectadas em vários gêneros como *Crithidia*, *Phytomonas*, *Herpetomonas*, *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*. Neste grupo de microrganismos, estas enzimas estão envolvidas na nutrição, ciclo de vida e na diferenciação morfológica destes parasitos.

10 As cisteína proteinases são classificadas em cinco clãs: CA, CB, CC, CD e CE (Barrett, A. J. et al, 1998). A proteinase do mamão forma o clã CA que contém mais de 80 entradas distintas em bancos de sequências genéticas. Proteinases do clã CA, da família C1 estão relacionadas com uma multitude de patologias, tais como osteoporose, esclerose múltipla, doenças autoimunes e câncer.

15 O estado da arte atual destaca o recente desenvolvimento de alguns inibidores de cisteína proteinase para uso humano (Deaton, D. N. and Kumar, S., Prog. Med. Chem. 42, 245-375, 2004; Bromme, D. and Kaleta, J., Curr. Pharm. Des., 8, 1639-1658, 2002; Kim, W. and Kang, K., Expert Opin. Ther. Patents, 12(3), 419-432, 2002; Leung-Toung, R. et al. Curr. Med. Chem., 9, 979-1002, 2002; Lecaille, F. et al.,
20 Chem. Rev., 102, 4459-4488, 2002; Hernandez, A. A. and Roush, W. R., Curr. Opin. Chem. Biol., 6, 459-465, 2002).

Estes estudos descrevem atividade potencial in vitro, mas revelam diversas dificuldades no desenvolvimento de terapias que possam ser utilizadas no tratamento de doenças em humanos.

As patentes WO-A-9850533 e WO-A-0029408 relatam componentes que podem ser referenciados como cetonas cíclicas, inibidoras de cisteína proteinases, com particular referência para a família das proteinases da papaína e mais especificamente a catepsina K. Em WO-A-9850533 compostos detalhados na literatura como potentes inibidores de catepsina K, com boa biodisponibilidade por administração oral são detalhados (Witherington, J., 'Tetrahydrofurans as Selective Cathepsin K Inhibitors', RSC meeting, Burlington House, London, 1999). Os mesmos compostos são descritos em WO-A-9953039 como parte de uma ampla gama de inibidores de cisteína proteinases associados a doenças causadas por parasitas, em particular ao tratamento da malária para inibição da falciparína.

4.a T. cruzi

T. cruzi possui uma cisteína proteinase semelhante a L-catepsina denominada de cruzipaina (ou cruzaina), que é a principal responsável pela atividade proteolítica em todas as fases do ciclo evolutivo do parasito. Inibidores irreversíveis de cruzipaina do tipo peptidil tais como diazometilcetonas, fluorometilcetonas, alilsulfonas, vinilsulfonas e vinilsulfonamidas, foram investigados como potenciais agentes anti-T. cruzi. Em epimastigotas, inibidores do tipo peptidil bloquearam a maturação de cruzipaina e seu transporte para lisosomas, levando ao acúmulo da sua proteína precursora no complexo de Golgi e à interferência na via de secreção. Utilizando N-piperazinil-F-Ala-homoF-Ala-vinilsulfona-fenila, Engel e colaboradores observaram um aumento no número de vesículas que se dirigem do Golgi para a bolsa flagelar do parasito, interferindo na função do Golgi.

Tratamento de camundongos infectados com a peptidil vinilsulfona, N-metilpiperazina-F-homoF-vinilsulfona-fenila, levou à redução da carga parasitária e das lesões cardíacas. O mesmo composto foi utilizado em cães, sendo observada

uma regressão do dano do miocárdio induzido pela infecção por *T. cruzi*. Além disso, outros inibidores de cruzipaina (não do tipo peptídil) que foram estudados incluem acilhidrazidas, aril uréias, ariltiouréias e tiosemicarbazonas.

4.b Leishmania sp

As cisteíno-proteases são as enzimas proteolíticas mais investigadas em *Leishmania* e muitas delas possuem suas sequências depositadas em bancos de dados e seus genes isolados. São enzimas que pertencem ao Clã A e superfamília das proteases semelhantes à papaína. A papaína é uma cisteíno-protease com cadeia polipeptídica única com 212 aminoácidos e três pontes de enxofre, isolada no mamão papaya – *Carica papaya*. As cisteíno-proteases distribuem-se ainda em entre a família C1 (semelhantes à papaína) e subfamílias das catepsinas L e B, e também na família C2 (semelhantes às calpains). As cisteíno-proteases de *Leishmania* ocorrem em grandes quantidades em volumosos lisossomos, denominados de megassomos, particularmente abundantes em amastigotas. Estas enzimas desempenham importantes funções na *Leishmania* como virulência, manutenção da viabilidade e da morfologia do parasito, invasão do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro e a modulação de sua resposta imune.

ESTADO DA TÉCNICA EM RELAÇÃO A PRESENTE INVENÇÃO

As pesquisas revelaram a existência de estudos científicos e pedidos de patentes relacionados ao assunto da invenção, particularmente ao estudo da semicarbozona para os aplicativos aqui elencados, em especial em Doença de Chagas e Leishmaniose sem, contudo, antecipar o uso de **COMPOSTOS HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPOSTOS HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS, USO DE COMPOSTOS A PARTIR DE HIDRAZIDA-N-**

ACILIDRAZONAS PARA TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E DOENÇA DE CHAGAS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS OBTIDAS. Dentre os vários documentos e textos científicos encontrados, selecionam-se alguns:

- **Patente Número:** 20090203714.

- 5 **Título:** Derivados de furo [3,2-b] pirrol-3-ona e a sua utilização como inibidores de cisteínas proteinases:

Inclui uma formula (I), e seus sais farmacêuticos aceitáveis, onde: X é CH ou N; e R.sup.4 é opcionalmente substituído por C.sub.3-8 alkyl ou opcionalmente substituído por C.sub.3-8 cycloalkyl. A invenção ainda relata uma composição
10 farmacêutica compreendendo componentes da formula (I), e o uso do composto no tratamento de doenças como osteoporose, doença de Chagas, alguns tipos de câncer e outros. No entanto, não possui relevância de efeito anterioridade no presente caso.

- **Patente número:** 20090197817/7,803,803

- 15 **Título:** Tetrahidrofuro [3,2-B] pirrol-3-ona como inibidores da catepsina K

Resumo: Inclui uma formula (I), e seus sais farmacêuticos aceitáveis, onde: X é CH ou N; um dos R.sup.1 e R.sup.2 is H, e seus sais farmaceuticamente aceitáveis sup.6, SR.sup.6, NR.sup.6R.sup.7, N.sub.3, Me, Et, CF.sub.3, SOR.sup.8 e SO.sub.2R.sup.8; R.sup.3 é selecionado entre tert-butylmethyl, iso-propylmethyl,
20 sec-butyl, tert-butyl, cyclopentyl e cyclohexyl; R.sup.4 é opcionalmente substituído C.sub.1-8 alkyl ou opcionalmente substituído C.sub.3-8 cycloalkyl; R.sup.6 e R.sup.7 independentemente selecionados entre H, C.sub.1-8-alkyl e C.sub.3-8-cycloalkyl, ou R.sup.6 e R.sup.7 são ligados para formar um grupo cíclico em conjunto com o nitrogênio com o qual estão ligados; e R.sup.8 é C.sub.1-8-alkyl ou

C.sub.3-8-cycloalkyl. Este documento não apresenta relevância no estudo de anterioridades.

- **Título:** Inibidores de cisteínas proteases e métodos de utilização dos mesmos.

Patente número: 20090076076/8,173,696

5 **Resumo:** A presente invenção refere-se à semicarbazona ou tiosemicarbazona inibidores de cisteínas proteases e métodos de utilização de tais compostos para prevenir e tratar infecções por protozoários tais como a malária tripanossomíase e leishmaniose. Os compostos também encontram utilização em inibir cisteína proteases associadas com carcinogénese, incluindo as catepsinas B e L. Não
10 apresenta relevância como anterioridade à presente invenção.

- **Patente Número:** 20050182121

Título: Tiosemicarbazona e semicarbozona inibidores de cisteína proteases e métodos da sua utilização.

A presente invenção relaciona-se com a tiosemicarbazona e semicarbazona
15 inibidoras de cisteína proteases e métodos de utilização de tais compostos para prevenir e tratar infecções por protozoários tais como a malária tripanossomíase e leishmaniose. Os compostos também encontram utilização em inibir cisteína proteases associadas com carcinogénese, incluindo as catepsinas B e L. Este documento também se refere à semicarbozona e não apresente relevância na
20 presente invenção.

- **Patente número:** 7,495,023

Título: Tiosemicarbazona e semicarbozone inibidores de cisteína proteases e métodos da sua utilização.

Resumo: A presente invenção relaciona-se com tiosemicarbazona e semicarbazona
25 inibidores de cisteína proteases e métodos de utilização de tais compostos para

prevenir e tratar infecções por protozoários tais como a malária tripanossomíase e leishmaniose. Os compostos também encontram utilização em inibir cisteína proteases associadas com carcinogénese, incluindo as catépsinas B e L. Este documento também se refere à semicarbozona e não apresenta relevância na presente invenção.

- **Patente número:** 6,897,240

Título: Tiossemicarbazona e semicarbazona inibidores de cisteína proteases e métodos da sua utilização.

Este documento se refere também à tiossemicarbazona e semicarbozona e não apresenta relevância na presente invenção.

- **Patente Número:** 6,194,421

Título: Inibidores de proteases de parasitas metazoários.

Resumo: As composições e métodos descritas são para o tratamento de um paciente infectado por um parasita metazoário inibindo a ação enzimática da protease do parasita metazoário, em que é empregue pelo menos um composto de fórmula I em que A é um sistema substituído ou não substituído de anel heteroaromático compreendendo 1-3 anéis que se liga a pelo menos um dos S2, S1 e S1' subsítios; B é um sistema de anel substituído ou não substituído homoaromático compreendendo um a três anéis que se liga a pelo menos um do S1', S1 e S2 subsites; e X é - C = C--C (=.) -. Estas composições e métodos têm utilidade particular no tratamento da malária, esquistossomose e outras doenças infecciosas. Este documento não impõe anterioridade à presente invenção, que emprega como composição básica para a formulação medicamentosa **HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS**.

- **Patente número:** 5,049,561

Título: Anti-helmínticos acylhydrazonas, método de utilização e composições.

Resumo: Diz respeito a um processo para matar os parasitas internos, especialmente nemátodos, trematódeos e cestódeos que afetam animais de sangue quente, tais como ovelhas, gado, suínos, caprinos, cães, gatos, cavalos e seres humanos, bem como de aves, por administração de uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula I, sendo os compostos facilmente preparados por reacções químicas convencionais. Este documento não impõe anterioridade à presente invenção, que emprega como composição básica para a formulação medicamentosa **HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS.**

10 - **Patente número:** PI06013419-0

Título: 2-ciano-pirimidinas e triazinas como inibidores de cisteína protease, composição farmacêutica contendo as mesmas, processo para preparação dos referidos compostos e usos relacionados.

Resumo: Refere-se a compostos da fórmula I e sais destes, a um processo para sua
15 manufatura, a seu uso no tratamento de doenças (especialmente cisteína protease, tais como uch-l3- e/ou usp-2 dependente), ou para a manufatura de formulações farmacêuticas contra estas doenças; métodos de tratamento de animal de sangue quente compreendendo administrar os compostos e/ou seus sais aos referidos animais, e preparações farmacêuticas, especialmente para o tratamento das
20 doenças, compreendendo referidos compostos e/ou sais. Este documento não impõe anterioridade à presente invenção, que emprega como composição básica para a formulação medicamentosa **HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS.**

- **Patente Número:** PI991438-5

Título: Novas composições e métodos para a prevenção e tratamento de doenças
25 de protozoários.

Resumo: Trata de uma composição especialmente adaptada para administração parenteral, por exemplo, intranasal, intramuscular, subcutânea, administração transdérmica ou intravenosa, em que a composição é composta de, pelo menos, um fármaco anti-protozoários em uma quantidade terapeuticamente eficaz para o tratamento ou prevenção de infecções por protozoários no homem e em animais. Em uma forma de realização, a droga anti-protozoários é um agente de triazina-base anticoccidiano, por exemplo, um triazinediona ou triazinetriona tais como diclazuril, toltrazuril, sulfonotoltrazuril ou sais solúveis em água de sódio dos mesmos. Numa forma de realização presentemente preferida, o agente de triazina-Base anticoccidiano é sulfonototrazuril. Os métodos de tratamento de infecções protozoárias no homem e animais são também fornecidos. Este documento não impõe anterioridade à presente invenção, que emprega como composição básica para a formulação medicamentosa **HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS**.

- Patente Número: WO2007056464

Título: Compostos para Inibição de Enzimas.

Resumo: Compostos a base de peptídeos, incluindo heteroátomo que contém três anéis membros eficientemente e seletivamente adotados para inibir as atividades específicas de N-terminais nucleófilo (NTN) hidrolases associados com o proteassoma. Os compostos com base em peptídeos incluem um epóxido ou aziridina, e atuação no N-terminal. Entre outras utilidades terapêuticas, os compostos com base em peptídeos são esperados para exibir propriedades anti-inflamatórias e inibição da proliferação celular. A administração oral destes inibidores a base de peptídios proteassoma é possível devido a seus perfis de biodisponibilidade. Este documento não impõe anterioridade à presente invenção,

que emprega como composição básica para a formulação medicamentosa
HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS.

- Patente número: WO1998010779

Título: Método para tratar doenças parasitárias com inibidores de proteassoma.

5 **Resumo:** Revelando métodos de tratamento de infecções parasitárias em mamíferos por administração de quantidade eficaz de um agente seleccionado de entre o grupo constituído de inibidores do proteassoma, inibidores da via da ubiquitina e suas misturas. Embora este método se volte a aplicativos semelhantes, não impõe anterioridade à presente invenção, que emprega como composição
 10 básica para a formulação medicamentosa **HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS.**

O ESTADO DA TÉCNICA SEGUNDO REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **Título:**

Estudo das propriedades físico-químicas e critérios para a obtenção e validação de modelos QSAR de semicarbazonas similares criados com a atividade antichagásica,
 15 seleccionados da literatura.

Fonte: <http://www.academicoo.com/artigo/study-of-physiochemical-properties-and-criteria-for-obtaining-and-validation-of-qsar-models-of-similar-semicarbazonas-set-with-antichagasic-activity-selected-of-literature>.

Título: Avaliação de tiosemicarbazonas e semicarbazonas como potenciais agentes
 20 anti-Trypanosoma cruzi.

Fonte: <http://www.academicoo.com/artigo/evaluation-of-the-activity-and-toxicity-of-thiosemicarbazones-and-semi-carbazones-against-trypanosoma-cruzi-and-leishmania-l-amazonensis-in-vitro>.

Título: Avaliação de tiosemicarbazonas e semicarbazonas como potenciais agentes anti-Trypanosoma cruzi.

Fonte: Exp Parasitol; 129(4): 381-7, 2011 Dec.

Título: Nitrofurylsemicarbazona rênio e complexos de rutênio como agentes anti-trypanosoma.

Fonte: Eur J Med Chem; 41(11): 1231-9, 2006 Nov.

Título: Síntese e atividade anti-tripanosoma de novo 5-nitro-2-furaldeído e derivados 5-nitrothiopheno-2-carboxaldeído semicarbazona.

Fonte: Farmaco; 53(2): 89-94, 1998 Feb.

Título: Síntese, desenho e avaliação bioquímica de novos inibidores cruzaina com aplicação potencial no tratamento da doença de Chagas.

Fonte: Bioorg Med Chem Lett; 16(16): 4405-9, 2006 Aug 15.

Título: Avaliação da Toxicidade e Atividade de Derivados de tiosemicarbazonas e semicarbazonas contra Trypanosoma cruzi e Leishmania (L.) amazonensis in vitro.

Fonte: Rio de Janeiro; s.n; 2007. ix,131 p. illus, tab, graf, mapas.

Título: Antichagásicos potenciais: Planejamento e Estudo da síntese de biosósteros triazólicos imidazólicos.

Neste estudo, foram selecionados 22 derivados, dentre os quais o composto imidazólico contendo semicarbazona, que está sendo sintetizado, mostrou-se com maior capacidade de sofrer redução no grupo nitro. Dinâmica molecular associada ao encaixe foi utilizada como ferramenta a fim de se avaliar o mecanismo de inibição sobre a cruzaina. Assim, selecionaram-se o NFOH, além de outros sete biosósteros, dentre eles os quatro que foram propostos neste projeto. Após dinâmica molecular de 3 ns, observou-se que a CYS25 da proteína se distanciou da carbonila do NFOH,

sugerindo dificuldade ao ataque proposto na literatura para outros compostos contendo esta região da molécula.

Título: Relações quantitativas estrutura-atividade para uma série de inibidores da cruzaina de Trypanosoma cruzi: modelagem molecular, CoMFA e estudos CoMSIA.

5 **Fonte:** Journal of molecular graphics modelling (2009).

Título: Estudo complementar entre um encaixe e uma tela de alta taxa de transferência em cruzaina Inibidores.

Fonte: Journal of Medicinal Chemistry (2010).

Título: Desenho, Síntese e atividade tripanocida de compostos de chumbo com
10 base em inibidores da glicólise do parasita.

Fonte: Bioorganic & Medicinal Chemistry (2008).

Título: Síntese, atividade tripanocida e estudos de modelagem molecular de 2-alkylaminomethylquinolina derivados.

Fonte: European Journal of Medicinal Chemistry (2011).

15 **Título:** Isoformas de Cisteína protease de Trypanosoma cruzi, 2 cruzipaina e cruzaina, a preferência de substrato diferente presente e suscetibilidade a inibidores.

Fonte: Molecular and Biochemical Parasitology (2001).

Título: Síntese de inibidores de cisteína protease macrocíclicas de trypanosoma.

Fonte: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2008).

20 **Título:** Síntese, concepção e avaliação de d-Homophenylalanyl Epoxysuccinato Inibidores de cisteína protease cruzaina tripanossomal.

Fonte: Tetrahedron (2000).

AVALIAÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA EM RELAÇÃO AOS COMPOSTOS

25 **DESTA INVENÇÃO.**

A análise preliminar esclareceu ser conhecido do estado da técnica que:

a) Cisteína proteinases, bem como outras proteases, tem papel fundamental no desenvolvimento das infecções causadas por parasitas.

b) *T. cruzi* e *Leishmania sp* são alvo de terapias combinadas de semicarbazonas (substância e seus derivados), com demonstração de alta especificidade;

c) Uso de proteases lisossomais, a exemplo das catepsinas para o tratamento de parasitemias é constante do estado da técnica, entretanto, as patentes estão concentradas nas mãos de 02 grupos.

d) Inibidores de cisteína proteinases podem ser utilizados no tratamento de doenças como HIV e tem sido alvo de pesquisas para o desenvolvimento de terapias antiparasitoses;

e) Por sua vez, a literatura e documentos de patente relatam que, tiosemicarbazonas e semicarbazonas, bem como hidrazidas são úteis no tratamento de infecções causadas por *Leishmania sp* e *T. cruzi*;

f) Tiosemicarbazonas e semicarbazonas sintéticas já foram avaliadas em modelos de infecção por *T. cruzi*;

g) Derivados de semicarbazonas e tiosemicarbazonas já testados apresentaram baixa toxicidade quando comparados com o padrão-ouro;

h) A associação de tiosemicarbazonas e semicarbazonas com as drogas mais comumente utilizadas tem demonstrado baixa toxicidade;

i) O desenvolvimento de derivados de tiosemicarbazonas e semicarbazonas com perfil de inibição de enzimas tem aumentado em importância nos últimos 3-4 anos, a julgar pelo aumento no número de depósitos de patentes nos bancos de PCT;

j) Existe uma discussão sobre a eficácia de inibidores nos diversos estágios de desenvolvimento do parasito, durante o processo infeccioso.

Assim, resta claro que estudos envolvendo semicarbazonas no tratamento de Doença de Chagas e Leishmaniose já são conhecidos; no entanto, as pesquisas conduzidas nesta invenção levaram, com grande eficácia, à utilização da Hidrazida-N-Acilidrazonas como composição altamente eficiente nestes tratamentos, com resultados ainda não explorados pelo estado da técnica.

APLICAÇÃO DA INVENÇÃO

10 As composições resultantes da invenção se destinam ao uso como alternativa terapêutica no tratamento da leishmaniose cutânea e/ou muco-cutânea e/ou visceral em humanos e animais, bem como no tratamento da fase aguda e/ou crônica da Doença de Chagas.

OBJETO RESULTANTE DA INVENÇÃO

Novas séries de derivados de hidrazida-N-acilidrazonas, obtidas a partir do estudo de semicabazonas, com ação na inibição de cisteína proteinases envolvidas nos processos infecciosos causados por Leishmania sp. E Trypanosoma cruzi;

Otimização do(s) composto(s) líder(es) para ajuste das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas e geração de um candidato a fármaco.

CARACTERÍSTICAS DO OBJETO DA INVENÇÃO

Os inventores determinaram como características da investigação: sintetizar e avaliar farmacologicamente, em modelos in vitro e in vivo, novas séries de derivados hidrazida-N-acilidrazônicos, desenhados como inibidores de cisteinil proteases, entre

elas a cruzaina ou cruzipaina e a catepsina importantes cistenil proteases encontradas nas formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigoras de *T. cruzi* e, promastigota e amastigosta de *Leishmania* sp. e, realizar a etapa de otimização do (s) protótipo (s) identificado (s) visando adequar suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, de modo a assegurar sua passagem ao estágio de candidato a fármaco.

DESCRIÇÃO SINTÉTICA DO OBJETO DA INVENÇÃO

a) Planejamento da série de derivados hidrazida-N-acilidrazona funcionalizados, aplicando-se a estratégia de hibridação molecular entre os protótipos LASSBio-1111 e LASSBio-1064. Neste processo foi proposta a hibridação da subunidade aril-hidrazida de LASSBio-1111 com a acilidrazona funcionalizada de LASSBio-1064, visando a construção de novo padrão molecular que conjugue as propriedades leishmanicida e/ou tripanomicida, identificadas para os protótipos selecionados.

A denominação LASSBio foi atribuída aos protótipos, para efeito de identificação dos mesmos durante as várias etapas do desenvolvimento, os quais serão apresentados a medida em que a descrição ocorrer.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Para melhor entendimento da invenção, são destacadas as seguintes figuras, que melhor orientam a descrição, sem criar ambientes limitativos:

Figura 1: Representa graficamente o percentual de medicamentos desenvolvidos entre 1975 e 2004.

Figura 2: Diagrama de Venn de genomas de cinetoplastídeos indicando o número de genes compartilhados e espécie-específica entre as espécies (A). Comparação entre

T. brucie, *T. cruzi*, *L. major* (B). Comparação entre *L. brasilienses*, *L. infantum* e *L. major*.

Figura 3: Avaliação de derivados hidrazido-*N*-acilidrazônicos e miltefosina nas concentrações de 100 μ M (A) e 10 μ M (B) no ensaio de viabilidade do parasito *L. major* (10^6 células /poço). Os resultados referem-se à média \pm erro padrão de triplicatas de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando #p < 0,05, ##p < 0,01 em relação ao controle negativo (células cultivadas apenas com meio); e *p < 0,05, **p < 0,01 quando comparado ao grupo de células cultivadas com meio e veículo.

Figura 4: Efeito dos derivados sobre o curso da lesão da orelha de camundongos Balb/c infectados com *L. major*. Os animais foram infectados com 10^5 promastigotas de *L. major* na derme da orelha durante o tratamento (35 dias) com Veículo (PBS), antimoníato de meglumina (A, 30 μ mol/kg/dia, i.p.), LASSBio-1491(B, 10 μ mol/kg/dia, i.p.) e LASSBio-1492 (C, 10 μ mol/kg/dia, i.p.). Os resultados referem-se à média da variação da espessura da lesão da orelha em mm \pm erro médio padrão. Os valores foram considerados significativos quando *p < 0,05 quando comparado com o grupo veículo.

Figura 5: Efeito dos derivados sobre a carga parasitária na orelha (A) e linfonodo drenante (B) de camundongos Balb/c infectados com *L. major*. Os animais foram infectados com promastigotas de *L. major* tratados com Veículo (PBS), antimoníato de meglumina (30 μ mol/kg/dia, i.p.), LASSBio-1491 e LASSBio-1492 (10 μ mol/kg/dia, i.p.). Os resultados referem-se à média \pm erro padrão de quadruplicatas de um experimento representativo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

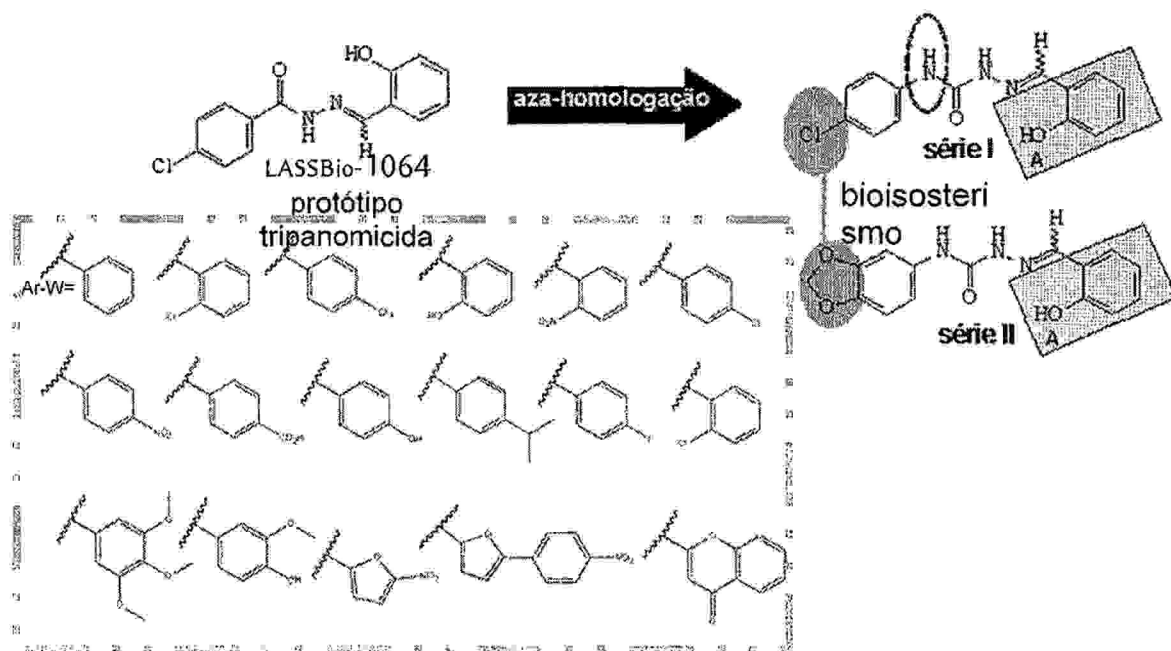
O COMPOSTOS HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPOSTOS HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS, USO DE COMPOSTOS A PARTIR DE HIDRAZIDA-N-ACILIDRAZONAS PARA TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E DOENÇA DE CHAGAS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

5 **OBTIDAS**, objeto desta Patente de Invenção, consiste de compostos que, para efeito de estudo, foram divididos em derivados semicarbazônicos série I e série II e derivados hidrazida-N-acilidrazona série III e série IV.

Planejamento dos derivados semicarbazônicos série I e série II:

O planejamento da série de derivados semicarbazônicos Ia-I foi realizada aplicando-se a estratégia de aza-homologação sobre a estrutura do protótipo tripanomicida
10 LASSBio-1064, representada pela inserção do grupo NH como espaçador entre as subunidades aromática e acilidrazona de LASSBio-1064.

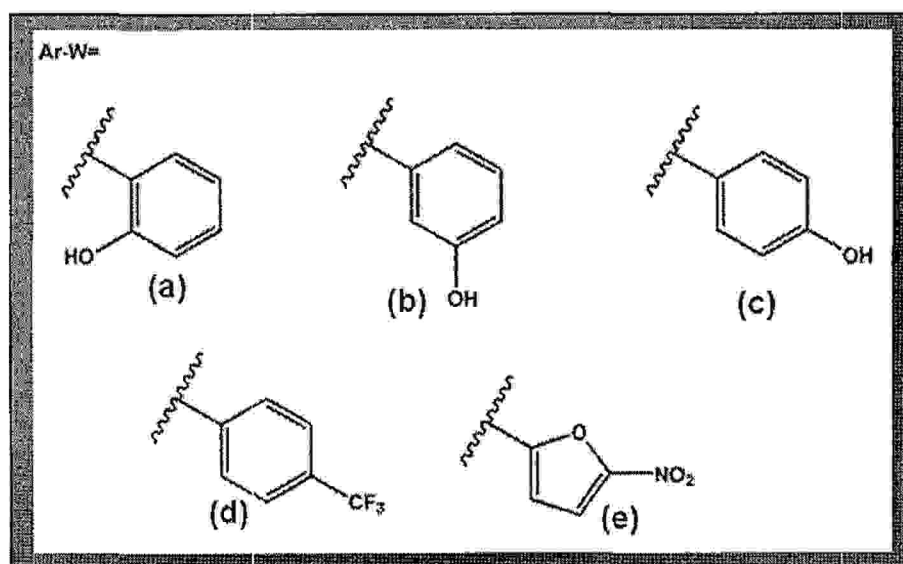
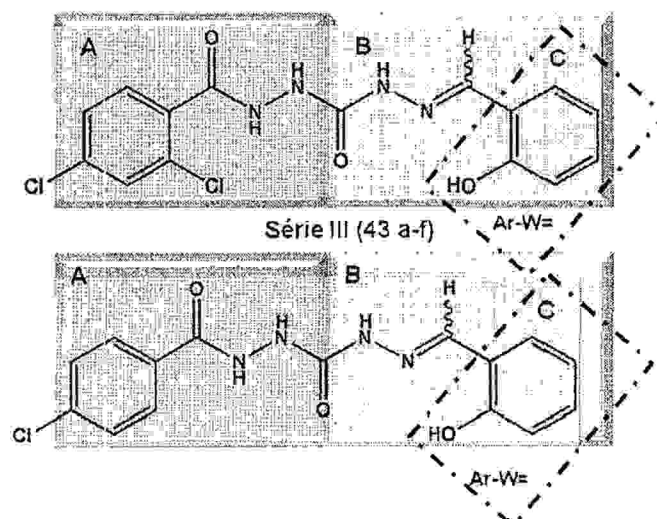
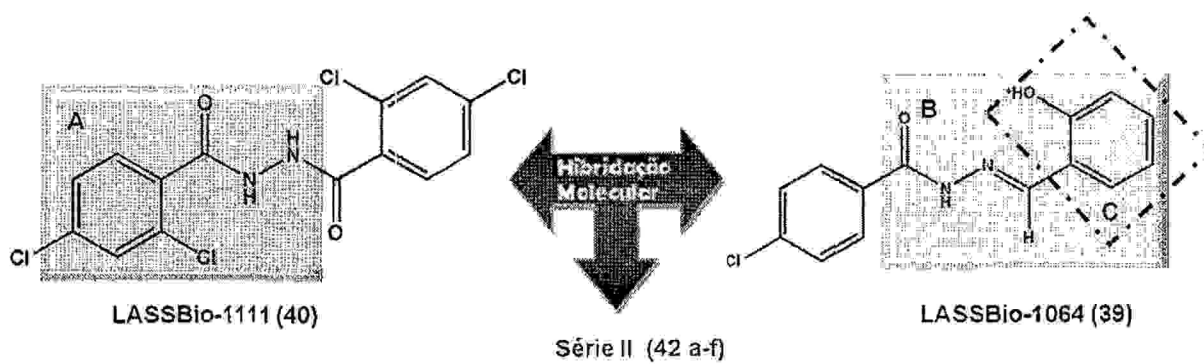
Posteriormente, foi proposta a troca bioisostérica do átomo de cloro, presente nos derivados da série Ia-I, pela unidade metilenodioxila, permitindo o desenho dos
15 derivados semicarbazônicos da série II (Fórmula 1). Ressalte-se que este tipo de bioisosterismo foi previamente identificado em nosso laboratório quando da descoberta do safrolobano a partir do daltrobano (Lima, L M (1997) Dissertação de Mestrado, IQ, UFRJ).



Fórmula 1: Gênese das séries I e II a partir da aplicação da estratégia de aza-homologação sobre o protótipo LASSBio-1064.

Planejamento dos derivados hidrazida-N-acilidrazona série III e série IV:

- 5 O planejamento da série de derivados hidrazida-N-acilidrazona funcionalizados foi realizado aplicando-se a estratégia de hibridação molecular entre os protótipos LASSBio-1111 e LASSBio-1064. Neste processo foi proposta a hibridação da subunidade aril-hidrazida de LASSBio-1111 (A, Fórmula 2) com a acilidrazona funcionalizada de LASSBio-1064 (B, Fórmula 2), visando a construção de novo
- 10 padrão molecular que conjugue as propriedades leishmanicida e tripanomicida, identificadas para os protótipos selecionados. A eleição dos grupos 4-nitrofurano e 2-hidroxibenxeno como substituintes da função imina foi proposta considerando resultados prévios que indicaram a maior relevância destes substituintes para a
- 15 atividade desejada, quando comparado aos demais substituintes exemplificados na Fórmula 2.



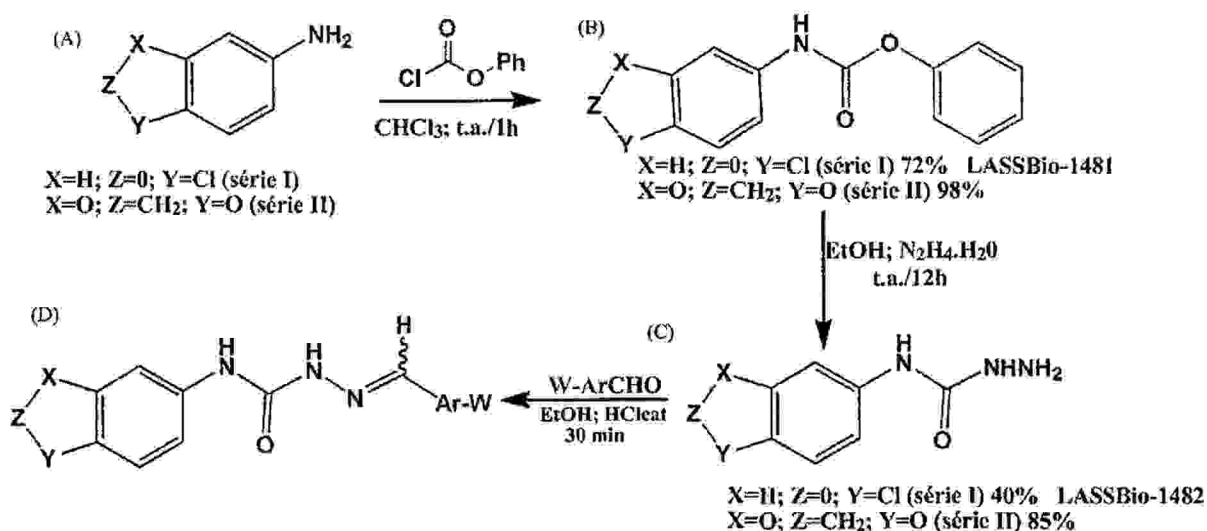
Ar-W = aromáticos ou heteroaromáticos substituídos em diferentes posições com grupos elétron retiradores e/ou elétron doadores. Os radicais a-e exemplificam algumas possibilidades, mas não limitam os exemplos possíveis.

Fórmula 2: Gênese das séries III e IV a partir da aplicação da estratégia de hibridação molecular entre os protótipos LASSBio-1111 e LASSBio-1064.

Pode-se assim, dividir a metodologia sintética em 4 séries, que possuem em comum reações de interconversão de grupos funcionais baseadas em reações de condensação e hidrazinólise.

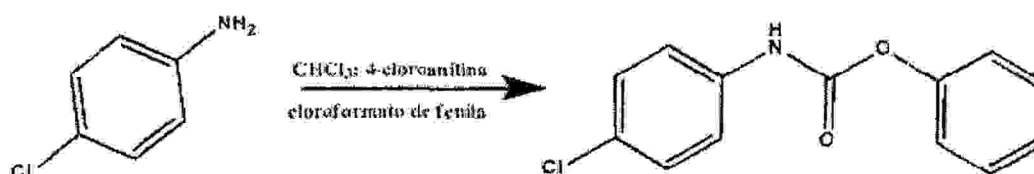
Resultados e discussão:

10 Resumo séries I e II (Fórmula 3):



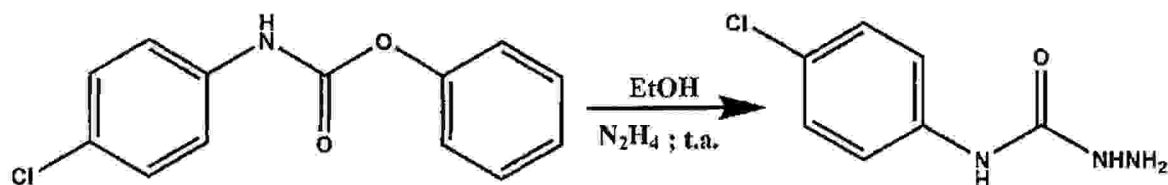
Síntese Série I:

Síntese do phenyl 4-chlorophenylcarbamate: LASSBio-1481 (Fórmula 4):



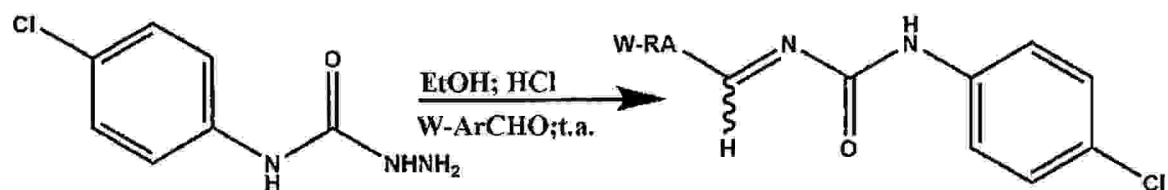
Em um balão de 125 ml contendo 30 ml de clorofórmio, foram adicionados 11,8 ml(0,093 mols(1,2eq)) de cloroformato de fenila. Em seguida foi adicionada uma solução, de 10g de 4-cloroanilina(0,078mols) em 50 ml de clorofórmio, lentamente com uma pipeta. No termino da adição já havia precipitado e a reação era exotérmica, porém após 32 horas foi verificado total consumo do produto de partida. O volume de solvente foi diminuído no rotaevaporador e foi adicionado 50 ml de hexano, deixando a reação em agitação por 10 minutos. A reação foi filtrada a vácuo, sendo lavado com hexano, obtido-se um sólido branco com 72% de rendimento.

10 **Síntese da N-(4-chlorophenyl)hydrazinecarboxamide: LASSBio-1482 (Fórmula 5):**

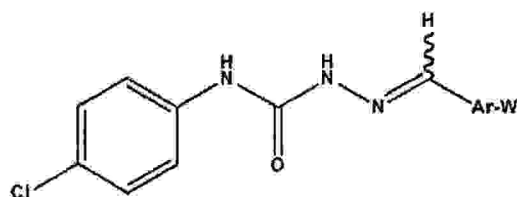


Em um balão de 500 ml contendo 6,8g(0,032mols) de phenyl 4-chlorophenylcarbamate, foi adicionado 20 ml de etanol e 45 ml(0,93 mol(30eq)) de hidrato de hidrazina 64%. Após 4 horas foi diminuído o volume do solvente e adicionado gelo, sendo verificada a precipitação do produto, com 41% de rendimento.

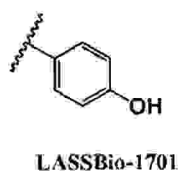
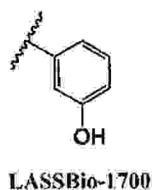
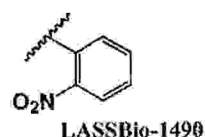
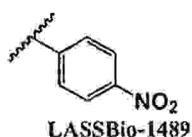
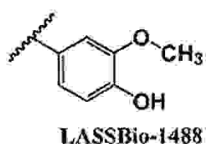
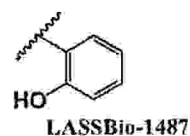
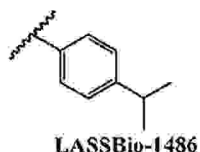
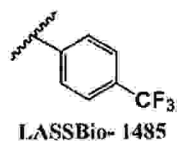
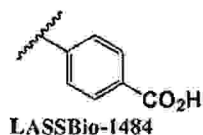
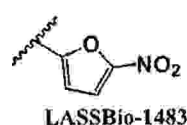
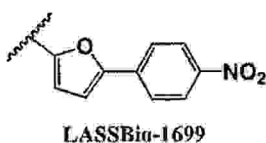
Síntese da série semicarbazona (Fórmula 6):



Em um balão de 25 ml contendo 0,25g(0,00135 mols) de semicarbazida, sob agitação e temperatura ambiente, foi adicionado 15 ml de etanol e 1,35mmol de aldeído(previamente selecionado), seguida da adição de 1 gota de HCl concentrado. A solução permaneceu sob agitação por 30-240 min, quando CCF foi verificado o termino da reação. Após a adição de gelo a solução foi filtrada a vácuo, sendo obtidos os seguintes compostos, conforme Fórmula 7 abaixo:



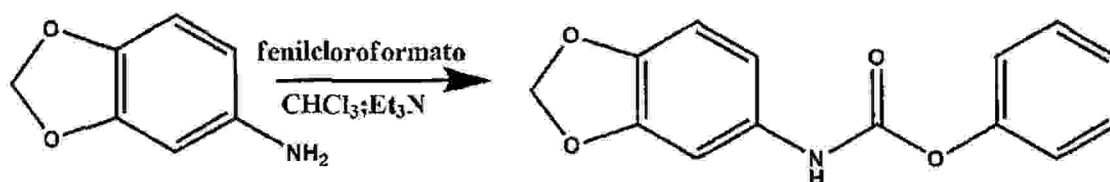
Ar-W =



Após a caracterização estrutural através das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio, o grau de pureza das substâncias foi medida, resultando nos resultados abaixo, conforme tabela 4:

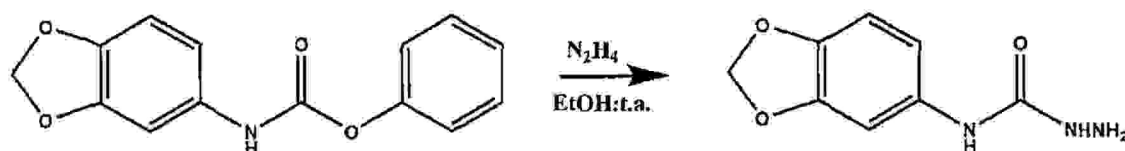
Composto	Rendimento	PF(°C)	CHN	HPLC
LASSBio-1481	72%	189-192	<0,4%	-
LASSBio-1482	41%	>250	<0,4%	-
LASSBio-1699	64%	247-250	>0,4%	-
LASSBio-1483	80%	180-184	<0,4%	-
LASSBio-1484	80%	>250	<0,4%	-
LASSBio-1485	86%	216-220	<0,4%	-
LASSBio-1486	61%	136-140	<0,4%	-
LASSBio-1487	87%	196-200	<0,4%	-
LASSBio-1488	90%	218-220	<0,4%	-
LASSBio-1489	52%	247-250	<0,4%	-
LASSBio-1490	84%	200-203	<0,4%	-
LASSBio-1700	85%	175-177	-	98,56%
LASSBio-1701	79%	204-206	-	98,18%

5 Critério de pureza: CHN <0,4%; HPLC>98%

Série II:**Síntese do phenyl benzo[d][1,3]dioxol-5-ylcarbamate (Fórmula 8):**

Em um balão de 50ml, contendo 10ml de clorofórmio foi adicionado 0,27ml (0,00218 mols) de fenilcloroformato , e em seguida uma solução de 0,3g (0,00218mols) de amina em 7 ml de clorofórmio, e por fim, foi adicionado 0,3ml de trietilamina. A solução reagiu durante um hora, em temperatura ambiente e por CCF(dic:met2%) indicou o termino da reação.

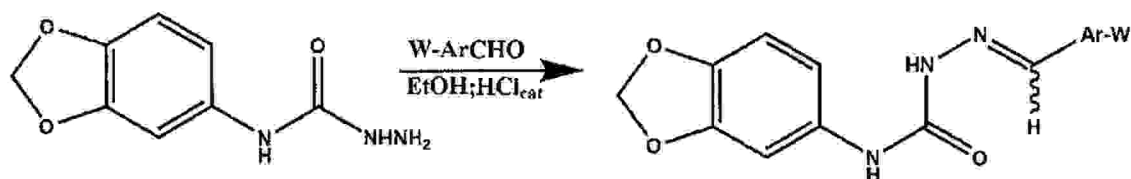
O volume do solvente foi diminuído, e com ~5ml foi adicionado éter de petróleo aquecido por 50°C , que ficou agitando por 10 min. A reação foi filtrada e lavado a seco com hexano fornecendo 95% de rendimento.

Síntese do N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)hydrazinecarboxamide (Fórmula 9):

Em um balão de 250 ml contendo 2,5g (0,011mols) do carbamato, foi adicionado 60ml de etanol e 24ml (0,44mols) de hidrazina aquosa 59%. Foi deixado em agitação por 24 horas, sendo observado a precipitação de um sólido bege, onde CCF (di:met2%) indicou o termino da reação.

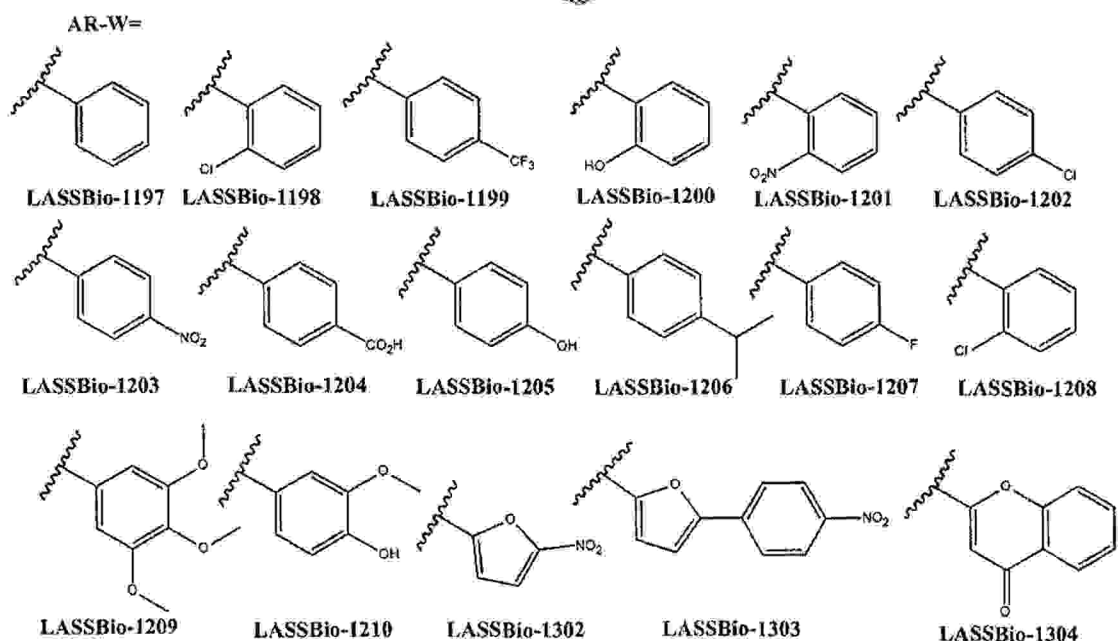
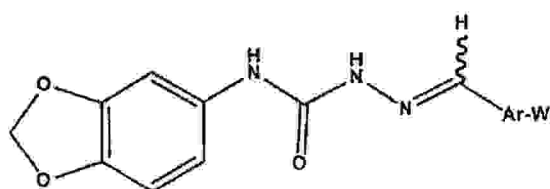
Para o isolamento, a reação foi colocada sob um Becker contendo gelo e posteriormente, filtrada a vácuo, obtendo rendimento de 85%

Acoplamento dos aldeídos funcionalizados (Fórmula 10):



Em um balão de 50 ml contendo 0,2g de semicarbazida, foi adicionado, sob agitação e temperatura ambiente, 10ml de etanol e 1,025mmol de aldeído previamente selecionado, seguido de 1 gota de ácido clorídrico. A solução permaneceu sob

Para o isolamento foi adicionado gelo e filtrado a vácuo, obtendo os seguintes rendimentos, conforme fórmula 11 abaixo:

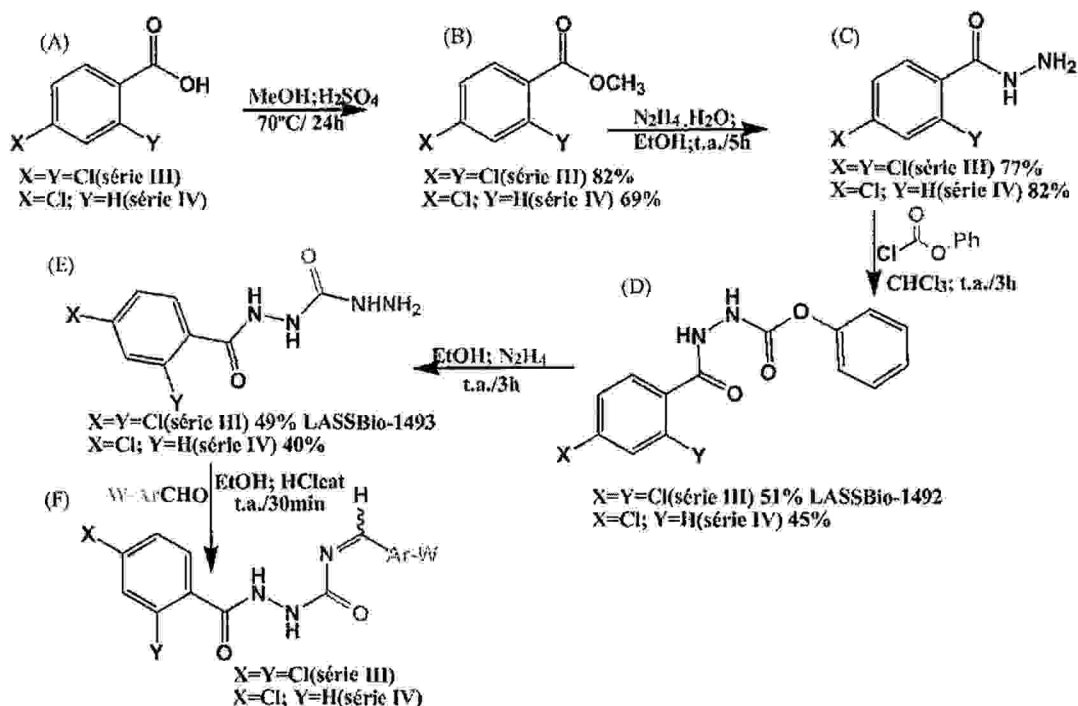


Após a caracterização estrutural através das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio, o grau de pureza das substâncias foi medida através do CHN, assim, as substâncias que obtiveram resultados inferiores a 0,4, foi possível o cadastramento e posterior análise farmacológica. Tabela 5:

Ar - W	Rendimento	PF (°C)	CHN
LASSBio1197	85,5%	206-211	<0,4%
LASSBio1198	94%	>250	<0,4%
LASSBio1199	92%	242-245	<0,4%
LASSBio1200	87%	215-217	<0,4%
LASSBio1201	89%	203-205	<0,4%
LASSBio1202	98%	203-206	<0,4%
LASSBio1203	87,5%	>250	<0,4%
LASSBio1204	86,6%	>250	<0,4%
LASSBio1205	84%	202-204	<0,4%
LASSBio1206	55%	133-138	<0,4%
LASSBio1207	83%	204-206	<0,4%
LASSBio1208	97%	192-197	<0,4%
LASSBio1209	79%	188-191	<0,4%
LASSBio1210	75%	194-201	<0,4%

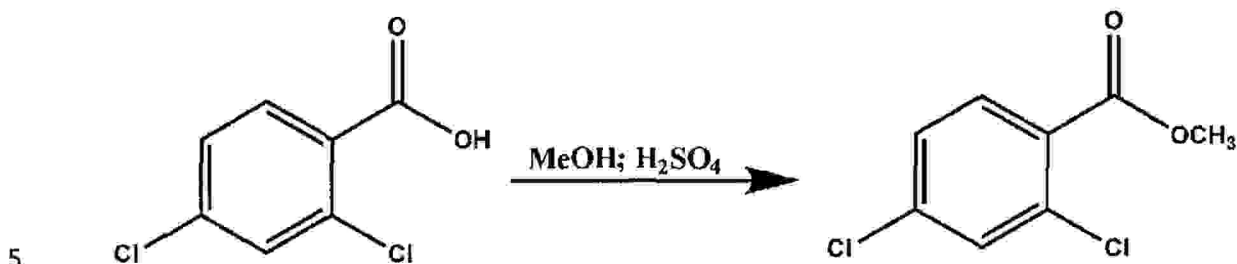
5

Resumo séries III e IV (Fórmula 12):



Série III:

Síntese do methyl 2,4-dichlorobenzoate (Fórmula 13):

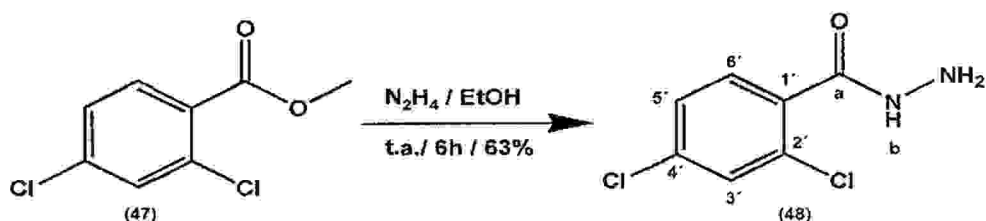


Foi adicionado, num balão de 500ml, 10g (0,052 mols) do ácido 2,4 diclorobenzóico em 200 ml de metanol e 50 gotas de ácido sulfúrico. O balão foi acoplado a um aparelho de DeanStak, e colocado em agitação vigorosa em refluxo à temperatura de aproximadamente 70°C por aproximadamente 24 horas, onde CCF(hex/acet30%) indicou o término da reação.

10

O volume do metanol foi reduzido, e o pH elevado até 8, onde após a extração com acetato de etila e concentrado no rotaevaporador, foi obtido um óleo com rendimento de 81%.

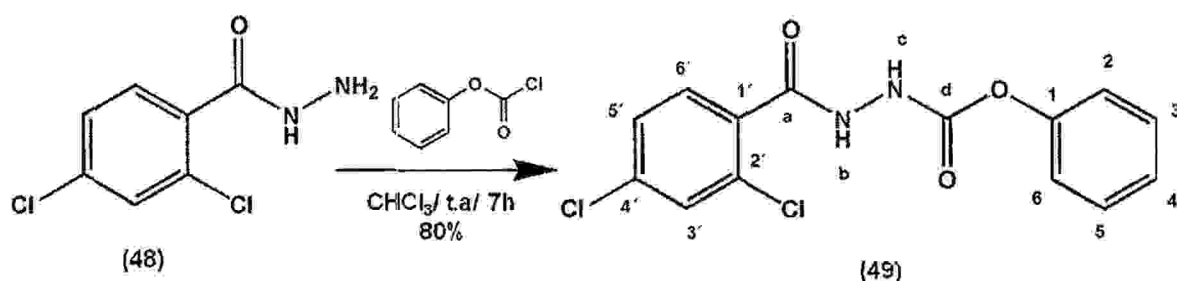
5 Síntese da 2,4-dichlorobenzohydrazide (48) (Fórmula 14):



Um balão contendo 2,5g (12mmol) de 2,4-diclorobenzoato de metila (47) foram adicionado 25 ml de etanol e 7.3 ml (0.146mols; 12eq) de N_2H_4 64%. A mistura foi submetida a agitação em temperatura ambiente por 6 horas, quando indicou término da reação acompanhado por CCF (eluente: diclorometano: metanol 10%). O volume foi reduzido a vácuo e adicionado gelo para precipitação do produto, que foi filtrado à vácuo e lavado com água. Aspecto físico: sólido branco; rendimento: 63%; PF=

- RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6): δ 9,62 (s, 1H, H_b); 7,62 (d, 1H, H_{6'}, J = 2Hz); 7,46 (d, 1H, H_{5'}, J = 2Hz); 7,43 (s, 1H, H_{3'}); 4,52 (s, 2H, NH_2)
- RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): \square 164,73 ($\text{C}=\text{O}$); 134,61 (C_{2'}); 134,45 (C_{4'}); 131,57 (C_{6'}); 130,48 (C_{1'}); 129,13 (C_{3'}); 127,23 (C_{5'})
- IV (KBr) cm^{-1} : 3309 (\square NH); 1663 (\square $\text{C}=\text{O}$); 1616 (δ N-H)
- Pureza (HPLC): 98.67%

Síntese do phenyl 2-(2,4-dichlorobenzoyl)hydrazinecarboxylate LASSBio-1492 ; 49 (Fórmula 15):



Em um balão de 50 ml, foram adicionados 20 ml de clorofórmio e 4,9ml de
 fenilcloroformato (6mmol; 1.2eq). A solução foi agitada a temperatura ambiente e
 adicionado, vagorosamente, uma suspensão de 1 g (5mmols) de 2,4-
 5 diclorobenzohidrazida em 50 ml de clorofórmio. Após 7 horas de agitação foi
 observado total consumo do produto de partida, acompanhada por CCF
 (eluente:diclorometano:metanol 5%). A seguir foi adicionado 10 ml hexano na
 reação, mantendo-a sob agitação por 10 min. Em seguida esta foi filtrada a vácuo e
 lavado com hexano obtendo-se o produto **49 (LASSBio-1492)**. Aspecto físico: sólido
 10 branco; PF=180-184°C; Rendimento: 80%

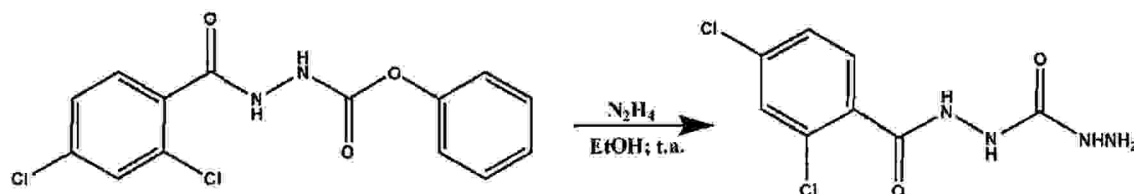
- **RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6):** δ 10,49 (s, 1H, H_b); 10,05 (s, 1H, H_c), 7,74 (d, 1H, H_{6'}, $J=2\text{Hz}$); 7,58-7,14 (m, 5H, H_{3'}, H_{5'}, H₂, H₄ e H₆); 6,89 (d, 2H, H₃ e H₅, $J=6\text{ Hz}$)

- **RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm):** δ 163,12 (Cd, C=O), 154,24 (Ca, C=O); 150,61 (C_{2'}); 135,42 (C_{4'}), 133,15 (C_{6'}); 131,71 (C_{1'}); 130,54 (C₁); 129,51 (C₂ e C₆); 129,45 (C₃ e C₅); 127,48 (C_{3'}); 125,44 (C_{5'}); 121,50 (C₄)

- **IV (KBr) cm^{-1} :** 3247 (\square NH); 1741 e 1661 (\square C=O); 1033 (\square Ar-Cl)

- **Pureza (HPLC):** 98.45%

Reação de hidrazinólise da hydrazinecarboxylate LASSBio-1493 (Fórmula 16):

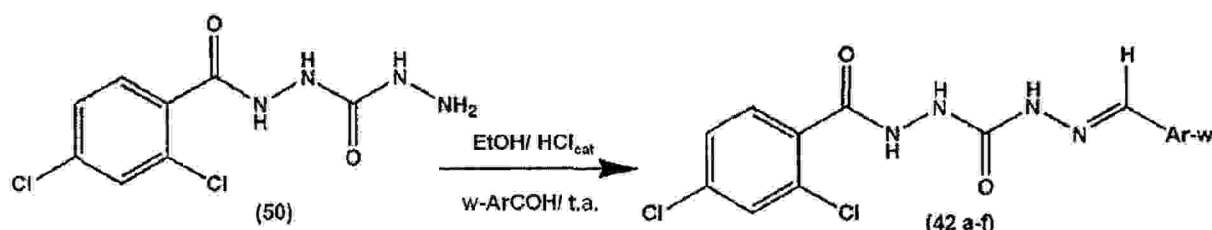


Foi adicionado em um balão de 50ml 0,3g de produto de partida, 7 ml de etanol, até total solubilização e então foi colocado 3,84 ml de hidrazina hidratada 80%(30 eq).

- 5 Após 32 horas foi constatado o fim da reação. O volume reacional foi diminuído, e após adição de gelo e a formação de precipitado, a solução filtrada a vácuo sendo obtido com um rendimento de 65%.

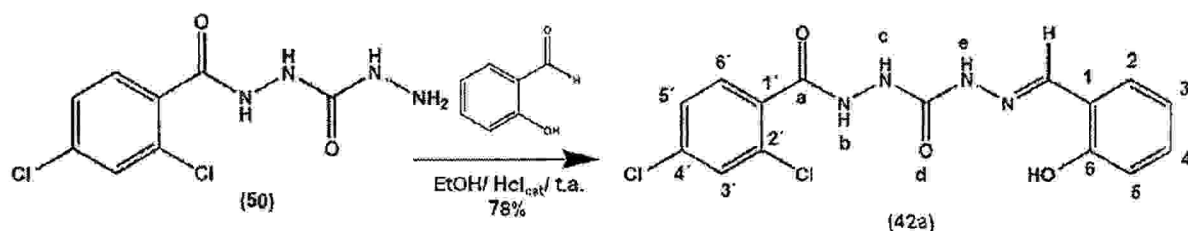
Metodologia geral de obtenção dos derivados hidrazida-*N*-acilidrazonas série

10 **II (42 a-f) (fórmula 17):**



- Em um balão contendo 0,1g do intermediário **50**, foi adicionado, sob agitação e temperatura ambiente, 10ml de etanol e 0,30mmol (1eq) de aldeído previamente selecionado, seguido da adição de 1 gota de ácido clorídrico concentrado. A solução
- 15 permanece sob agitação por 1-4 horas, quando CCF (diclorometano:metanol 5-10%) indicou o término da reação. O volume do meio reacional foi reduzido (2/3 do volume) em rotaevaporador, e após a adição de gelo foi verificado a precipitação do produto, que foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada.

Metodologia de obtenção do (E)-1-(2-hidroxibenzilideno)-5-(2,4-diclorobenzoi)carbonohidrazida (LASSBio-1705); (42a) (fórmula 18):



5 O composto **42a** foi obtido a partir da condensação da hidrazida **50** com 2-hidroxbenzaldeído com rendimento de 78%. Aspecto físico: sólido branco. PF= 210-213°C

- RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ 10,66 (s, 1H_b); 10,16 (s, 1H_c); 10,03 (s, 1H, OH); 9,11 (s, 1H, H_e); 8,23 (s, 1H, N=CH); 7,92 (d, 1H, H_{6'}, $J=$ 8); 7,73 (s, 1H, H_{3'}); 7,60 (m, 2H, H₂ e H_{5'}); 7,20 (t, 1H, H₄, $J=6$); 6,90-6,80 (m, 2H, H₃ e H₅)

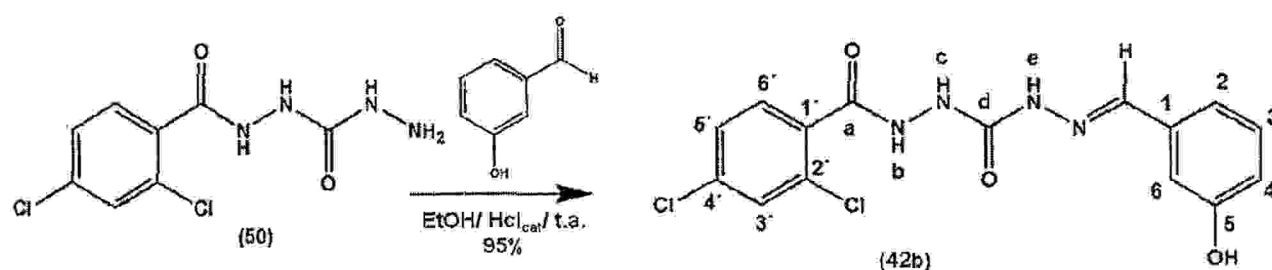
- RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 165,3 (C_d, C=O); 155,9 (C_a, C=O); 154,8 (N=CH); 139,1 (C₆); 135,1 (C_{2'}); 133,5 (C_{4'}); 131,7 (C_{6'}); 130,8 (C₂); 130,5 (C_{1'}); 129,4 (C₄); 127,3 (C_{3'}); 127,1 (C_{5'}); 120,3 (C₁); 119,1 (C₅); 116,0 (C₃)

- IV (KBr) cm^{-1} : 3436-1852 (\square OH); 3232 (\square NH); 1708 (\square C=O); 1655 (δ N-H); 1046 (\square C-Cl)

- MS (m/z): 365

Pureza (HPLC): 99.83%

Metodologia de obtenção do (E)-1-(3-hidroxibenzilideno)-5-(2,4-diclorobenzoil)carbonohidrazida (LASSBio-1708); (42b) (fórmula 19):



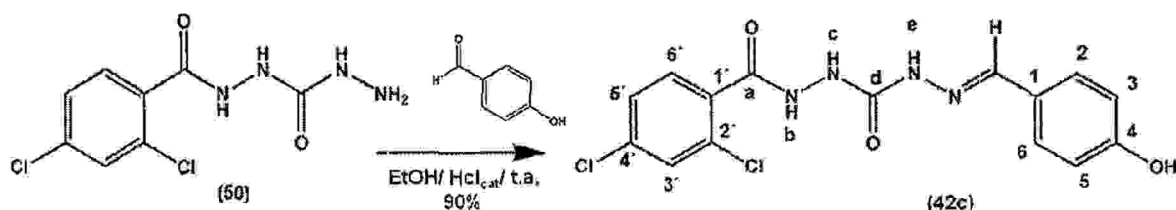
O composto **42b** foi obtido a partir da condensação da hidrazida **50** com 3-hidroxibenzaldeído em rendimento de 95%. Aspecto físico: sólido branco. PF= 223-225°C

- RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ 10,62 (s, 1H_b); 10,12 (s, 1H_c); 9,48 (s, 1H, OH); 9,05 (s, 1H_e); 7,80 (s, 1H, N=CH); 7,71 (s, 1H_{3'}); 7,70-7,50 (m, 2H, H_{5'} e H_{6'}); 7,18 (t, 3H, H₂, H₃ e H₄); 6,76 (d, 1H₆)

- MS (m/z): 365

Pureza (HPLC): 98.58%

15 Metodologia de obtenção do (E)-1-(4-hidroxibenzilideno)-5-(2,4-diclorobenzoil)carbonohidrazida (LASSBio-1707); (42c) (fórmula 20):



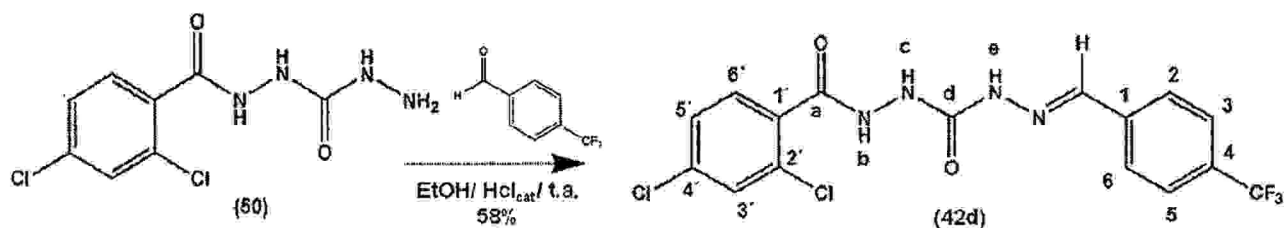
O composto **42c** foi obtido a partir da condensação da hidrazida **50** com 4-hidroxibenzaldeído em rendimento de 90%. Aspecto físico: sólido branco. PF= 225-227°C

- 5
- RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ 10,53 (s, 1H, H_b); 10,16 (s, 1H, H_c); 9,83 (s, OH); 9,05 (s, 1H_e); 7,84 (s, 1H, N=CH); 7,76 (s, 1H, 1H_{3'}); 7,67 (d, 2H, H₂ e H₆, $J=10$ Hz); 7,58 (m, 2H, H_{5'} e H_{6'}); 6,82 (d, 2H, H₃ e H₅, $J=10$ Hz)
- 10
- RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 165,3 (C_d, C=O); 158,7 (C_a, C=O); 155,0 (N=CH); 141,2 (C₄); 135,1 (C_{2'}); 133,6 (C_{4'}); 131,7 (C_{6'}); 130,8 (C_{1'}); 129,4 (C₁); 128,5 (C₂ e C₆); 127,3 (C_{3'}); 125,5 (C_{5'}); 115,41 (C₃ e C₅)
 - IV (KBr) cm^{-1} : 3362 (\square NH); 1694 (\square C=O); 1651 (δ N-H); 1098 (\square C-Cl)
 - MS (m/z): 365

Pureza (HPLC)= 99,84%

15

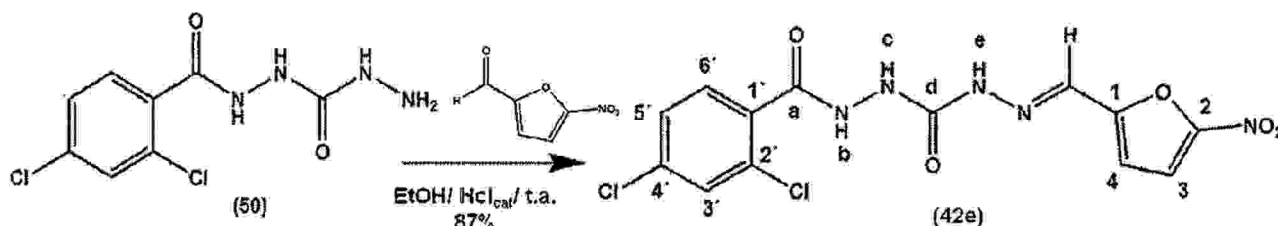
Metodologia de obtenção do (E)-1-(4-(trifluormetil)benzilideno)-5-(2,4-diclorobenzoil)carbonohidrazida (LASSBio-1736); (42d) (fórmula 21):



O composto **42d** foi obtido a partir da condensação da hidrazida **50** com 4-triflorometilbenzaldeído em rendimento de 58%. Aspecto físico: sólido branco. PF= 213-216°C

- 5
- RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ 10,93 (s, 1H, H_b); 10,17 (s, 1H, H_c); 9,34 (s, 1H, H_e); 8,07 (d, 2H, H₃ e H₅, $J=10\text{Hz}$); 7,97 (s, 1H, N=CH); 7,77 (s, 1H, H_{3'}); 7,74 (m, 2H, H₂ e H₆); 7,55 (m, 2H, H_{5'} e H_{6'})
 - RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 165,33 (Cd, C=O); 154,71 (Ca, C=O); 139,19 (N=CH); 138,54 (C₄); 135,20 (C₃ e C₅); 133,59 (C₂ e C₆); 131,77 (C_{2'}); 130,80 (C_{4'}); 128,68 (C_{6'}); 128,05 (C_{1'}); 127,45 (C_{3'}); 127,36 (C_{5'}); 125,38 (C₁); 121,47 (CF₃)
 - IV (KBr) cm^{-1} : 3555 (\square NH); 1703 (\square C=O); 1655 (δ N-H); 1015 (\square C-Cl); 1164-1105 (C-F)
 - MS (m/z): 417
- 10
- 15
- Pureza (HPLC): 99.84%

Metodologia de obtenção do (E)-1-(2,4-diclorobenzoi)-5-((5-nitrofuran-2-il)metileno)carbonohidrazida (LASSBio-1703); (42e) (fórmula 22):



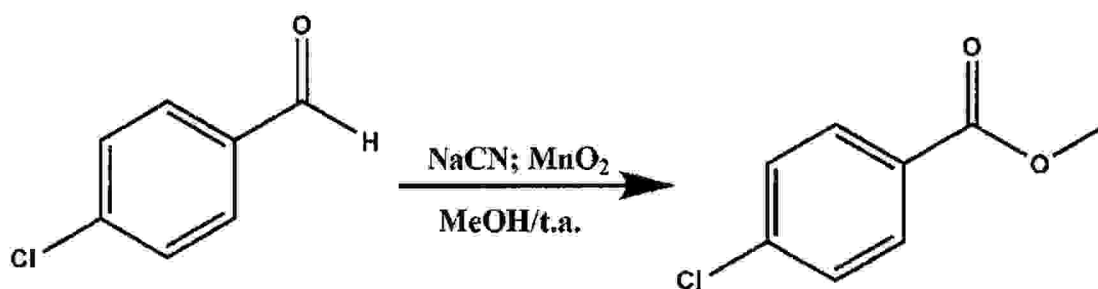
O composto **42e** foi obtido a partir da condensação da hidrazida **50** com 2-nitrofuraldeído obtendo rendimento de 87%. O composto foi recristalizado com etanol. Aspecto físico: sólido amarelo. PF= 222-225°C

- 5 • **RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm):** 11.22 (s, 1H, H_b) 10,22 (s, 1H, H_c); 9.18 (s, 1H, H_e); 7.86 (s, 1H, N=CH); 7.79 (d, 1H, H₃, J = 4Hz); 7.71 (s, 1H, H_{3'}); 7.57 (m, 2H, H_{5'} e H_{6'}); 7.32 (d, 1H, H₄, J =4 Hz)
- 10 • **RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm):** 165,2 (C_d); 154,0 (C_a); 152,7 (C₂); 151,2 (N=CH); 135,1 (C_{2'}); 133,3 (C_{4'}); 131,7 (C₁); 130,7 (C_{6'}); 129,3 (C_{5'}); 129,1 (C_{1'}); 127,2 (C_{3'}); 115,0 (C₃); 112,5 (C₄)
- **IV (KBr) cm^{-1} :** 3387 (\square NH); 1727 (\square C=O); 1667 (δ N-H); 1015 (\square C-Cl); 1244 e 1281 (N=O)
- **MS (m/z):** 384

Pureza: 99.33%

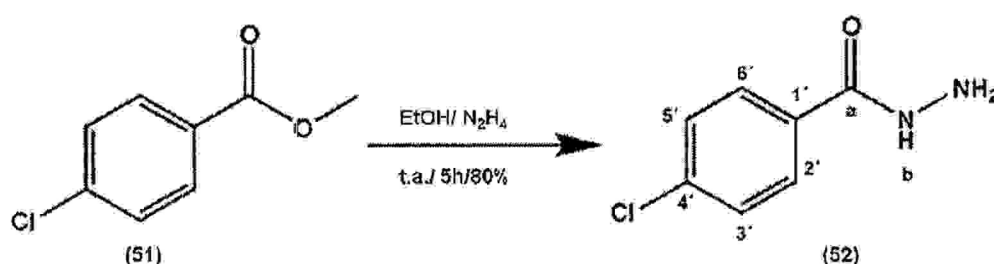
15 **Série IV:**

Síntese da methyl 4-chlorobenzoate (Fórmula 23):



Em um balão de 500 ml, foi adicionado 10g de 4-clorobenzaldeído(0,071mols), 250 ml de metanol, 18g(0,356 mol) de NaCN e 15g(0,44mols) de MnO₂ ativado, permanecendo sob agitação vigorosa sob temperatura ambiente. Após 8 horas, foi
 5 verificado por c.c.f.(Hex:Acet 30%) o termino da reação. Esta foi filtrada em filtro de vidro sinterizado, com sílica gel e Celite, onde no filtrado foi adicionado sulfato de sódio e concentrado no rotaevaporador, gerando um óleo amarelado, com rendimento de 69%.

10 **Metodologia de obtenção da 4-clorobenzohidrazida (LASSBio-1108) (52)**
(fórmula 24):



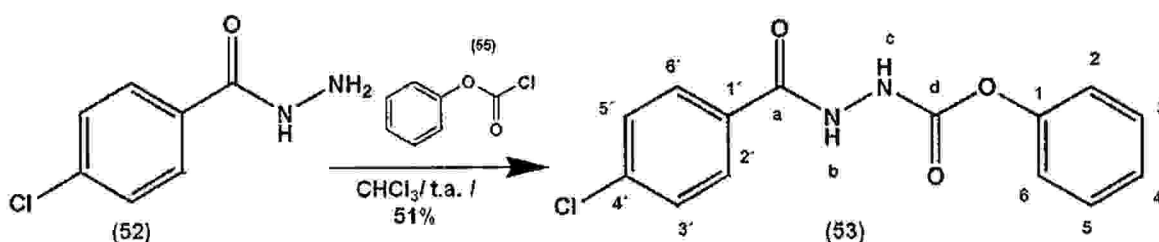
Em um balão contendo 5g (29mmol) de 4-clorobenzoato de metila (51) foram adicionados 50ml de etanol e 14.2 ml (0.29mol; 10eq) de N₂H₄.H₂O 64%. A reação
 15 foi submetida a agitação em temperatura ambiente por 5 horas, onde o término reacional foi acompanhado por CCF (eluente: diclorometano:metanol 10%). O volume foi reduzido em rotaevaporador, e adicionado gelo para precipitação do

produto, que foi filtrado à vácuo e lavado com água. Aspecto físico: sólido branco; rendimento: 80%

- IV (KBr) cm^{-1} : 3310 (\square NH); 1656 (\square C=O); 1591 (δ N-H); 1008 (\square C-Cl);
- MS (m/z): 169

5 Pureza (HPLC): 98.67%

Metodologia de obtenção do 2-(4-clorobenzoil)hidrazidacarboxilato de fenila (LASSBio-1702) (53) (fórmula 25):



10 Em um balão foram adicionados 5 ml de clorofórmio e 0.7ml de fenilcloroformato (55) (5.3mmol; 1eq), a solução resultante foi agitada a temperatura ambiente. Vagarosamente foi adicionado uma suspensão de 1 g (5.3mmol) de 4-clorobenzohidrazida em 50 ml de clorofórmio. Após 5 horas foi observado por acompanhamento em CCF (eluente:diclorometano:metanol 10%) total consumo do

15 produto de partida. A seguir foi adicionado 5 ml hexano na reação, mantendo-a sob agitação por 10 min. O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com hexano, obtendo o produto **53** com 51% de rendimento.

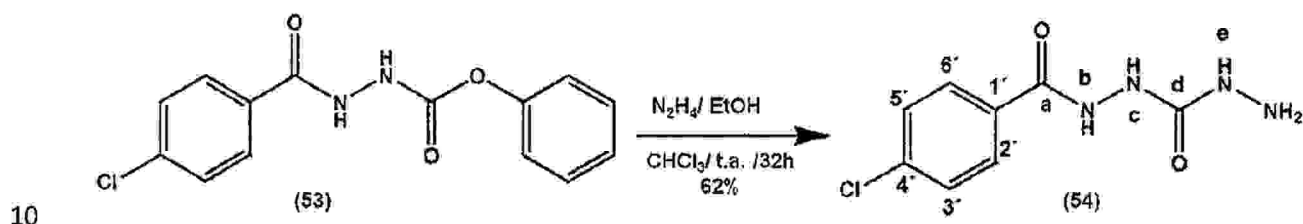
Aspecto físico: sólido branco; PF=182-185°C

- RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6): δ 10,66 (s, 1H, H_b); 9,92 (s, 1H, H_c); 7,91 (d, 2H, H_{2'} e H_{6'}, $J=10$ Hz); 7,60 (d, 2H, H_{3'} e H_{5'}, $J=10$ Hz); 7,40 (d, 2H, H₂ e H₆, $J=8$ Hz); 7,26 (d, 1H, H₄, $J=6$ Hz); 7,18 (d, 2H, H₃ e H₅, $J=8$ Hz)
- IV (KBr) cm^{-1} : 3277 (\square NH); 1730 e 1661 (\square C=O); 1010 (δ Ar-Cl)

5 • MS (m/z)= 389

Pureza (HPLC): 97,02%

Metodologia de obtenção do (LASSBio-1710) (54) (fórmula 26):

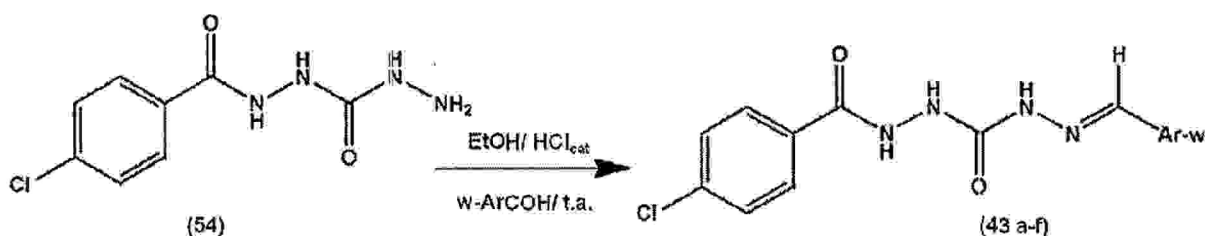


Foram adicionados em um balão 50ml 0,3g (1mmol) do intermediário **53**, 7 ml de etanol, e 1,20ml de hidrazina hidratada 80% (0,03mol; 30 eq). Após 32 horas foi constatado o fim da reação por CCF (eluente: diclorometano:metanol 5%). O volume reacional foi reduzido em rotaevaporador e após adição de gelo ocorreu a formação de precipitado, o qual foi filtrado a vácuo, sendo obtendo-se o produto em rendimento de 62%. Aspecto físico: sólido branco; PF=187-190°C

15

- RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6): δ 10,24 (sl, 1H, H_b); 8,17 (s, 1H, H_c); 7,89 (d, H_{2'} e H_{6'}, $J=8$); 7,63 (s, 1H, H_e); 7,55 (d, 2H, H_{3'} e H_{5'}, $J=8$); 4,17 (sl, 2H, NH₂)
- RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 165,7 (C_a, C=O); 160,3 (C_d, C=O); 136,9 (C_{4'}); 132,0 (C_{1'}); 129,9 (C_{2'} e C_{6'}); 128,9 (C_{3'} e C_{5'})
- IV (KBr) cm^{-1} : 3328 (\square NH); 1676 e 1597 (\square C=O); 1013 (δ Ar-Cl)
- MS (m/z): 227
- Pureza (HPLC): 97,89%

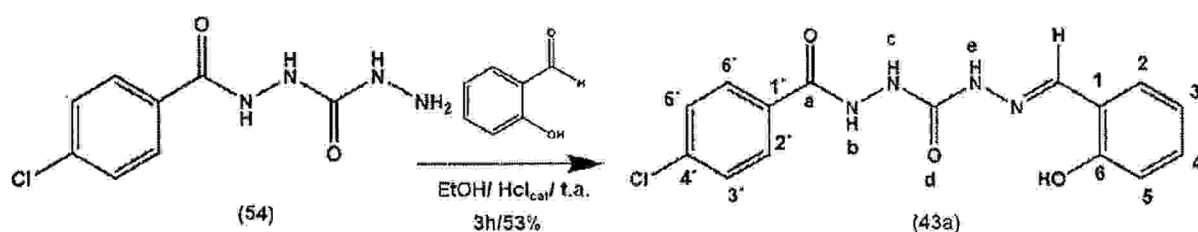
10 Metodologia de obtenção dos derivados hidrazida-*N*-acilidrazonas da série III (43 a-f) (fórmula 27):



Em um balão 50 ml contendo 0,1g do intermediário **54**, foram adicionados, sob agitação em temperatura ambiente, 10ml de etanol e 0,43mmol (1eq) de aldeído previamente selecionado, seguido de 1 gota de ácido clorídrico concentrado. A solução permaneceu sob agitação por 1-4 horas, quando CCF (diclorometano:metanol 5-10%) indicou o termino da reação. O volume do meio reacional foi reduzido a pressão reduzida (2/3 do volume), e após a adição de gelo

foi verificado a precipitação do produto, que foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada.

Metodologia de obtenção do (E)-1-(2-hidroxibenzilideno)-5-(4-clorobenzil)carbonohidrazida (LASSBio-1704); (43a) (fórmula 28):

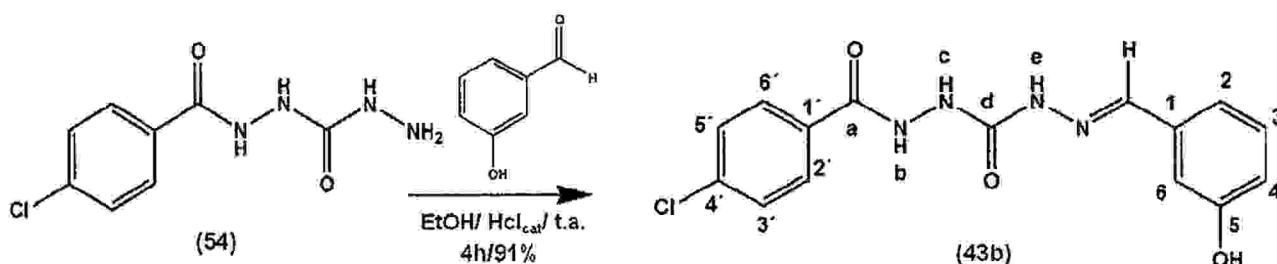


O composto **43a** foi obtido a partir da condensação da hidrazida **54** com 2-hidroxibenzaldeído com rendimento médio de 53%. Aspecto físico: sólido branco. PF= >250°C

- **RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6):** δ 10,65 (s, 1H, H_b); 10,30 (s, 1H, H_c); 10,02 (sl, 1H, OH); 8,98 (s, 1H, H_e); 8,22 (s, 1H, N=CH); 7,91 (d, 2H, H_{2'} e H_{6'}, $J=8\text{Hz}$); 7,84 (d, 1H, H₂); 7,57 (d, 2H, H_{3'} e H_{5'}, $J=8\text{Hz}$); 7,17 (t, 1H, H₄, $J=6\text{Hz}$); 6,88-6,81 (m, 2H, H₃ e H₅)
- **RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm):** 165,2 (C_d, C=O), 156,0 (C_a, C=O); 155,1 (N=CH); 136,5 (C₆); 131,5 (C_{4'}); 130,4 (C_{1'}); 129,3 (C_{2'} e C_{6'}); 128,5 (C_{3'}-C_{5'} e C₂); 127,1 (C₄); 120,2 (C₁); 119,17 (C₅); 116,0 (C₃)
- **IV (KBr) cm^{-1} :** 3309 (\square NH); 1701 e 1545 (\square C=O); 1664 e 1484 (δ N-H); 1011 (δ Ar-Cl)
- **MS (m/z):** 331

- Pureza (HPLC): 98,02%

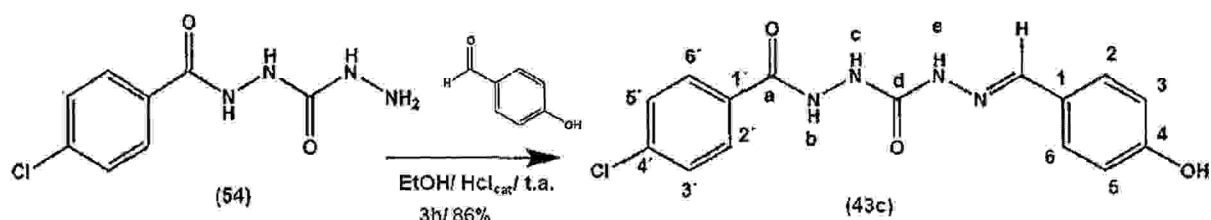
Metodologia de obtenção do (E)-1-(3-hidroxibenzilideno)-5-(4-clorobenzoil)carbonohidrazida (LASSBio-1709); (43b) (fórmula 29):



O composto **43b** foi obtido a partir da condensação da hidrazida **54** com 3-hidroxibenzaldeído em rendimento de 91%. Aspecto físico: sólido branco. PF= 225-227°C

- RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6): δ 10,62 (s, 1H, H_b); 10,28 (s, 1H, H_c); 9,47 (s, 1H, OH); 9,12 (s, 1H, H_e); 7,90 (d, 2H, H_{2'} e H_{6'}, $J=4\text{Hz}$); 7,80 (s, 1H, N=CH); 7,57 (d, 2H, H_{5'} e H_{3'}, $J=4\text{Hz}$); 7,17 (m, 3H, H₃, H₄ e H₅); 6,77 (d, 1H, H₂)
- IV (KBr) cm^{-1} : 3342 (\square NHCO); 1692 (\square C=O); 1655 (\square N-H); 1015 (\square Ar-Cl)
- MS (m/z): 331
- Pureza (HPLC): 98.93%

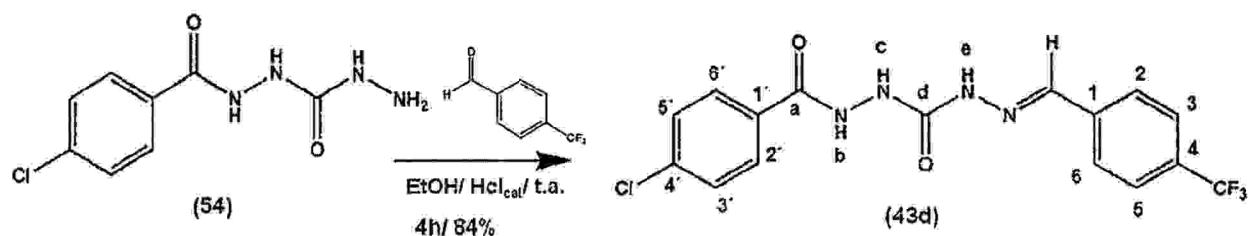
Metodologia de obtenção do (E)-1-(4-hidroxibenzilideno)-5-(4-clorobenzoil)carbonohidrazida (LASSBio-1706); (43c) (fórmula 30):



O composto **43c** foi obtido a partir da condensação da hidrazida **54** com 4-hidroxibenzaldeído obtendo rendimento de 86%. Aspecto físico: sólido branco. PF= 223-225°C

- 5 • **RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6):** δ 10,49 (s, 1H, H_b); 10,28 (s, 1H, H_c); 9,77 (s, 1H, OH); 8,92 (s, 1H, H_e); 7,90 (d, 2H, H_{2'} e H_{6'}, $J=8\text{Hz}$); 7,79 (s, 1H, N=CH); 7,59 (m, 4H, H_{3'}-H_{5'} e H₂ e H₆); 6,77 (d, 2H, H₃ e H₅)
- **RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm):** 165,2 (C_d, C=O); 158,7 (C_a, C=O); 155,3 (N=CH); 141,2 (C₄); 136,5 (C_{4'}); 131,5 (C_{2'} e C_{6'}); 129,3 (C₂ e C₆); 128,5 (C₃-C₅ e C_{1'}); 125,6 (C_{3'} e C_{5'}); 115,4 (C₁)
- 10 • **IV (KBr) cm^{-1} :** 3369 (\square NH); 1701 (\square C=O); 1651 (\square N-H); 1014 (\square Ar-Cl)
- **MS (m/z):** 331
- **Pureza (HPLC):** 99,67%

15 **Metodologia de obtenção do (*E*)-1-(4-(trifluormetil)benzilideno)-5-(4-clorobenzoil)carbonohidrazida (LASSBio-1737); (43d) (fórmula 31):**

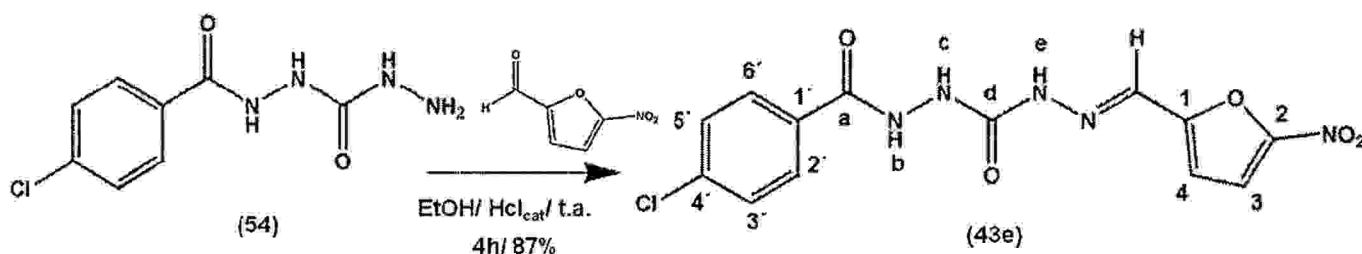


O composto **43d** foi em a partir da condensação da hidrazida **54** com 4-triflorometilbenzaldeído obtendo rendimento de 84%. Aspecto físico: sólido branco. PF= 201-204°C

- 5
- **RMN 1H (200 MHz, DMSO- d_6):** δ 10,95 (s, 1H, H_b); 10,34 (s, 1H, H_c); 9,24 (s, 1H, H_e); 8,05 (d, 2H, H₂ e H₆, $J=8$ Hz); 7,96 (d, 2H, H_{2'} e H_{6'}, $J=8$ Hz); 7,90 (s, 1H, N=CH); 7,35 (d, 2H, H₃ e H₅, $J=8$ Hz); 7,59 (d, 2H, H_{3'} e H_{5'}, $J=8$ Hz)
 - **RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm):** 165,2 (C_d, C=O); 155,0 (C_a, C=O); 139,1 (N=CH); 138,5 (C₄); 136,5 (C₃ e C₅); 131,4 (C₂ e C₆); 129,30 (C_{2'} e C_{6'}); 128,5 (C_{3'} e C_{5'}); 127,3 (C_{4'}); 125,3 (C₁); 125,3 (C_{1'}); 121,4 (CF₃)
- 10
- **IV (KBr) cm^{-1} :** : 3338 (\square NH); 1701 (\square C=O); 1663 (\square N-H); 1015 (\square Ar-Cl); 1131 e 1100 (C-F)
 - **MS (m/z):** 383
 - **Pureza (HPLC)=** 99,12%

15

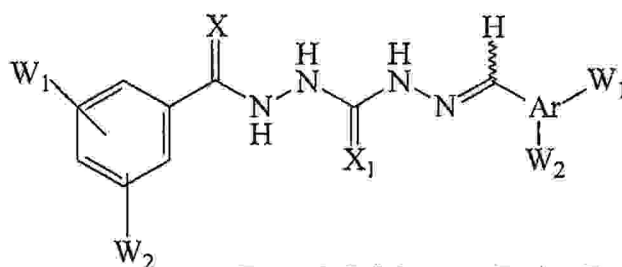
Metodologia de obtenção do (E)-1-(4-clorobenzoyl)-5-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbonohidrazida (LASSBio-1491); (43e) (fórmula 32):



O composto **43e** foi obtido a partir da condensação da hidrazida **54** com 2-nitrofuraldeído em rendimento de 87%. O composto foi recristalizado com etanol. Aspecto físico: sólido amarelo. PF= 217-220°C

- 5 • **RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6):** δ 11,24 (s, 1H, H_b), 10,39 (s, 1H, H_c); 9,12 (s, 1H, H_e); 7,91 (m, 3H, N=CH e H_{2'} e H_{6'}); 7,80 (d, 1H, H₃, $J=4$); 7,58 (d, 2H, H_{3'} e H_{5'}, $J=8$); 7,31 (d, 1H, H₄, $J=4$)
- **RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm):** 165,32 (C_d, C=O); 154,57 (C_a, C=O); 152,84 (N=CH); 152,40 (C₂); 136,69 (C_{4'}); 131,38 (C_{1'}); 129,38 (C_{2'} e C_{6'}); 129,22 (C₁); 128,62 (C_{3'} e C_{5'}); 115,16 (C₃); 112,62 (C₄)
- 10 • **IV (KBr) cm^{-1} :** 3246 (\square NH); 1659 e 1504 (\square C=O); 1596 e 1351 (δ Ar-NO₂); 1015 (δ Ar-Cl)
- **MS (m/z):** 350
- **RMN ^1H com troca por D₂O (500 MHz, DMSO- d_6):** 7,96 (m, 3H, N=CH e H_{2'} e H_{6'}); 7,81 (s, 1H, H₃); 7,66 (d, 2H, H_{3'} e H_{5'}, $J=10\text{Hz}$); 7,32 (s, 1H, H₄)
- 15 • **Pureza(HPLC):** 98.31%

Considerando que a novidade da presente invenção está conteplada nas séries III e IV, apresentamos a fórmula geral abaixo:



Formula I (isômeros *E* e/ou *Z*)

1. Sendo X = O; S; NH; X1 = O; S; NH;

5 Ar= arila ou heteroarila com substituintes W1 e/ou W2 nas posições *orto*, *e/ou* *meta* e/ou *para*; sendo W1 e W2 = grupos elétron retiradores e/ou elétron doadores, sendo preferencialmente um grupo H, F, Cl, Br, OCH3, OCH3, OC2H5, OCH(CH3)2, OC(CH3)3; OCF3; NO2; CO2H; CN; CF3; CHF2; CHF2; NH2, NHCH3, NHC2H5, NHCH(CH3)2, NH(CH3)3, N(C2H5)2, N(CH3)2, CH3; 10 etila, propila, isopropila, butila, sec-butila e ter-butila.

Resultados Farmacológicos:

Atividade tripanomicida:

Metodologia Utilizada:

15 **Culturas de T. cruzi.** Para o ensaio de atividade antiproliferativa, epimastigotas de T. cruzi (cepa Tulahuen 2) foram cultivadas a 28 ° C em meio axênico consistindo de infusão de cérebro coração (33 g / L), triptose (3 g / L), hemina (0,02 g / L), D-(+)-glicose (0,3 g / l), estreptomicina (0,2 g / l) e penicilina (200.000 U / L), suplementado com 10% de soro fetal bovino. [14] Todas as culturas e todos os testes foram realizados em condições aeróbias. Em todos os testes foi trabalhado com parasitas 20 em fase de crescimento exponencial (culturas utilizadas 5-7 dias de crescimento,

começando no dia 0 de um anel de 5 milhões de parasitas / mL). Todos os resultados são a média de pelo menos três experimentos independentes.

Medida da atividade antiproliferativa [15]. Foi preparado uma suspensão de parasitas (cepa Tulahuen 2) com uma concentração de 4 milhões de células / mL e inoculado 0,6 mL / poço em 24 poços da placa. Realizou-se também diluições do composto em estudo em DMSO a partir de uma solução estoque 200 mM preparada na hora e imediatamente adicionado a cada poço (5 uL / poço). Os parasitas foram incubados com os compostos a 28 ° C durante 5 dias. O crescimento dos parasitas é monitorada medindo-se o aumento da absorvância a 610 nm, que é proporcional ao número de células [1]. A inibição percentual é calculado como: $\% = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} \times 100$, onde p é A₆₁₀ da cultura contendo o composto no dia 5; A_{0p} é A₆₁₀ da cultura contendo o composta imediatamente após a adição do composto (dia 0), A_c é A₆₁₀ da cultura na ausência de composto (controle negativo) no dia 5; A_{0c} é A₆₁₀, na ausência do composto no dia 0. O IC₅₀ corresponde à concentração de composto capaz de causar uma inibição de 50% de crescimento. Isso é determinado pela plotagem% de inibição de crescimento em comparação Log (concentração), ajustando os pontos de uma curva sigmoidal de Boltzmann. Cada experimento foi repetido três vezes interdias e IC₅₀ é calculado como o empregado com o σn-1.

- Foi realizado teste de atividade tripanomicida dos novos derivados das **séries III e IV**, onde todos compostos foram testados *in vitro* contra as formas epimastigotas de cepas Tulahuen 2 de *T.cruzi*. Sua capacidade de inibir o crescimento do parasita foi avaliada em 25µM, em comparação com o padrão da droga nifurtimox, onde foi

calculada a porcentagem de inibição do crescimento e posterior determinação da potência tripanomicida, obtendo os seguintes resultados:

Série III		Série IV	
Compostos	IC ₅₀	Compostos	IC ₅₀
LASSBio-1493	>>>25	LASSBio-1710	>>>25
LASSBio-1705	>>>25	LASSBio-1704	>>25
LASSBio-1708	>>25	LASSBio-1709	>>>25
LASSBio-1707	>>>25	LASSBio-1706	>>25
LASSBio-1736	-	LASSBio-1737	-

A avaliação dos compostos das séries III e IV, conforme tabela 8A acima, mostrou atividade tripanomicida para os compostos testados em concentrações superior a 25 μ M. LASSBio-1703 e LASSBio-1491, foram selecionados para determinação da potência tripanomicida apresentando valores de CI₅₀ de 56,7 e 62, 3 μ M, respectivamente.

10 Estudo da atividade leishmanicida

A citotoxicidade é um dos parâmetros biológicos mais comumente avaliado após a manipulação experimental, visto que pode ser facilmente medido, além de seguir ao paradigma dose-dependência de Paracelso (Cho *et al.*, 2008) e predizer o grau de toxicidade para a célula indicando a real possibilidade de uso. No presente trabalho, foi investigado a citotoxicidade das séries de derivados hidrazida-*N*-acilidrazônicos sobre as células de mamíferos pelo método de dosagem de lactato desidrogenase em culturas de macrófagos da linhagem J774 e sobre as formas promastigotas e

amastigota de *Leishmania* sp, tratadas com as substâncias testes por um período de 48 horas.

Metodologia Utilizada:

Determinação da viabilidade celular: Macrófagos da linhagem J774 foram cultivados em triplicatas em placas de 48 poços, na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/poço e incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO₂ por 4 horas, para adesão dos macrófagos ao plástico. Em seguida, os poços foram lavados para remoção das células não aderentes e foram acrescentadas as diferentes concentrações das substâncias a serem testadas. Os poços controles foram células cultivadas somente com meio de cultura e 2 mM de L-glutamina (Roche) ou células cultivadas na presença do diluente das substâncias (DMSO, Sigma). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT (Hussain *et al.*, 1993).

Manutenção de macrófagos: Macrófagos da linhagem J774 foram mantidos em garrafas de cultura em 5 ml de meio DMEM com soro. No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB na concentração de 3×10^5 células/mL e 500 µL dessa suspensão foi distribuída em placa de 48 poços (Nunc, Denmark) para realização de ensaios do MTT (Hussain *et al.*, 1993). Macrófagos foram obtidos também de lavado peritoneal de camundongos Balb/c estimulados com tioglicolato 3%. Macrófagos peritoneais foram plaqueados na proporção de 3×10^5 células /poço de placa de 24 poços com lamínulas. Os macrófagos peritoneais foram infectados com formas promastigotas na fase estacionária de crescimento, numa proporção de 10 parasitos: 1 macrófago. A placa foi incubada por 12 horas em estufa de a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO₂. Após 12 horas de infecção, os macrófagos foram “lavados” com solução

salina com fosfatos (PBS, pH 7,2), para remoção dos parasitos não interiorizados. Os macrófagos foram cultivados com RPMI suplementado com 2 mM de L-glutamina, na presença ou não de diferentes concentrações do(s) composto(s) e foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO₂ por 1 dia.

- 5 O "screening" das substâncias com atividade leishmanicida foi feito por método de cultura direta sobre o parasita, inicialmente em promastigota, pois a avaliação em amastigota é mais demorada e trabalhosa. Os derivados foram avaliados nas concentrações de 100 µM (A) e 10 µM (B) sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. major* (10⁶ células/poços), conforme demonstrado na figura 3.
- 10 A partir dos dados obtidos, a substância LASSBio-1491 foi selecionada como representativa das séries (Figura 3) para a realização dos demais experimentos sobre formas amastigotas e efeito leishmanicida *in vivo*.

Tabela 11. Efeito dos derivados hidrazida-*N*-acilidrazona da série III sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774 no ensaio de MTT e sobre formas promastigotas de *L. major*.

Substância	Macrófagos		Promastigotas de <i>L. major</i>		
	CL50 e IC95% (µM) ^a	Citotoxicidade Máxima (% ± erro padrão) ^b	CL50 e IC95% ^a	Citotoxicidade Máxima (% ± erro padrão) ^b	Índice de Seletividade
Miltefosina	> 100	NT	3,1 (2,3 – 3,8 µM)	88,1 ± 0,1**	32
Pentamidina	> 100	NT	0,8 (0,3 – 1,3 µM)	72,6 ± 2,0**	125
Nifurtimox	> 100	NT	0,9 (0,7 – 1,1 µM)	94,1 ± 0,6**	111
Nitrofurazona	74,1 (62,3 – 85,9)	77,8 ± 1,9**	>100	NA	-
LASSBio 1064	> 100	NT	>100	NA	-
LASSBio 1483	> 100	NT	9,4 (8,3 – 10,5 µM)	66,0 ± 0,1**	10
LASSBio 1490	> 100	NT	6,9 (5,7 – 8,7 µM)	67,0 ± 0,1**	15
LASSBio 1689	> 100	NT	9,7 (0 – 38,9 µM)	80,8 ± 2,3**	10
LASSBio 1493	> 100	NT	0,2 (0 – 0,6 nM)	75,7 ± 5,8**	500
LASSBio 1703	> 100	NT	8,7 (0 – 23,9 µM)	53,0 ± 3,1**	11
LASSBio 1705	78,1 (59,6 – 96,6)	70,2 ± 2,6**	0,5 (0,1 – 0,9 nM)	75,7 ± 5,0**	156
LASSBio 1707	> 100	NT	3,9 (0 – 18,5 µM)	70,0 ± 1,2**	25
LASSBio 1708	> 100	42,9 ± 15,5*	0,3 (0 – 1,4 µM)	62,6 ± 1,6**	333
LASSBio 1736	> 100	48,1 ± 0,3*	0,4 (0 – 1,5 µM)	77,5 ± 4,2**	250

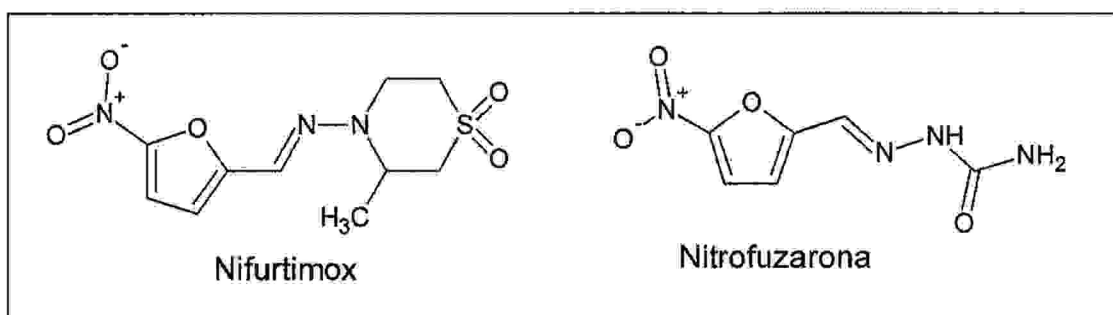
A avaliação da atividade leishmanicida na forma promastigota do *L. major* dos compostos da série III, indicou que LASSBio-1493, LASSBio-1703, LASSBio-1705, LASSBio-1707, LASSBio-1708, LASSBio-1736, tiveram um alto índice de seletividade para as células parasitárias, com destaque para a atividade de LASSBio-1493 e LASSBio-1705, que foram ativos na ordem de nM (nanomolar).

Tabela 12. Efeito dos derivados hidrazida-*N*-acilidrazona da série IV sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774 no ensaio de MTT e sobre formas promastigotas de *L. major*.

Substância	Macrófagos		Promastigotas de <i>L. major</i>		
	CL50 e IC95% (µM) ^a	Citotoxicidade Máxima (% ± erro padrão) ^b	CL50 e IC95% ^a	Citotóxicidade Máxima (% ± erro padrão) ^b	Índice de Seletividade
Miltefosina	> 100	NT	3,1 (2,3 – 3,8 µM)	88,1 ± 0,1**	32
Pentamidina	> 100	NT	0,8 (0,3 – 1,3 µM)	72,6 ± 2,0**	125
Nifurtímox	> 100	NT	0,9 (0,7 – 1,1 µM)	94,1 ± 0,6**	111
Nitrofurazona	74,1 (62,3 – 85,9)	77,8 ± 1,9**	>100	NA	
LASSBio 1064	> 100	NT	>100	NA	
LASSBio 1493	100	NT	7,5 (6,2 – 8,7 µM)	68,4 ± 0,1**	10
LASSBio 1702	> 100	NT	13,2 (10 – 50,1 µM)	78,9 ± 2,7**	8
LASSBio 1704	> 100	48,2 ± 9,1*	>100 µM	46,3 ± 8,2**	1
LASSBio 1706	86,2 (43,6 – 123,0)	54,3 ± 6,3*	0,6 (0 – 3,22 µM)	54,5 ± 10,0**	149
LASSBio 1708	85,2 (75,3 – 95,2)	59,3 ± 0,9*	0,8 (0,3 – 12 µM)	63,8 ± 1,8*	106
LASSBio 1710	100	NT	33,7 (0 – 113,4 µM)	72,5 ± 5,1**	13
LASSBio 1737	> 100	NT	>100 µM	NA	1

Analisando os resultados encontrados para os compostos da série IV, podemos destacar a atividade leishmanicida de LASSBio-1491, LASSBio-1706 e LASSBio-1709, que possuíram eficácia similar aos padrões Miltefosina e Pentamidina.

De acordo com os resultados obtidos, os novos derivados hidrazida_N--
 5 acilidrazônicos apresentaram pronunciada atividade anti-promastigota contra *L. major*, destacando-se os derivados LASSBio-1489, LASSBio-1490, LASSBio-1699, LASSBio-1493, LASSBio-1705, LASSBio-1706, LASSBio-1707, LASSBio-1708, LASSBio-1709, LASSBio-1736, que apresentaram eficácia anti-leishmania similar ao fármaco miltefosina, com destaque aos compostos LASSBio-1493 e LASSBio-1705
 10 elevada potência leishmanicida na ordem de nM.



15 Nitrocompostos podem exercer a sua ação leishmanicida por uma via de redução do grupo nitro e à subsequente interação dos produtos formados com biomoléculas essenciais do parasito, gerando desta forma dano causado por estresse oxidativo. A formação dos radicais livres provenientes do processo de biorredução do grupo nitro pode resultar em peroxidação de membranas biológicas e proteínas, inibição de
 20 enzimas e danos ao DNA (Paula *et al.*, 2009; Rando *et al.*, 2010).

Observou-se que a nitrofuzarona apresenta toxicidade para macrófagos da linhagem J774 (**Tabela 10**) com CL₅₀ de 74,1 (62,3 – 85,9) µM e efeito tóxico máximo de 77,8 ± 1,9%, e não possui atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L.*

major até a concentração de 100 μM , fato que evidencia a importância da porção clorofenila e da subunidade aril-hidrazida de LASSBio-1491 para atividade anti-promastigota contra *L. major*. Além disso, o derivado LASSBio-1491 não possui a mesma ação deletéria que a nitrofuzarona para célula hospedeira (**Tabela 12**).

5 O nifurtimox é um 5-nitrofurano que tem sido uma das alternativas farmacológicas para o tratamento da doença de Chagas e outras tripanosmias. No entanto, o mecanismo de ação deste fármaco está parcialmente desvendado e envolve a indução de estresse oxidativo (Wilkinson, 2011) devido à formação de radicais nitroanion por nitroredutases, que na presença de oxigênio, gera intermediários
10 ativos tóxicos para o *Trypanosoma cruzi*. A atividade leishmanicida do nifurtimox é conhecida desde a década de 70 (Mattock & Peters, 1975). Como esperado, neste trabalho observou-se a elevada potência e eficácia contra formas promastigotas de contra *L. major* deste fármaco, com CI_{50} de 0,9 (0,1 – 1,1) μM e efeito máximo de $94,1 \pm 0,6\%$.

15 Após seleção de LASSBio-1491 como representaivo das séries de novos derivados hidrazida N-acilidrazona foi avaliada seu efeito leishmanicida frente a outras espécies de leishmania. Para este fim, determinou-se sua concentração inibitória 50% (CI_{50}) (**Tabela 12**), no ensaio de viabilidade sobre formas promastigostas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* em várias concentrações (100, 50, 25, 10,
20 1, 0,1, 0,01, 0,001 e 0,0001 μM).

Para a realização dos experimentos de avaliação da atividade anti-promastigota das substâncias, utilizou-se como fármacos de referência a miltefosina e pentamidina para os ensaios com *L. major* e a pentamidina para as espécies de *L. amazonenses*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*. A miltefosina, uma análogo da lecitina, foi o primeiro

fármaco a ser ativo por via oral para duas formas clínicas de leishmaniose (cutânea e visceral) e seu mecanismo de ação parece envolver a inibição da biossíntese de fosfatidilcolina no parasito e as reações adversas mais comuns associadas a intervenção terapêutica inclui severa toxicidade gastrointestinal e aumento nos níveis de aspartato aminotransferase, alanino aminotransferase e creatinina (Berman, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2007). Pentamidina tem sido usada como a segunda linha de tratamento para as leishmanioses desde os anos 40. O mecanismo de ação antileishmania da pentamidina, possivelmente inclui inibição da biossíntese de poliaminas, ligação ao DNA, efeitos no potencial de membrana interno mitocondrial, no entanto ainda não foi claramente definido (Bray *et al.*, 2003). A alta toxicidade deste fármaco é um fator limitante de seu emprego terapêutico. Dentre seus principais efeitos adversos e colaterais, estão a hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (Rath *et al.*, 2003).

Tabela 13. Determinação da potência e eficácia de derivados contra formas promastigotas de *L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*.

Substâncias	CI ₅₀ do crescimento e IC 95% (μM) ^a				Efeito Máximo ± erro padrão(% e concentração) ^b			
	<i>Lm</i>	<i>La</i>	<i>Lb</i>	<i>Lc</i>	<i>Lm</i>	<i>La</i>	<i>Lb</i>	<i>Lc</i>
Miltefosina	3,1 (2,3 – 3,8 μM)	-	-	-	88,1 ± 0,1**	-	-	-
Pentamidina	0,8 (0,3 – 1,3 μM)	95,7 (84,4 – 106,9 nM)	25,5 (20,3 – 30,7 μM)	11,9 (8,8 – 15,0 μM)	72,6 ± 2,0**	94,9 ± 0,2**	68,8 ± 0,1**	74,6 ± 0,2**
LASSBio 1491	7,5 (6,2 – 8,7 μM)	8,1 (73,5 – 88,4 nM)	31,4 (17,2 – 45,6 μM)	19,9 (19,4 – 20,4 μM)	68,4 ± 0,1**	80,0 ± 1,4**	78,0 ± 0,2**	75,7 ± 0,4**
LASSBio 1492	3,7 (3,4 – 4,0 μM)	0,8 (0,6 – 0,9 μM)	25,1 (24,3 – 25,9 μM)	> 100 μM	67,5 ± 0,1**	94,6 ± 0,4**	58,9 ± 1,9**	NA

^a Concentração Inibitória de 50% calculada através de curvas concentração-resposta e o intervalo de confiança de 95%; ^b média do efeito ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01.

0,01 em relação ao grupo DMSO 0,1%; NA: substância não apresenta atividade leishmanicida significativa até a concentração de 100 µM em relação ao grupo DMSO 0,1%.

Lm (*L. major*), La, (*L. amazonensis*), Lb(*L. braziliensis*); Lc (*L. chagasi*)

5 Os resultados obtidos sugerem que a substância apresentam um padrão de atividade leishmanicida concentração independente. Tal atividade pode ser devido a perda de seletividade e conseqüente interação com sistemas do parasito que atenuem a atividade leishmanicida destes compostos. Além disso, LASSBio-1491 apresentou maior potência leishmanicida para as formas promastigotas das
10 espécies de *L. major*, *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Para *L. amazonensis* LASSBio-1491 apresentou maior potência leishmanicida que o fármaco pentamidina.

Sabe-se que diferenças de sensibilidade de compostos a várias espécies de *Leishmania* têm sido relatadas na literatura. Escobar e colaboradores (2002), por exemplo, demonstraram diferenças de sensibilidade analisando miltefosina, edelfosina e anfotericina B em diferentes espécies desse parasito. Os autores
15 verificaram que as formas promastigotas e amastigotas de *L. panamensis*, *L. mexicana* e *L. major* possuem menor sensibilidade à miltefosina e edelfosina do que *L. tropica*, *L. aetiopica*, *L. panamensis* e *L. donovani*. Machado e colaboradores (2007) observaram valores de IC₅₀ de pentamidina contra formas promastigotas de
20 *L. amazonensis* (strain MHOM/BR/77/LTB0016), *L. braziliensis* (MCAN/BR/98/R619), *L. chagasi* (MCAN/BR/97/P142) e *L. major* (amostra de cachorro) de $4,7 \pm 1,6$, $13,4 \pm 1,4$, $34,2 \pm 2,5$ e $11,5 \pm 0,1$ µg/ml (determinação em câmara de Neubauer). Neste estudo, verificamos que a pentamidina mostrou a seguinte ordem decrescente de atividade contra formas promastigotas do parasito: *L. amazonensis* > *L. major* > *L.*
25 *chagasi* e *L. braziliensis*. A discordância entre os resultados encontrados neste estudo e os dados observados por Machado e colaboradores (2007) com relação a

resposta leishmanicida da pentamidina contra *L. major*, *L. amazonenses*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* se deve ao uso de cepas diferentes e por diferenças metodológicas no ensaio de avaliação da viabilidade de formas promastigotas.

Evidenciou-se que LASSBio-1491 possui atividade anti-promastigota contra todas as espécies (*L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*): com efeito máximo de $68,4 \pm 0,1$, $80,0 \pm 1,4$, $78,0 \pm 0,2$, $75,7 \pm 0,4$ e potência de CI_{50} **7,5 (6,2 – 8,7 μ M)**, 8,1 (73,5 – 88,4 nM), 31,4 (17,2 – 45,6 μ M), 19,9 (19,4 – 20,4 μ M), respectivamente.

Uma vez, tendo sido ativa contra as formas promastigotas de pelo menos três das quatro espécies de *Leishmania* (*L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*), a substância LASSBio-1491 foi selecionada para avaliação da atividade leishmanicida em várias concentrações (100, 50, 25, 10, 1 e 0,1 μ M) em modelo de infecção em lamínula para mensurar a possível inibição sobre a forma intracelular do parasito (amastigota) de *L. major*, visto que essa são as formas presentes no hospedeiro vertebrado. A **Tabela 14** expõe a CI_{50} bem como a eficácia máxima da substância-teste em estudo contra formas amastigotas de *L. major* e para diminuição do número de macrófagos infectados.

Tabela 14. Determinação da potência e eficácia máxima do derivado LASSBio-1491 e do padrão pentamidina no ensaio de viabilidade de formas amastigotas de *L. major*.

Substâncias	CI_{50} e IC 95% (μ M) ^a		Efeito Máximo (% \pm erro padrão) ^b	
	Amastigotas de <i>L. major</i>	Macrófagos infectados	Amastigotas de <i>L. major</i>	Macrófagos infectados
Pentamidina	11,8 (0 – 56,3)	>100	63,2 \pm 12,9*	42,5 \pm 4,5*

LASSBio 1491	7,9 (0 – 18,7)	27,4 (0 – 59,7)	60,8 ± 1,9*	53,5 ± 2,5*
LASSBio 1492	>100	>100	NA	NA

^a Concentração Inibitória de 50% calculada através de curvas concentração-resposta e o intervalo de confiança de 95%; ^b média do efeito ± erro padrão da média na respectiva concentração na qual se observou a resposta máxima em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01 em relação ao grupo DMSO 0,1%; NA: substância não apresenta atividade leishmanicida significativa até a concentração de 100 µM em relação ao grupo DMSO.

No ensaio para avaliar a taxa de infecção dos macrófagos, a substância LASSBio-1491 apresentou-se muito eficiente em reduzir a infecção de macrófagos, bem como número de amastigotas por macrófago com IC₅₀ (IC95%) de 27,4 (0 – 59,7) µM e efeito máximo de 53,5 ± 2,5%. Além disso, essa substância-teste apresentou eficácia contra amastigotas de *L. major* (porcentagem de inibição do crescimento de amastigota de 60,8 ± 1,9%) similar a da pentamidina (63,1 ± 12,9%).

A substância LASSBio-1491, é uma hidrazida-N-acilidrazona nitrada (presença do substituinte 4-nitrofurano na função imina). Por ser um nitrocomposto, é importante considerar que essa substância também pode exercer a sua ação por uma via de redução do grupo nitro (em meio aeróbico ou anaeróbico) e à subsequente interação dos produtos formados, a partir desta reação, com biomoléculas essenciais de bactérias, fungos e parasitos. Assim, devido ao aumento da concentração intracelular de nitrocompostos, maior quantidade de radicais livres é gerada e, conseqüentemente, maior é o dano causado pelo estresse oxidativo. A formação dos radicais livres provenientes do processo de biorredução do grupo nitro pode resultar em peroxidação de membranas biológicas e proteínas, inibição de enzimas e danos ao DNA (Paula *et al.*, 2009; Rando *et al.*, 2010), não descartando-se a possibilidade de eventos estarem correlacionados ao mecanismo de ação de LASSBio-1491.

Para verificar a real aplicação terapêutica das séries de derivados hidrazida-N-acilidrazonas foi selecionado LASSBio-1491, como representativo das séries estudadas, para determinar seu efeito leishmanicida *in vivo*. Para tanto, este composto foi estudado em modelo murino de leishmaniose, utilizando como
5 fármaco-padrão o antimoníato de meglumina (Glucantime®; 30 $\mu\text{mol/kg/dia}$, i.p.), visto que o mesmo é conhecidamente ativo neste modelo e é um fármaco de primeira escolha para o tratamento clínico da leishmaniose (Pereira *et al.*, 2010). Apesar do extenso uso do antimoníato de meglumina com continente americano seu mecanismo de ação, da mesma forma que de outros antimonias pentavalentes,
10 como o estibogluconato de sódio, ainda permanece obscuro. Tem sido sugerido que os antimonias pentavalentes são pró-fármacos que são ativados a sua forma trivalente através de redução intracelular (Baiocco *et al.*, 2009).

A **Figura 4** mostra o resultado do tratamento na progressão da lesão na orelha infectada com 10^5 promastigotas de *L. major* de camundongos Balb/c tratados com
15 PBS, antimoníato de meglumina (30 $\mu\text{mol/kg/dia}$, i.p.), LASSBio-1491 e o intermediário de síntese: LASSBio-1492 (10 $\mu\text{mol/kg/dia}$, i.p.).

Como pode ser observado na figura 4, a evolução das lesões do grupo submetido apenas ao tratamento com LASSBio 1492 se mantém igual às do grupo controle durante todo o experimento. Camundongos tratados com o antimoníato de
20 meglumina (30 $\mu\text{mol/kg/dia}$, i.p.) ou com LASSBio-1491 (10 $\mu\text{mol/kg/dia}$, i.p.) apresentaram uma redução no tamanho da lesão na terceira semana após o início do tratamento (quarta semana de infecção, respectivamente).

Após 35 dias de tratamento os animais foram sacrificados e a carga parasitária foi determinada nas orelhas infectadas e nos linfonodos drenantes dos animais tratados

com PBS, antimoniato de meglumina (30 $\mu\text{mol/kg/dia}$, i.p.) LASSBio-1491 e LASSBio-1492 (ambos 10 $\mu\text{mol/kg/dia}$, i.p.) (**Figura 5A e 5B**).

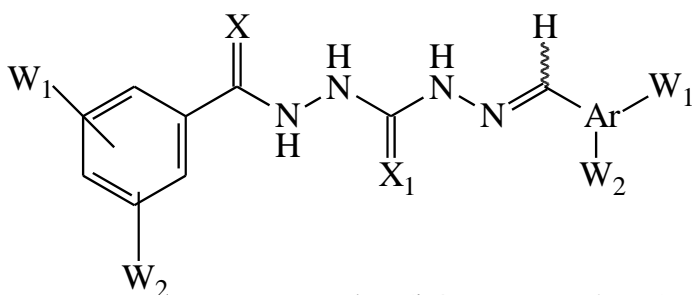
Com relação à carga parasitária, observou-se que o antimoniato de meglumina e a substância LASSBio-1491 foram capazes de diminuir o número de parasitos na orelha, e que todos os tratamentos (antimoniato de meglumina, LASSBio-1491 e LASSBio-1492) foram capazes de reduzir a carga parasitária no linfonodo drenante.

Os resultados obtidos no modelo de infecção *in vivo* mostram ainda que a despeito de LASSBio-1492 não ter apresentado diminuição da espessura da lesão (resultado da resposta pró-inflamatória), além de não ter sido evidenciada atividade anti-amastigota em modelo de infecção de macrófagos em lamínula com *L. major* (**Tabela 14**), ainda assim apresenta expressiva redução da carga parasitária no linfonodo drenante.

Em conjunto estes resultados, permitiram destacar a substâncias LASSBio-1491 como um promissor protótipo a fármaco leishmanicida, pois apresentou atividade anti-promastigota direta contra quatro espécies de *Leishmania* (*L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*) e anti-amastigota contra *L. major*, também foi capaz de diminuir o número de macrófagos infectados *in vitro* e aumentar a produção de óxido nítrico por esses macrófagos, além de apresentar pronunciada atividade leishmanicida *in vivo* contra *L. major*.

REIVINDICAÇÕES

1. Compostos Hidrazida-N-Acilidrazonas **caracterizados pela** substância LASSBio-1491 ser uma hidrazida-N-acilidrazona com a presença do substituinte 4-nitrofurano na função imina e pelo composto LASSBio-1492 ser 2-(2,4-diclorobenzoil)hidrazidacarboxilato de fenila, conforme representado na estrutura molecular:



Formula I (isômeros *E* e/ou *Z*)

, sendo X = O; S; NH; X1 = O;

S: NH; Ar= arila ou heteroarila com substituintes W1 e/ou W2 nas posições orto, e/ou meta e/ou para; sendo W1 e W2 = grupos elétron retiradores e/ou elétron doadores, sendo preferencialmente um grupo H, F, Cl, Br, OCH3, OCH3, OC2H5, OCH(CH3)2, OC(CH3)3; OCF3; NO2; CO2H; CN; CF3; CHF2; CHF2; NH2, NHCH3, NHC2H5, NHCH(CH3)2, NH(CH3)3, N(C2H5)2, N(CH3)2, CH3; etila, propila, isopropila, butila, sec-butila e ter-butila.

2. Processo de obtenção de compostos Hidrazida-N-Acilidrazonas, **caracterizado pela** metodologia de obtenção da 2,4-diclorobenzohidrazida (48), de acordo com a fórmula molecular representada abaixo incluir as seguintes etapas e parâmetros, ampliados ou reduzidos na mesma proporção:

- a) 2,5g (12mmol) de 2,4-diclorobenzoato de metila (47);
- b) 25ml de etanol;
- c) 7.3 ml (0.146mols; 12eq) de N₂H₄ 64%;
- d) agitação em temperatura ambiente por 6 horas, ou até a indicação do término da reação acompanhado por CCF (eluente: diclorometano:metanol 10%);
- e) redução do volume a vácuo;
- f) meio de precipitação;

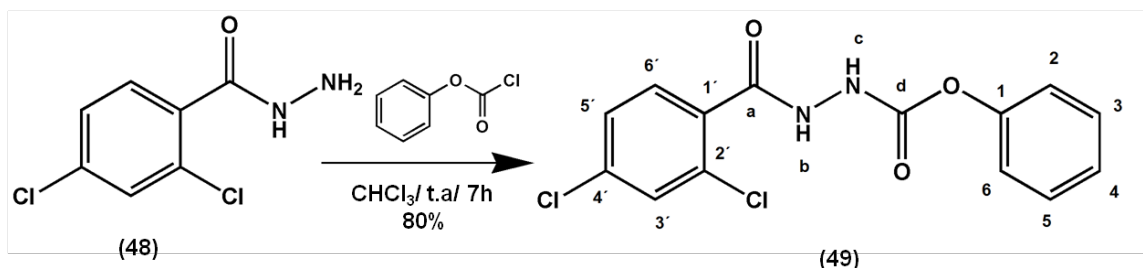
g) filtração a vácuo;

h) lavagem;

i) o processo gera um produto sólido, com rendimento: 63%; PF=

- RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6): δ 9,62 (s, 1H, H_b); 7,62 (d, 1H, H_{6'}, $J=2\text{Hz}$); 7,46 (d, 1H, H_{5'}, $J=2\text{Hz}$); 7,43 (s, 1H, H_{3'}); 4,52 (s, 2H, NH₂);
- RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ 164,73 (C=O); 134,61 (C_{2'}); 134,45 (C_{4'}); 131,57 (C_{6'}); 130,48 (C_{1'}); 129,13 (C_{3'}); 127,23 (C_{5'});
- IV (KBr) cm^{-1} : 3309 (ν NH); 1663 (ν C=O); 1616 (δ N-H);
- Pureza (HPLC): 98.67%.

3. Processo de obtenção de compostos Hidrazida-N-Acildrazonas, **caracterizado pela** metodologia de obtenção do 2-(2,4-diclorobenzoil)hidrazidacarboxilato de fenila (LASSBio-1492) (49) de acordo com a fórmula molecular representada abaixo incluir as seguintes etapas e parâmetros, ampliados ou reduzidos na mesma proporção:



a) 20 ml de clorofórmio;

b) 4,9ml de fenilcloroformato (6mmol; 1.2eq);

c) agitação e adição vagarosa de, suspensão de 1 g (5mmols) de 2,4-diclorobenzohidrazida em 50 ml de clorofórmio;

d) agitação por 7 horas com total consumo do produto de partida, acompanhada por CCF (eluente:diclorometano:metanol 5%);

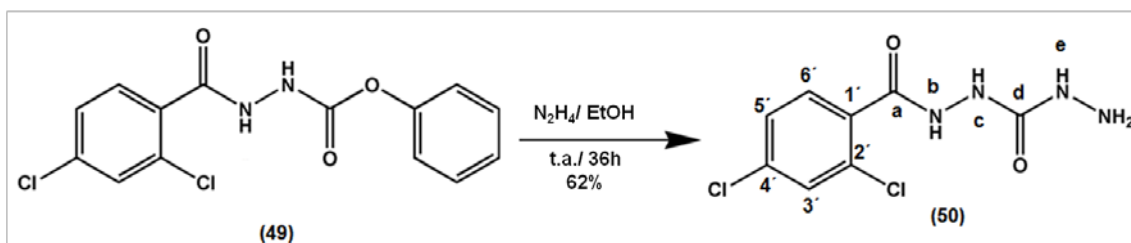
e) adição de 10 ml hexano na reação, mantendo-a sob agitação;

f) filtração a vácuo e lavagem com hexano obtendo-se o produto 49 com aspecto físico sólido PF=180-184°C e Rendimento: 80%:

- RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6): δ 10,49 (s, 1H, H_b); 10,05 (s, 1H, H_c), 7,74 (d, 1H, H_{6'}, $J=2\text{Hz}$); 7,58-7,14 (m, 5H, H_{3'}, H_{5'}, H₂, H₄ e H₆); 6,89 (d, 2H, H₃ e H₅, $J=6\text{ Hz}$);

- RMN ^{13}C (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (ppm): 163,12 (Cd, C=O), 154,24 (Ca, C=O); 150,61 ($\text{C}2'$); 135,42 ($\text{C}4'$), 133,15 ($\text{C}6'$); 131,71 ($\text{C}1'$); 130,54 ($\text{C}1$); 129,51 ($\text{C}2$ e $\text{C}6$); 129,45 ($\text{C}3$ e $\text{C}5$); 127,48 ($\text{C}3'$); 125,44 ($\text{C}5'$); 121,50 ($\text{C}4$);
- IV (KBr) cm^{-1} : 3247 (ν NH); 1741 e 1661 (ν C=O); 1033 (ν Ar-Cl);
- Pureza (HPLC): 98.45%.

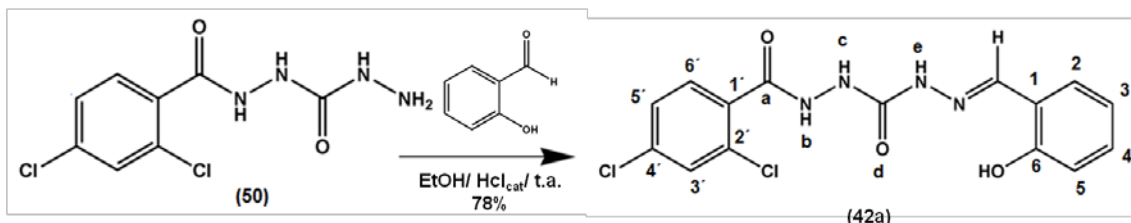
4. Processo de obtenção de compostos Hidrazida-N-Acilidrazonas, **caracterizado pela** metodologia de obtenção do LASSBio-1493, (50), representada de acordo com a fórmula molecular abaixo incluir as seguintes etapas e parâmetros, ampliados ou reduzidos na mesma proporção:



- 0,3g do intermediário 49, 7 ml de etanol, (até total solubilização);
 - 0.6ml de hidrazina hidratada 80% (18mmols;20 eq);
 - após o fim da reação por CCF (eluente: diclorometano:metanol 5%);
 - redução do volume reacional em rotaevaporados;
 - formação de precipitado, que foi filtrada a vácuo sendo obtido o produto com rendimento de 62%; Aspecto físico sólido e PF=190-194°C;
- RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 10,17 (sl, 1H, H_b); 8,24 (s, 1H, H_c); 7,70 (d, 1H, H_{6'}); 7,60-7,50 (m, 3H, H_{3'}, H_{5'} e H_e); 4,15 (s, 2H, NH₂);
 - RMN ^{13}C (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (ppm): 165,08 (Ca, C=O); 159,38 (Cd, C=O); 135,05 ($\text{C}2'$); 133,57 ($\text{C}4'$); 131,75 ($\text{C}6'$); 130,89 ($\text{C}1'$); 128,38 ($\text{C}3'$); 127,21 ($\text{C}5'$);
 - IV (KBr) cm^{-1} : 3297 (ν NH); 1698 (ν C=O); 1651 (δ N-H); 1041 (ν C-Cl);
 - Pureza (HPLC): 97,56%.

5. Processo de obtenção de compostos Hidrazida-N-Acilidrazonas, **caracterizado pela** metodologia de obtenção do (E)-1-(2-hidroxibenzilideno)-5-(2,4-diclorobenzoyl)carbonohidrazida (LASSBio-1705) (42a), de acordo com a

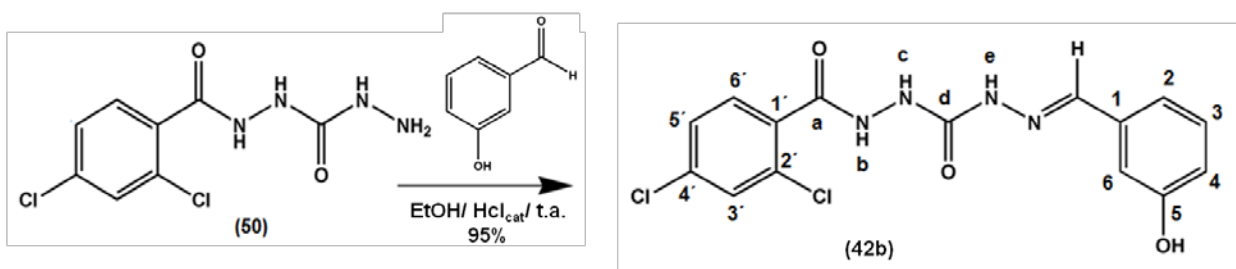
fórmula molecular abaixo, incluir as seguintes etapas e parâmetros, ampliados ou reduzidos na mesma proporção:



a) obtenção do composto 42a a partir da condensação da hidrazida 50 com 2-hidroxibenzaldeído com rendimento de 78% com aspecto físico sólido e PF= 210-213°C;

- RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) □□(ppm): □ 10,66 (s, 1H_b); 10,16 (s, 1H_c); 10,03 (s, 1H, OH); 9,11 (s, 1H, He); 8,23 (s, 1H, N=CH); 7,92 (d, 1H, H6', $J=8$); 7,73 (s, 1H, H3'); 7,60 (m, 2H, H2 e H5'); 7,20 (t, 1H, H4, $J=6$); 6,90-6,80 (m, 2H, H3 e H5);
- RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6)□□□(ppm): 165,3 (Cd, C=O); 155,9 (Ca, C=O); 154,8 (N=CH); 139,1 (C6); 135,1 (C2'); 133,5 (C4'); 131,7 (C6'); 130,8 (C2); 130,5 (C1'); 129,4 (C4)127,3 (C3'); 127,1 (C5'); 120,3 (C1); 119,1 (C5); 116,0 (C3);
- IV (KBr) cm^{-1} : 3436-1852 (ν OH); 3232 (ν NH); 1708 (ν C=O); 1655 (δ N-H); 1046 (ν C-Cl);
- MS (m/z): 365;
- Pureza (HPLC): 99.83%.

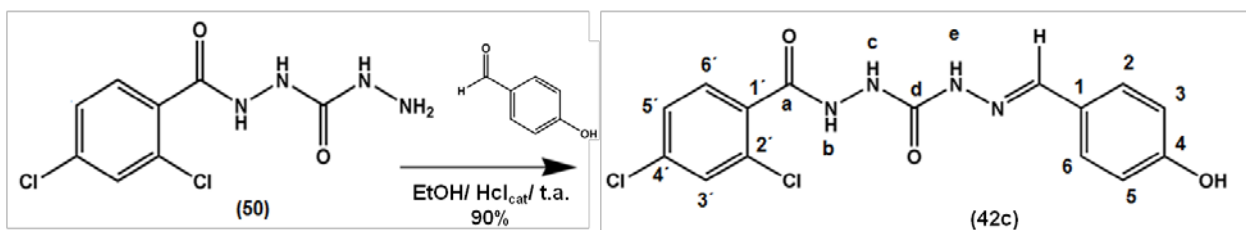
6. Processo de obtenção de compostos Hidrazida-N-Acilidrazonas, **caracterizado pela** metodologia de obtenção do (*E*)-1-(3-hidroxibenzilideno)-5-(2,4-diclorobenzoil)carbonohidrazida LASSBio-1708) (42b), de acordo com a fórmula molecular abaixo, incluir as seguintes etapas e parâmetros, ampliados ou reduzidos na mesma proporção:



a) obtenção do composto 42b a partir da condensação da hidrazida 50 com 3-hidroxibenzaldeído em rendimento de 95%, resultando em produto de aspecto físico sólido e PF= 223-225°C;

- RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ 10,62 (s, 1H_b); 10,12 (s, 1H_c); 9,48 (s, 1H, OH); 9,05 (s, 1H_e); 7,80 (s, 1H, N=CH); 7,71 (s, 1H_{3'}); 7,70-7,50 (m, 2H, H_{5'} e H_{6'}); 7,18 (t, 3H, H₂, H₃ e H₄); 6,76 (d, 1H₆);
- MS (m/z): 365;
- Pureza (HPLC): 98.58%.

7. Processo de obtenção de compostos Hidrazida-N-Acildrazonas, **caracterizado pela** metodologia de obtenção do (E)-1-(4-hidroxibenzilideno)-5-(2,4-diclorobenzoil)carbonohidrazida (LASSBio-1707) (42c), conforme fórmula molecular abaixo, incluir as seguintes etapas e parâmetros, ampliados ou reduzidos na mesma proporção:

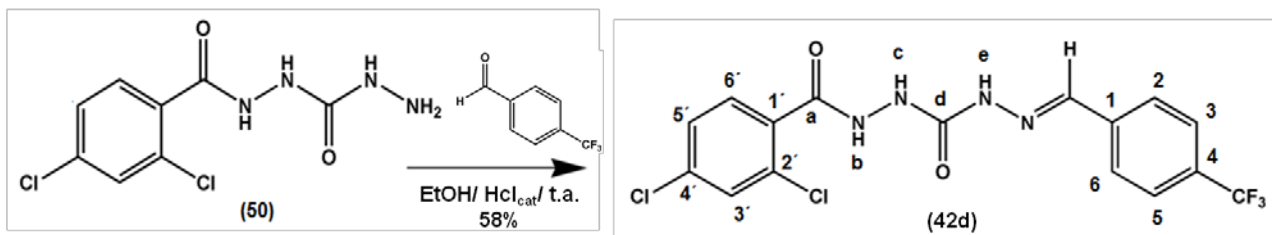


a) obtenção do composto 42c a partir da condensação da hidrazida 50 com 4-hidroxibenzaldeído em rendimento de 90%, resultando em produto de aspecto físico sólido e PF= 225-227°C;

- RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ 10,53 (s, 1H, H_b); 10,16 (s, 1H, H_c); 9,83 (s, OH); 9,05 (s, 1H_e); 7,84 (s, 1H, N=CH); 7,76 (s, 1H, 1H_{3'}); 7,67 (d, 2H, H₂ e H₆, $J=10$ Hz); 7,58 (m, 2H, H_{5'} e H_{6'}); 6,82 (d, 2H, H₃ e H₅, $J=10$ Hz);
- RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 165,3 (Cd, C=O); 158,7 (Ca, C=O); 155,0 (N=CH); 141,2 (C₄); 135,1 (C_{2'}) 133,6 (C_{4'}); 131,7 (C_{6'}); 130,8 (C_{1'}); 129,4 (C₁); 128,5 (C₂ e C₆); 127,3 (C_{3'}); 125,5 (C_{5'}); 115,41 (C₃ e C₅);
- IV (KBr) cm^{-1} : 3362 (ν NH); 1694 (ν C=O); 1651 (δ N-H); 1098 (ν C-Cl);
- MS (m/z): 365;

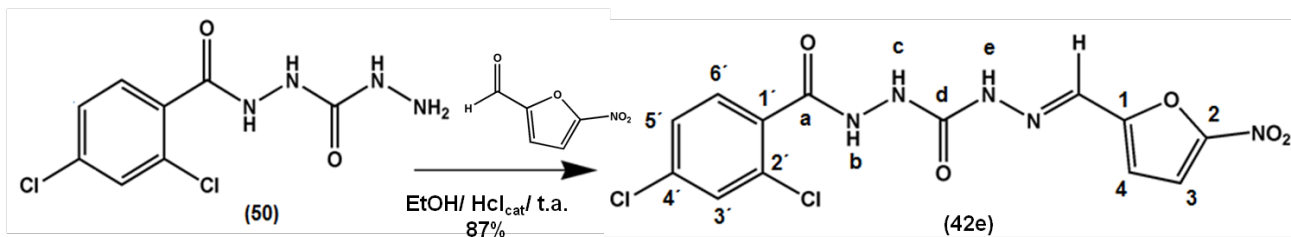
- Pureza (HPLC)= 99,84%.

8. Processo de obtenção de compostos Hidrazida-N-Acildrazonas, **caracterizado pela** metodologia de obtenção do (E)-1-(4-(trifluormetil)benzilideno)-5-(2,4-diclorobenzoil)carbonohidrazida LASSBio-1736) (42d), conforme fórmula molecular abaixo, incluir as seguintes etapas e parâmetros, ampliados ou reduzidos na mesma proporção:



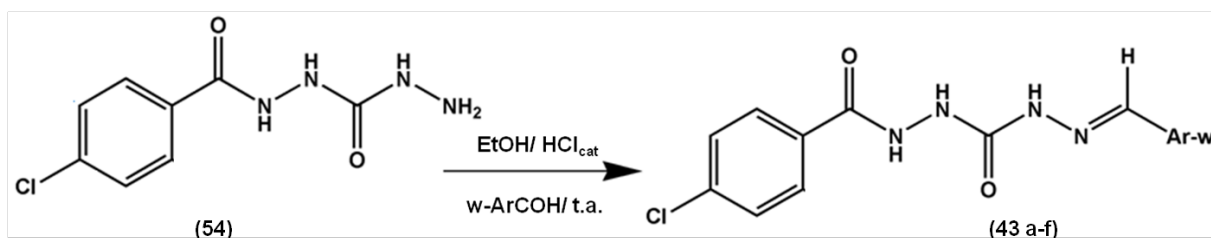
- a) obtenção do composto 42d a partir da condensação da hidrazida 50 com 4-triflorometilbenzaldeído em rendimento de 58%, resultando em produto com aspecto físico sólido e PF= 213-216°C;
- RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (ppm): 10,93 (s, 1H, H_b); 10,17 (s, 1H, H_c); 9,34 (s, 1H, H_e); 8,07 (d, 2H, H₃ e H₅, $J=10\text{Hz}$); 7,97 (s, 1H, N=CH); 7,77 (s, 1H, H_{3'}), 7,74 (m, 2H, H₂ e H₆); 7,55 (m, 2H, H_{5'} e H_{6'});
 - RMN ^{13}C (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (ppm): 165,33 (Cd, C=O); 154,71 (Ca, C=O); 139,19 (N=CH); 138,54 (C₄); 135,20 (C₃ e C₅); 133,59 (C₂ e C₆); 131,77 (C_{2'}); 130,80 (C_{4'}); 128,68 (C_{6'}); 128,05 (C_{1'}); 127,45 (C_{3'}); 127,36 (C_{5'}); 125,38 (C₁); 121,47 (CF₃);
 - IV (KBr) cm^{-1} : 3555 (ν NH); 1703 (ν C=O); 1655 (δ N-H); 1015 (ν C-Cl); 1164-1105 (C-F);
 - MS (m/z): 417;
 - Pureza (HPLC): 99.84%.

9. Processo de obtenção de compostos Hidrazida-N-Acildrazonas, **caracterizado pela** metodologia de obtenção do (E)-1-(2,4-diclorobenzoil)-5-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbonohidrazida (LASSBio-1703) (42e), conforme fórmula molecular abaixo, incluir as seguintes etapas e parâmetros, ampliados ou reduzidos na mesma proporção:



- a) obtenção do composto 42e a partir da condensação da hidrazida 50 com 2-nitrofuraldeído obtendo rendimento de 87%;
 - b) recristalização com etanol, gerando produto de aspecto físico sólido e; PF= 222-225°C
- RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 11.22 (s, 1H, H_b) 10.22 (s, 1H, H_c); 9.18 (s, 1H, H_e); 7.86 (s, 1H, N=CH); 7.79 (d, 1H, H₃, $J=4\text{Hz}$); 7.71 (s, 1H, H_{3'}); 7.57 (m, 2H, H_{5'} e H_{6'}); 7.32 (d, 1H, H₄, $J=4\text{ Hz}$);
 - RMN ^{13}C (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 165,2 (C_d); 154,0 (C_a); 152,7 (C₂); 151,2 (N=CH); 135,1 (C_{2'}); 133,3 (C_{4'}); 131,7 (C₁); 130,7 (C_{6'}); 129,3 (C_{5'}); 129,1 (C_{1'}); 127,2 (C_{3'}); 115,0 (C₃); 112,5 (C₄);
 - IV (KBr) cm^{-1} : 3387 (ν NH); 1727 (ν C=O); 1667 (δ N-H); 1015 (ν C-Cl); 1244 e 1281 (N=O);
 - MS (m/z): 384;
 - Pureza: 99.33%.

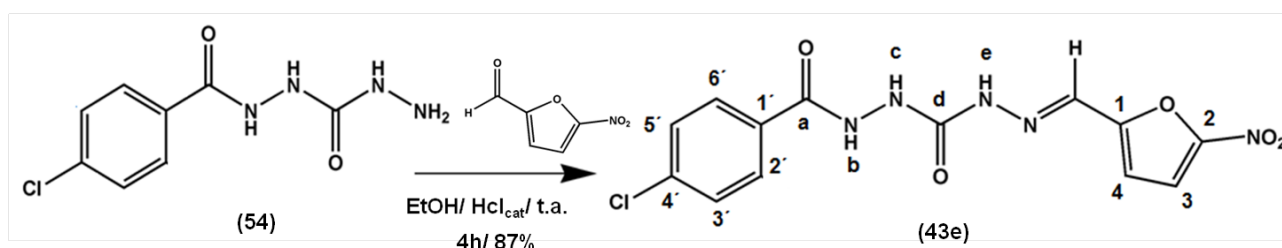
10. Processo de obtenção de compostos Hidrazida-N-Acildrazonas, **caracterizado pela** metodologia de obtenção dos derivados hidrazida-N-acildrazonas da série III (43 a-f), conforme fórmula molecular abaixo, incluir as seguintes etapas e parâmetros, ampliados ou reduzidos na mesma proporção:



- a) 0,1g do intermediário 54, foram adicionados;
- b) agitação em temperatura ambiente, 10ml de etanol e 0.43mmol (1eq) de aldeído;

- c) ácido clorídrico concentrado;
- d) solução sob agitação por 1-4 horas, quando CCF (diclorometano: metanol 5-10%), ou até indicar o termino da reação;
- e) redução do volume do meio reacional a pressão reduzida (2/3 do volume);
- f) adição de gelo e precipitação do produto;
- g) filtragem a vácuo e lavagem com água gelada.

11. Processo de obtenção de compostos Hidrazida-N-Acilidrazonas, **caracterizado pela** metodologia de obtenção do (*E*)-1-(4-clorobenzoil)-5-((5-nitrofuran-2-il)metileno)carbonohidrazida (LASSBio-1491) (43e), conforme fórmula molecular abaixo, incluir as seguintes etapas e parâmetros, ampliados ou reduzidos na mesma proporção:



- a) obtenção do composto 43e a partir da condensação da hidrazida 54 com 2-nitrofuraldeído em rendimento de 87%;
- b) recristalização do composto com etanol, gerando produto de aspecto físico sólido e PF= 217-220°C;
- RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6): \square 11,24 (s, 1H, Hb), 10,39 (s, 1H, Hc); 9,12 (s, 1H, He); 7,91 (m, 3H, N=CH e H2' e H6'); 7,80 (d, 1H, H3, $J=4$); 7,58 (d, 2H, H3' e H5', $J=8$); 7,31 (d, 1H, H4, $J=4$);
- RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) $\square\square\square$ (ppm): 165,32 (Cd, C=O); 154,57 (Ca, C=O); 152,84 (N=CH); 152,40 (C2); 136,69 (C4'); 131,38 (C1'); 129,38 (C2' e C6'); 129,22 (C1); 128,62 (C3' e C5'); 115,16 (C3); 112,62 (C4);
- IV (KBr) cm^{-1} : 3246 (ν NH); 1659 e 1504 (ν C=O); 1596 e 1351 (δ Ar-NO $_2$); 1015 (δ Ar-Cl);
- MS (m/z): 350;
- RMN ^1H com troca por D $_2$ O (500 MHz, DMSO- d_6): 7,96 (m, 3H, N=CH e H2' e H6'); 7,81 (s, 1H, H3); 7,66 (d, 2H, H3' e H5', $J=10\text{Hz}$); 7,32 (s, 1H, H4);
- Pureza(HPLC): 98.31%.

12. Uso de compostos Hidrazida-N-Acilidrazonas, **caracterizado pela** avaliação revelar atividade tripanomicida para os compostos LASSBio-1703 e LASSBio-1491, das séries III e IV e demais compostos congêneres descritos na reivindicação 1.

13. Uso de compostos a partir de Hidrazida-N-Acilidrazonas, de acordo com as reivindicações 1 e 13, **caracterizado pela** avaliação da atividade leishmanicida na forma promastigota do L. major dos compostos da série III, assinalar que LASSBio-1493, LASSBio-1703, LASSBio-1705, LASSBio-1707, LASSBio-1708, LASSBio-1736, possuem alto índice de seletividade para as células parasitárias, estendendo-se para os demais compostos congêneres descritos na reivindicação 1.

14. Uso de compostos a partir de Hidrazida-N-Acilidrazonas, de acordo com as reivindicações 13 e 14, **caracterizado pela** atividade de LASSBio-1493 e LASSBio-1705 serem na ordem de nM.

15. Uso de compostos a partir de Hidrazida-N-Acilidrazonas, de acordo com as reivindicações 13, 14 e 15, **caracterizado pela** avaliação da atividade leishmanicida na forma promastigota do L. major dos compostos da série IV, revelar atividade leishmanicida de LASSBio-1491, LASSBio-1706 e LASSBio-1709, semelhantes aos padrões Miltefosina e Pentamidina.

16. Composições farmacêuticas **caracterizadas pela** presença da substância LASSBio-1491, seus derivados congêneres previstos na reivindicação 1 (Fórmula I), com estereoquímica *E* e/ou *Z*, ou ainda mistura de ambas, em associação com excipientes farmacêuticamente aceitáveis

17. Uso das composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado por** ser para preparar um fármaco com atividade anti-promastigota para *Leishmania major*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania chagasi* e anti-amastigota contra *Leishmania Major*, para tratar leishmaniose e doença de chagas.

FIGURA 1

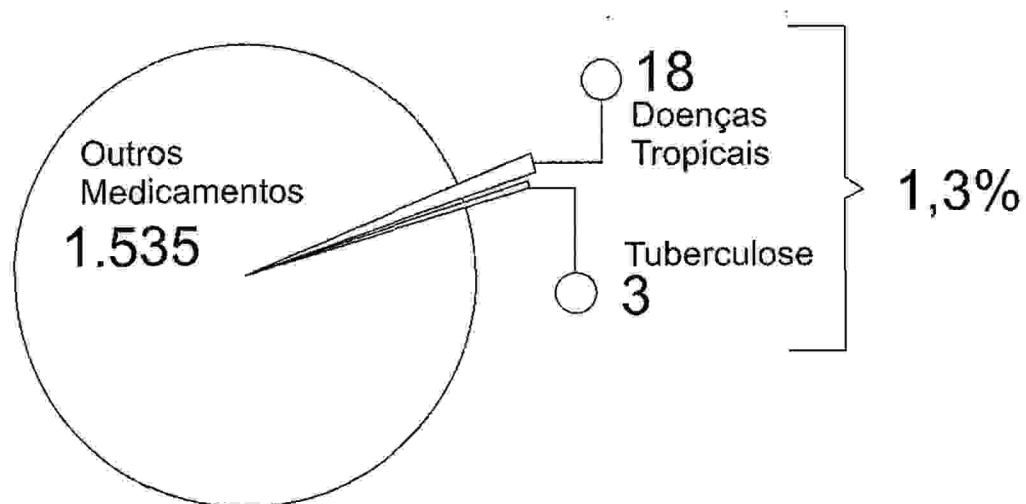


FIGURA 2

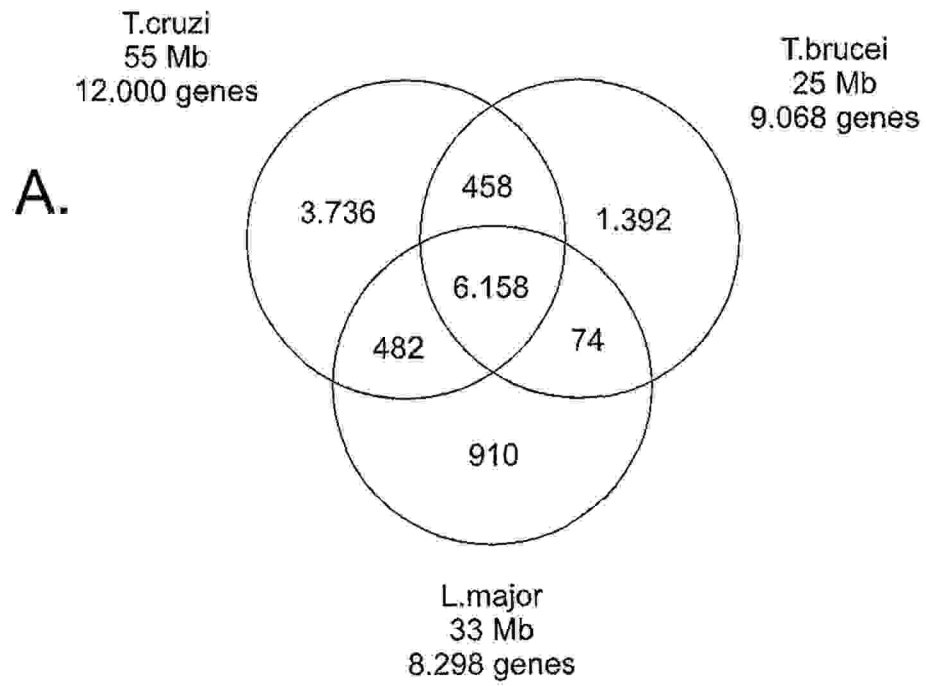


FIGURA 3

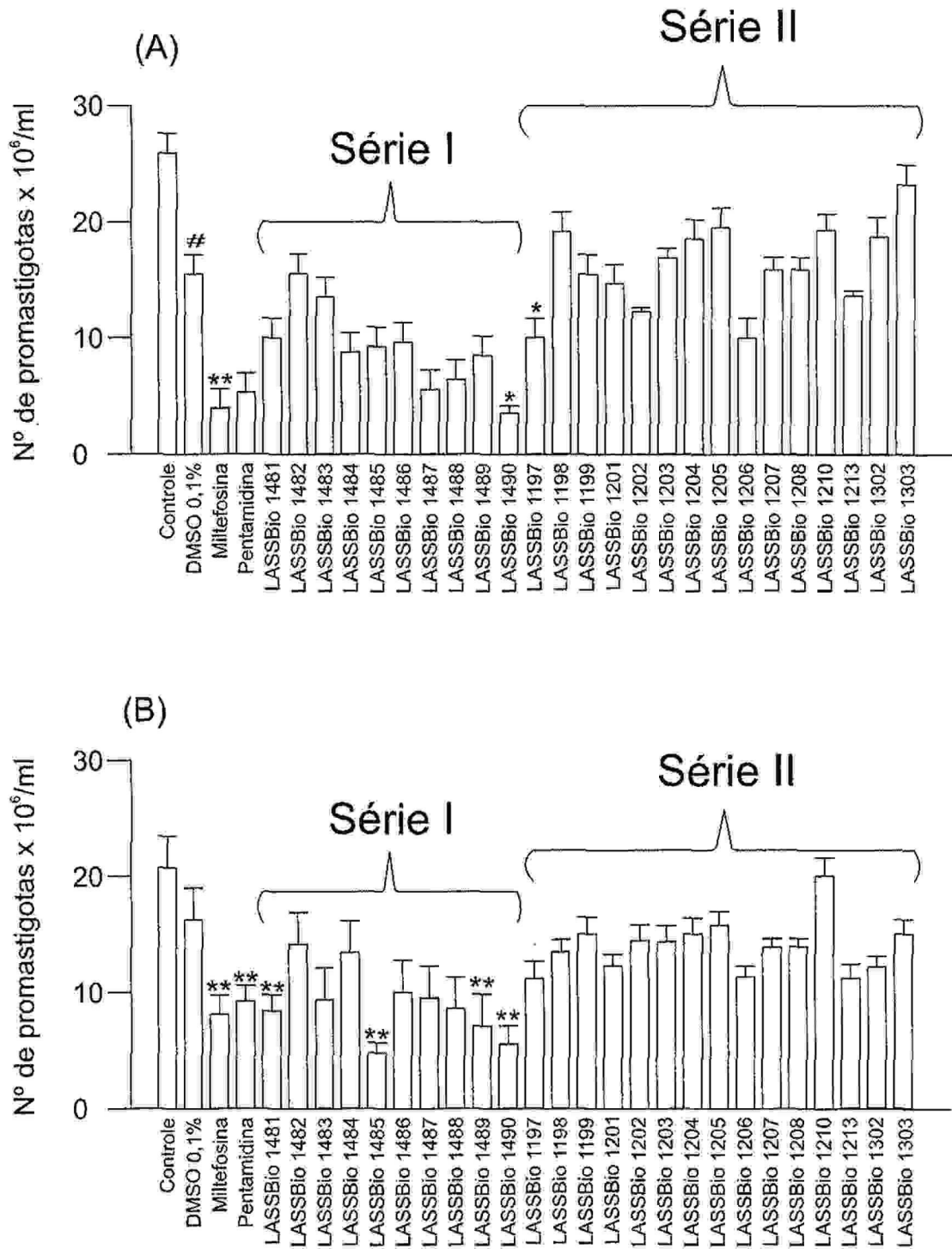


FIGURA 4

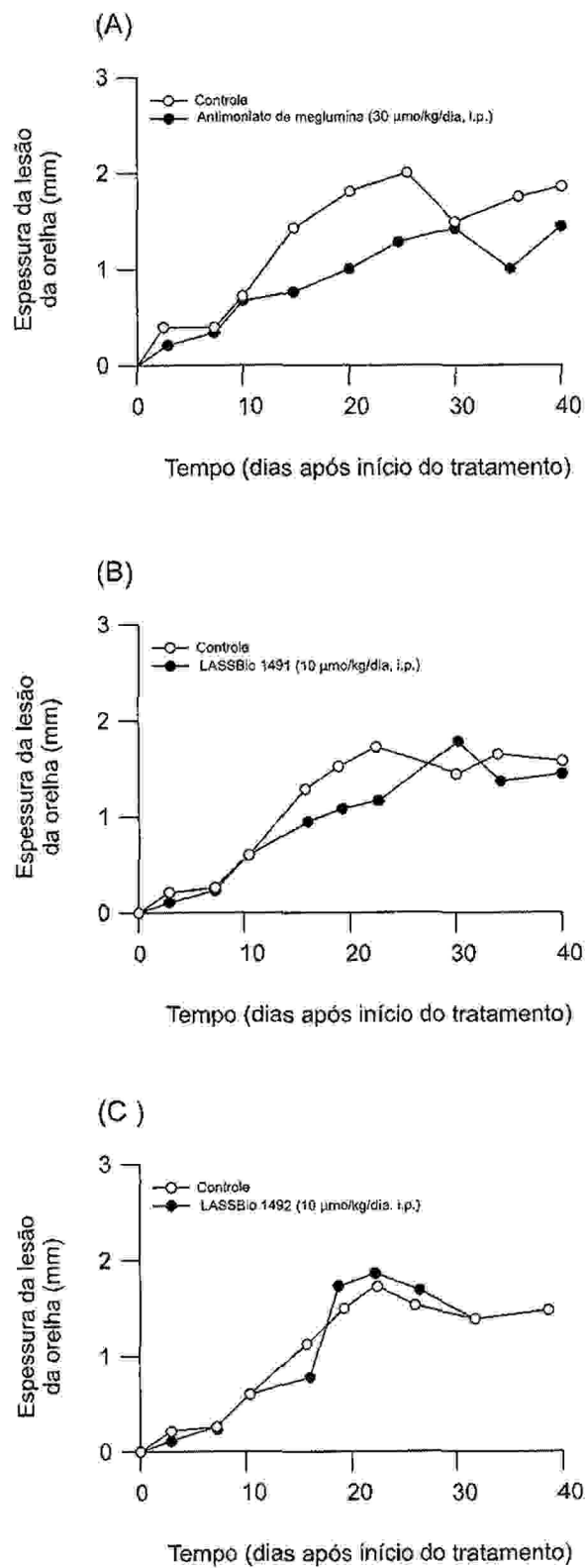


FIGURA 5

