



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020017996-9 A2



(22) Data do Depósito: 02/09/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 15/03/2022

(54) **Título:** AGENTES BIOATIVOS, COMPOSIÇÕES, PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS AGENTES BIOATIVOS E USOS

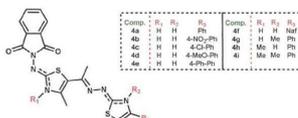
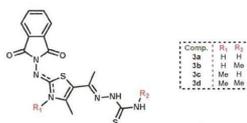
(51) **Int. Cl.:** C07D 221/04; C07D 277/18; C07C 335/40; A61K 31/4015; A61K 31/403; (...).

(52) **CPC:** C07D 221/04; C07D 277/18; C07C 335/40; A61K 31/4015; A61K 31/403; (...).

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** ANA CRISTINA LIMA LEITE; ARSÊNIO RODRIGUES OLIVEIRA; LUCIANNA RABELO PESSOA DE SIQUEIRA; LARISSA PELÁGIA DE LIMA FERREIRA; MARCIUS VINICIUS DE OLIVEIRA SILVA; MOACYR JESUS BARRETO DE MELO REGO; FLAVIANA ALVES DOS SANTOS; MAIRA GALDINO DA ROCHA PITTA.

(57) **Resumo:** AGENTES BIOATIVOS, COMPOSIÇÕES, PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS AGENTES BIOATIVOS E USOS. A presente invenção apresenta a identificação de novos agentes bioativos com atividade antineoplásica. Mais especificamente, a presente invenção é composta por moléculas que possuem em sua estrutura ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas ou ftalimido-bis-tiazóis, apresentam ação antiproliferativa frente às linhagens tumorais, além do processo de obtenção dos ditos compostos e seu uso para o tratamento de células tumorais. A presente invenção se situa nos campos da Medicina, Farmácia e Bioquímica.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

AGENTES BIOATIVOS, COMPOSIÇÕES, PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS AGENTES BIOATIVOS E USOS

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção se refere à identificação e ao uso de novos agentes bioativos com atividade antineoplásica. A presente invenção se situa nos campos da Medicina, Farmácia e Bioquímica.

Antecedentes da Invenção

[0002] Câncer é um conjunto de mais de 100 doenças de crescimento celular desordenado que invadem tecidos e órgãos. Atualmente, sabe-se que a ocorrência desta patologia é alta e tem se mostrado crescente (INCA, 2017).

[0003] A resistência aos agentes citotóxicos, a estreita janela terapêutica, o alto grau de heterogeneidade genômica, as baixas respostas terapêuticas, limitação da indicação e a baixa eficácia do tratamento, originam dificuldades no processo de desenvolvimento de novos fármacos antitumorais (COSTA- LOTUFO, *et al.*, 2010; FERREIRA, *et al.*, 2015). Um antineoplásico ideal seria aquele que é mais ativo e mais seletivo em células tumorais e menos tóxico em células normais, daí a importância dos ensaios prévios de citotoxicidade, fundamental na descoberta de novos quimioterápicos (SANTOS, 2016).

[0004] Outro ponto importante é a ocorrência do desenvolvimento de resistência aos medicamentos, muitas vezes devido à ativação de vias alternativas. Nessa visão, o raciocínio na base de direcionamento de fármacos está mudando radicalmente, onde uma nova geração de drogas anticâncer, capaz de inibir mais de uma via, provavelmente desempenhariam um papel importante (GIORDANO & PETRELLI, 2008).

[0005] Atualmente, sabe-se que o câncer atinge um grande quantitativo populacional e os seus respectivos tratamentos, por vezes, apresentam vários efeitos colaterais, inviabilizando a continuidade do mesmo e ocasionando o óbito

de pacientes. Assim, é importante o investimento em pesquisas que colaborem com este quadro, disponibilizando fármacos com menor número de efeitos colaterais. O antineoplásico ideal é aquele que é mais ativo e mais seletivo em células tumorais e menos tóxico em células normais, daí a importância dos ensaios prévios de citotoxicidade, fundamental na descoberta de novos quimioterápicos.

[0006] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

[0007] O documento intitulado “*Obtenção de novos ftalil-tiazóis e avaliação da atividade antitumoral e imunomodulatória in vitro*” revela o intermediário ftalimido-tiossemicarbazida e seu processo obtenção. Entretanto, na invenção não é descrito o uso de DMAP.

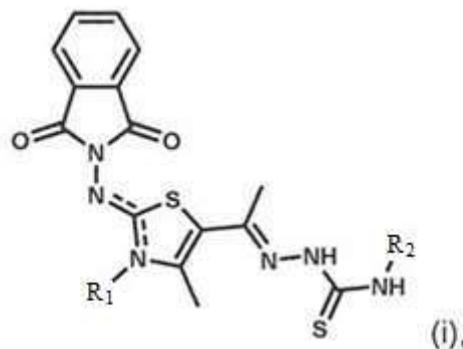
[0008] O documento intitulado “*Planejamento estrutural, síntese e avaliação das propriedades farmacológicas de inéditas tiazolil-hidrazonas derivadas da Ftalimida e de isatina*” revela o intermediário ftalimido-tiossemicarbazida e seu processo de obtenção. O processo diferencia-se pelo tempo de reação.

[0009] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

[0010] Dessa forma, a presente invenção resolve os problemas do estado da técnica a partir de novos compostos de ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas e ftalimido-*bis*-tiazóis, representando substâncias de efeitos farmacológicos ativos, com atividade antiproliferativa, seus respectivos processos de obtenção, e seu uso terapêutico como fármacos dotados de ação contra linhagens de células tumorais.

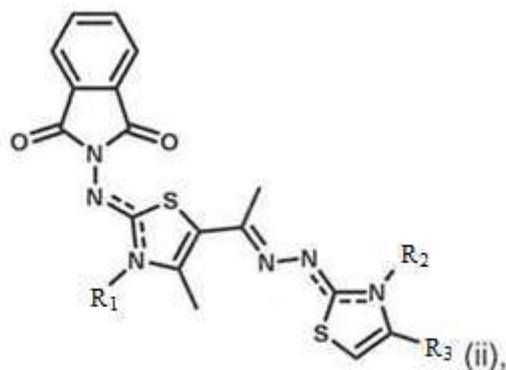
[0011] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um agente bioativo de ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas de fórmula (i):



em que R_1 e R_2 são permutados entre hidrogênio e metila.

[0012] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta uma composição compreendendo o agente bioativo de ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas, conforme definido no primeiro objeto.

[0013] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um agente de ftalimido-*bis*-tiazóis de fórmula (ii):



em que R_1 e R_2 são permutados entre hidrogênio e metila e R_3 é selecionado entre o grupo que compreende: Fenil, 4-MeO-Fenil, 4-Cl-Fenil, 4-NO₂-Fenil, 4-Bifenil e 2-Naftil.

[0014] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta uma composição compreendendo o agente bioativo de ftalimido-*bis*-tiazóis de fórmula, conforme definido no terceiro objeto.

[0015] Em um quinto objeto, a presente invenção apresenta o processo de obtenção dos agentes bioativos de derivados ftalimido-tiazóis-

tiossemicarbazonas e ftalimido-*bis*-tiazóis, que compreende as etapas de:

- (i) preparo das ftalimido-tiossemicarbazidas;
- (ii) preparo dos intermediários ftalimido-5-acetil-tiazóis;
- (iii) preparo dos derivados ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas;
- (iv) preparo dos derivados ftalimido-*bis*-tiazóis.

[0016] Em um sexto objeto, a presente invenção apresenta uso do agente bioativo de ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas para o preparo de medicamentos para tratamento de câncer.

[0017] Em um sétimo objeto, a presente invenção apresenta uso do agente bioativo ftalimido-*bis*-tiazóis para o preparo de medicamentos para tratamento de câncer.

[0018] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e serão descritos detalhadamente a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0019] São apresentadas as seguintes figuras:

[0020] A figura 1 apresenta as fórmulas gerais, sendo a (i) para a série dos ftalimido-tiazóis- tiossemicarbazonas, em que R₁ e R₂ são permutados entre hidrogênio e metila, e a (ii) para a série dos ftalimidos-*bis*-tiazóis em que R₁ e R₂ são permutados entre hidrogênio e metila e R₃ é selecionado entre o grupo que compreende: Fenil, 4-MeO-Fenil, 4-Cl-Fenil, 4-NO₂-Fenil, 4- Bifenil e 2-Naftil.

[0021] A figura 2 mostra o esquema de reação de compostos intermediários ftalimido-tiossemicarbazidas, em que: a) tiossemicarbazida (R₁= H) ou 3-metil-4-tiossemicarbazida (R₁=CH₃), DMF, refluxo, 1h.

[0022] A figura 3 mostra o esquema de reação de compostos intermediários ftalimido-tiazóis, em que: b) reagente deciclicação: 3-cloro-2,4-pentanodiona, propanona, 1,5h, refluxo.

[0023] A figura 4 mostra o esquema de reação dos ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas (**3a-d**), em que: c) tiossemicarbazida ou 3-metil-4-tiossemicarbazida, etanol, H₂SO₄. Os substituintes R₁ e R₂ correspondem a

hidrogênio e/ou metila permutados.

[0024] A figura 5 mostra o esquema de reação dos ftalimido-*bis*-tiazóis (**4a-i**), em que: d) 2-bromo-cetonas aromáticas, isopropanol. Os substituintes R₁ e R₂ correspondem a hidrogênio e/ou metila permutados e R₃ é selecionado entre o grupo que compreende: Fenil, 4-MeO-Fenil, 4-Cl-Fenil, 4-NO₂-Fenil, 4-Bifenil e 2-Naftil.

[0025] A figura 6 mostra o esquema geral de todas as etapas de reações de compostos intermediários e finais, em que: a) tiossemicarbazida ou 3-metil-4-tiossemicarbazida, DMF, refluxo, 1h; b) 3-cloro-2,4-pentanodiona, propanona, 1,5h, refluxo; c) tiossemicarbazida ou 3-metil-4-tiossemicarbazida, etanol, H₂SO₄; d) 2-bromo-cetonas aromáticas, isopropanol. Os substituintes R₁ e R₂ correspondem a hidrogênio e/ou metila permutados e R₃ é selecionado entre o grupo que compreende: Fenil, 4-MeO-Fenil, 4-Cl-Fenil, 4-NO₂-Fenil, 4-Bifenil e 2-Naftil.

Descrição Detalhada da Invenção

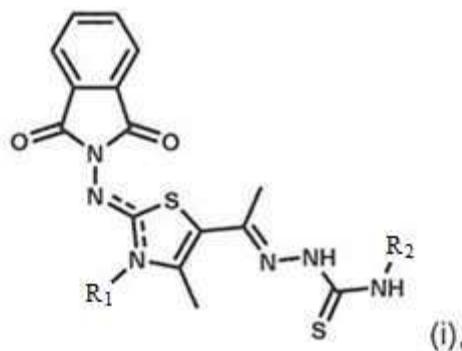
[0026] A presente invenção apresenta a identificação e o uso de novos agentes bioativos com atividade antineoplásica. A presente invenção é composta por moléculas que possuem em sua estrutura ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas ou ftalimido-*bis*-tiazóis, apresentam ação antiproliferativa frente à linhagens tumorais e se configura como potencial candidato a fármaco para a terapêutica do câncer.

[0027] As substâncias obtidas, conforme indicado na presente invenção, representam novos derivados híbridos dos núcleos heterocíclicos ftalimida e tiazol, onde o planejamento foi realizado para obtenção de substituições na posição C5 do heterociclo tiazol. A série de compostos apresenta grupamentos tiossemicarbazonas e diferentes tiazolil-hidrazonas na posição C5 do tiazol ligado ao anel ftalimida. Nos compostos que possuem um segundo núcleo tiazol, são encontrados substituintes aromáticos (fenil, bi-fenil e 2-naftil), em alguns casos com presença de grupos com diferentes características eletrônicas na

posição para (4-cloro, 4-nitro, 4-metoxi).

[0028] As estruturas **3a-d** e **4a-i** presentes nas Figuras 1, 4 e 5 surgem como alternativas terapêuticas viáveis para o tratamento do câncer. Conforme *screening* realizado para os compostos em sete linhagens tumorais, o derivado **4c** se destacou por atuar em todas as linhagens testadas. Além disso, esses compostos possuem uma baixa citotoxicidade, possibilitando uma terapêutica com menos efeitos colaterais do que a utilizada atualmente e possui um baixo custo de síntese.

[0029] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um agente bioativo deftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas de fórmula (i):



em que R₁ e R₂ são permutados entre hidrogênio e metila.

[0030] Em uma concretização, o agente apresenta atividade antineoplásica.

[0031] Em uma concretização, o agente apresenta atividade antiproliferativa.

[0032] Em uma concretização, o agente apresenta IC₅₀ = 5,8μM para a linhagem tumoral Leucemia Linfoblástica Aguda.

[0033] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta uma composição compreendendo o agente bioativo de ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas, conforme definido no primeiro objeto.

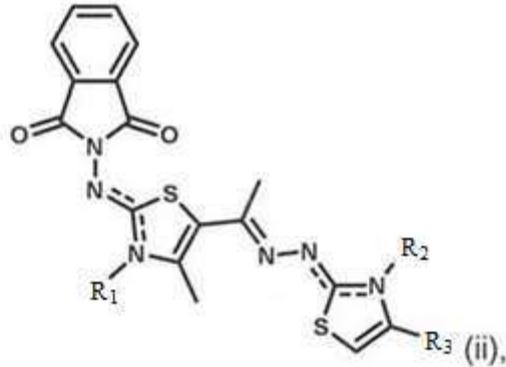
[0034] Em uma concretização, a composição compreende adicionalmente um meio de cultura apropriado para cada célula, soro fetal bovino e DMSO.

[0035] Em uma concretização, a composição apresenta atividade antineoplásica.

[0036] Em uma concretização, a composição apresenta atividade

antiproliferativa.

[0037] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um agente de ftalimido-*bis*-tiazóis de fórmula (ii):



em que R₁ e R₂ são permutados entre hidrogênio e metila e R₃ é selecionado entre o grupo que compreende: Fenil, 4-MeO-Fenil, 4-Cl-Fenil, 4-NO₂-Fenil, 4-Bifenil e 2-Naftil.

[0038] Em uma concretização, R₁ e R₂ são H e R₃ é selecionado entre 4-Cl-Fenil e 2-Naftil.

[0039] Em uma concretização, o agente bioativo de fórmula (ii) com R₁ e R₂ sendo H e R₃ sendo selecionado entre 4-Cl-Fenil e 2-Naftil apresenta menores valores em termos de percentual de viabilidade celular.

[0040] Em uma concretização, o agente bioativo de fórmula (ii) com R₁ e R₂ sendo H e R₃ 4-Cl-Fenil (estrutura 4c) apresenta IC₅₀ = 6,98μM para a linhagem tumoral K562.

[0041] Em uma concretização, o agente bioativo de fórmula (ii) com R₁ e R₂ sendo H e R₃ 4-Cl-Fenil (estrutura 4c) apresenta IC₅₀ = 11,97μM para a linhagem tumoral T47-D.

[0042] Em uma concretização, o agente bioativo de fórmula (ii) com R₁ e R₂ sendo H e R₃ 4-Cl-Fenil (estrutura 4c) apresenta IC₅₀ = 5,66μM para a linhagem tumoral SKMEL-28.

[0043] Em uma concretização, o agente bioativo de fórmula (ii) com R₁ e R₂ sendo H e R₃ 4-Fenil-Fenil (estrutura 4e) apresenta IC₅₀ = 5,8μM para a linhagem

tumoral MOLT-4.

[0044] Em uma concretização, o agente apresenta atividade antineoplásica.

[0045] Em uma concretização, o agente apresenta atividade antiproliferativa.

[0046] O valor da IC₅₀ corresponde à concentração do composto que induz metade do efeito máximo. No caso da presente invenção, refere-se a concentração capaz de eliminar a metade das células tumorais testadas. Desta forma deve-se considerar que os valores de IC₅₀ encontrados são os valores mínimos de cada composto que proporciona os efeitos descritos na presente invenção para as células avaliadas. Os valores de IC₅₀ demonstram se os compostos avaliados serão promissores em relação a se tornar um possível novo fármaco antineoplásico. Segundo o Instituto nacional do Câncer (NHI) dos EUA um novo derivado para ser considerado promissor deve apresentar valores de IC₅₀ menores que 10 µM nas linhagens testadas, os compostos da presente patente apresentam essas características.

[0047] Para a realização dos ensaios, cada composto foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos na concentração requerida utilizando-se o meio de cultura apropriado para cada célula, contendo 10% de soro fetal bovino. Obedecendo a uma concentração final de DMSO em no, máximo, 0,2%.

[0048] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta uma composição compreendendo o agente bioativo de ftalimido-*bis*-tiazóis de fórmula, conforme definido no terceiro objeto.

[0049] Em uma concretização, a composição compreende adicionalmente um meio de cultura apropriado para cada célula, soro fetal bovino e DMSO.

[0050] Em uma concretização, a composição apresenta atividade antineoplásica.

[0051] Em uma concretização, a composição apresenta atividade antiproliferativa.

[0052] Em um quinto objeto, a presente invenção apresenta o processo de obtenção dos agentes bioativos de derivados ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas e ftalimido-*bis*-tiazóis, que compreende as etapas de:

- (i) preparo das ftalimido-tiossemicarbazidas;
- (ii) preparo dos intermediários ftalimido-5-acetil-tiazóis;
- (iii) preparo dos derivados ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas;
- (iv) preparo dos derivados ftalimido-*bis*-tiazóis.

[0053] Em uma concretização, o processo de obtenção de ftalimido-tiossemicarbazidas é caracterizado por compreender as etapas de:

(i) reação de 20-40 mmol de anidrido ftálico com 20-40 mmol de tiossemicarbazida ou 20-40 mmol de 4-metil-3-tiossemicarbazida, utilizando 5-10 mL (ou 100-200 gotas) de *N,N*-dimetilformamida como solvente sob refluxo por 2 a 4 horas;

- (ii) resfriamento até temperatura ambiente;
- (iii) precipitação devido à adição de água destilada;
- (iv) purificação através da dissolução em propanona, seguida de filtração.

[0054] Em uma concretização, o processo de obtenção de ftalimido-tiossemicarbazidas é caracterizado por compreender as etapas de:

(i) reação de anidrido ftálico 2,96 g (20 mmol) com 1,82g (20 mmol) de tiossemicarbazida ou 2,10 g (20 mmol) de 4-metil-3-tiossemicarbazida, utilizando 5 mL de *N,N*-dimetilformamida como solvente sob refluxo por 120 minutos;

- (ii) resfriamento até temperatura ambiente;
- (iii) precipitação devido à adição de água destilada;
- (iv) purificação através da dissolução em propanona, seguida de filtração.

[0055] Em uma concretização, o processo de obtenção de intermediários ftalimido-5-acetil-tiazóis é caracterizado por compreender as etapas de:

(i) mistura de 1-4 mmol da respectiva ftalimido-tiossemicarbazida em 10 – 20 mL (200-400 gotas) de propanona;

(ii) adição de 2,0-4,0 mL (40-80 gotas) de 3-cloro-2,4-pentanodiona (1-4mmol) e permanência em agitação magnética e refluxo por 90-180 minutos;

- (iii) formação de precipitado, seguida de filtração.

[0056] Em uma concretização, o processo de obtenção de intermediários ftalimido-5-acetil-tiazóis é caracterizado por compreender as etapas de:

(i) mistura da respectiva ftalimido-tiossemicarbazida 2,26 mmol em 10 mL (200 gotas) de propanona;

(ii) adição de 2,5 mL (50 gotas), de 3-cloro-2,4-pentanodiona (2,26 mmol) e permanência em agitação magnética e refluxo por 90 minutos;

(iii) formação de precipitado, seguida de filtração.

[0057] Em uma concretização, o processo de obtenção de derivados ftalimido-tiazol-tiossemicarbazidas é caracterizado por compreender as etapas de;

(i) mistura de 1 - 4mmol do respectivo ftalimido-5-acetil-tiazol em 10-20 mL (200-400 gotas) de etanol;

(ii) adição de 5-10 gotas de ácido sulfúrico e percurso de 30–60 minutos em ultrassom (40 MHz);

(iii) adição de 1-4 mmol de tiossemicarbazida ou 1-4mmol de 4-metil-3-tiossemicarbazida;

(iv) permanência de 3 - 6 horas em ultrassom, com formação de precipitado, seguida de filtração.

[0058] Em uma concretização, o processo de obtenção de derivados ftalimido-tiazol-tiossemicarbazidas é caracterizado por compreender as etapas de:

(i) mistura de 1,66 mmol do respectivoftalimido-5-acetil-tiazol em 10 mL (ou 200 gotas) de etanol;

(ii) adição de 5 gotas (100 gotas) de ácido sulfúrico e percurso de 30 minutos em ultrassom;

(iii) adição de 0,15 g (1,66 mmol) de tiossemicarbazida ou de 0,174 g (1,66mmol) de 4-metil-3- tiossemicarbazida;

(iv) permanência de 3 horas em ultrassom, com formação de precipitado, seguida de filtração.

[0059] Em uma concretização, o processo de obtenção de derivados de ftalimido-*bis*-tiazóis é caracterizado por compreender as etapas de:

(i) mistura de 1-4 mmol da respectiva ftalimido-tiazol-tiossemicarbazona em 10 - 20 mL (ou 200-400 gotas) de 2-propanol;

(ii) adição de 1-4 mmol da respectiva α -halo-acetofenona;

(iii) banho de ultrassom (40 MHz), por 4-6 horas a temperatura ambiente;
(iv) formação de precipitado, seguida de filtração e lavagem com 2-propanol.

[0060] Em uma concretização, o processo de obtenção de derivados de ftalimido-*bis*-tiazóis é caracterizado por compreender as etapas de:

(i) mistura da respectiva ftalimido-tiazol-tiossemicarbazona em (1,66 mmol) em 10-20 mL (200-400 gotas) de 2-propanol;
(ii) adição da respectiva α -halo-acetofenona (1,66 mmol);
(iii) banho de ultrassom (40 MHz), por 4 horas a temperatura ambiente;
(iv) formação de precipitado, seguida de filtração e lavagem com 2-propanol.

[0061] Em um sexto objeto, a presente invenção apresenta uso do agente bioativo de ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas para preparar um medicamento para tratar o câncer.

[0062] Em uma concretização, o câncer é selecionado entre as linhagens: Leucemia Linfoblástica Aguda, Linfome de Não-Hodgkin de Células B, Leucemia de Promielocítica Aguda, Leucemia Promielocítica Aguda Resistente, Leucemia Micelogênica Crônica, Adenocarcinoma de Mama, Carcino Ductal de Mama e Malanoma Maligno.

[0063] Em uma concretização, o agente apresenta atividade antineoplásica.

[0064] Em uma concretização, o agente apresenta atividade antiproliferativa.

[0065] Em um sétimo objeto, a presente invenção apresenta uso do agente bioativo de ftalimido-*bis*-tiazóis para preparar um medicamento para tratar o câncer.

[0066] Em uma concretização, o câncer é selecionado entre as linhagens: Leucemia Linfoblástica Aguda, Linfome de Não-Hodgkin de Células B, Leucemia de Promielocítica Aguda, Leucemia Promielocítica Aguda Resistente, Leucemia Micelogênica Crônica, Adenocarcinoma de Mama, Carcino Ductal de Mama e Malanoma Maligno.

[0067] Em uma concretização, o agente apresenta atividade antineoplásica.

[0068] Em uma concretização, o agente apresenta atividade antiproliferativa.

[0069] Na presente invenção, entende-se por:

[0070] Atividade antiproliferativa: como aqui utilizado, o termo “atividade antiproliferativa” se refere ao impedimento da multiplicação das células.

[0071] Antineoplásico: como aqui utilizado, o termo “antineoplásico” se refere a medicamentos utilizados para destruir neoplasmas ou células malignas, e tem a finalidade de evitar ou inibir o crescimento e a disseminação de tumores. O ensaio do MTT mensura proliferação celular (propriedade do teste). Já a atividade antineoplásica é intrínseca a molécula. Então se a atividade antiproliferativa é realizada em células neoplásicas, a molécula, substância ou composto tem atividade antineoplásica. Quando o ensaio do MTT é feito em células não-neoplásicas (a exemplo das células do sangue periférico de indivíduos saudáveis), a atividade é apenas antiproliferativa e não antineoplásica.

[0072] A presente invenção apresenta como vantagem moléculas inéditas, assim como a sua avaliação frente a linhagens tumorais. Os resultados mostraram-se promissores, utilizando-se os grupos farmacofóricos: ftalimida e tiazol, presentes nestas duas séries químicas apresentadas. Por outro aspecto avaliado, os compostos foram testados frente às Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC), apresentando valores de $IC_{50} > 100\mu M$, já que a dose máxima testada foi $100\mu M$, enquanto o controle positivo (Doxorrubicina) teve o valor de $IC_{50} 6,06 \pm 1,08\mu M$.

[0073] Os candidatos a fármacos, apresentados, mostraram-se potentes e seletivos nos ensaios realizados, tendo grande possibilidade de serem introduzidos na terapia antineoplásica.

[0074] Tendo em vista os resultados promissores obtidos até o momento, os quais compõem a parte *in vitro*, as moléculas seguirão para ensaio clonogênico. Além disso, posteriormente, os compostos seguirão para ensaios *in vivo* avaliando-se fase aguda, sub-aguda e crônica.

Exemplos

[0075] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Exemplo 1 - Síntese dos compostos

Procedimento de preparação das ftalimido-tiossemicarbazidas

[0076] Para a obtenção dos compostos ftalimido-tiossemicarbazidas, reage-se o anidrido ftálico e tiossemicarbazida ou 3-metil-4-tiossemicarbazida, utilizando *N,N*-dimetilformamida como solvente, sob refluxo por 120 minutos. Após o resfriamento da reação a temperatura ambiente, adiciona-se água destilada no meio reacional para precipitação do produto. Para a purificação, dissolveram-se os produtos em propanona com posterior filtração das impurezas insolúveis. O solvente dos filtrados foi evaporado a baixa pressão e obtiveram-se sólidos cristalinos brancos. Procedimento geral de preparação dos derivados ftalimido-5-acetil-tiazóis Dissolveu-se a respectiva ftalimido-tiossemicarbazida em propanona e adicionou-se a 3-cloro-2,4-pentanodiona. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética em refluxo durante 1,5horas, quando ocorreu formação de um precipitado.

[0077] Os compostos intermediários (1) foram sintetizados partindo-se da condensação entre o anidrido ftálico com a tiossemicarbazida ou 3-metil-4-tiossemicarbazida (0) (Figura 2). Esses reagentes foram adquiridos de fontes comerciais. O intermediário da rota de síntese foi preparado sob refluxo e aquecimento, usando como solvente *N,N*-dimetilformamida (DMF). Para a obtenção dos compostos hora apresentados, não foi usada catálise nesta etapa. *Síntese dos intermediários ftalimido-1,3-tiazóis com substituinte acetil em C5 (compostos intermediários)*

[0078] Esta etapa de ciclização é feita com uso de solvente aprótico e refluxo (Figura 3).

[0079] A metodologia utilizada para obtenção dos tiazóis foi a de Hantzsch proposta em 1887, no qual reagem tioamidas e α -halo-cetona-substituídas (SOUSA *et al.*, 2005). Com o intuito de se melhorar o rendimento, bem como

diminuir o tempo reacional, adaptações são efetuadas no processo reacional, que neste caso foi a troca do meio reacional que foi em banho de ultrassom pelo refluxo.

Procedimento geral de preparação dos derivados ftalimido-tiazol-tiossemicarbazonas (primeira série de compostos finais)

[0080] Adicionou-se o respectivo ftalimido-5-acetil-tiazol em etanol, adicionaram-se algumas gotas de ácido sulfúrico e manteve-se em ultrassom por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se a tiossemicarbazida ou 3-metil-4-tiossemicarbazida. A mistura foi mantida sob ultrassom durante 3 horas. O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado e seco em dessecador sob vácuo.

[0081] Essa é uma das séries inéditas que apresenta atividade antineoplásica (Figura 4).

Procedimento geral de preparação dos derivados ftalimido-bis-tiazóis (segunda série de compostos finais)

[0082] Realizou-se a adição do respectivo derivado ftalimido-tiazol-tiossemicarbazonas, seguido da adição de 2- propanol e da respectiva α -halo-acetofenona. A ciclização conduziu-se em um banho de ultrassom (40MHz), em média, por 4 horas. As α -halo-acetofenonas utilizadas foram adquiridas de fontes comerciais.

[0083] Por fim, tem-se a segunda série de compostos inéditos que possui em sua estrutura dois grupos tiazóis e que compõe o presente trabalho (Figura 5).

[0084] Segue abaixo um esquema geral, incluindo as etapas de obtenção de compostos intermediários necessários para obtenção das duas séries de compostos finais da presente invenção. As duas séries de moléculas exploradas nesse trabalho estão destacadas em cor azul (Figura 6).

Exemplo 2 – Propriedades

Avaliação da atividade antiproliferativa

[0085] O estudo de citotoxicidade foi avaliado pelo método MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2- H-brometo de tetrazolium], Para a realização dos ensaios,

cada composto foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos na concentração requerida utilizando-se o meio de cultura apropriado para cada célula, contendo 10% de soro fetal bovino. Foram realizados ensaios frente a células saudáveis com o intuito de avaliar a toxicidade dos compostos, além da avaliação antiproliferativa em linhagens tumorais, sendo inicialmente realizado uma triagem dos compostos, seguida da realização de ensaios, em triplicata, para determinação dos respectivos IC₅₀ dos compostos selecionados no *screening*.

[0086] A citotoxicidade em células não transformadas foi realizada em PBMC, onde foi coletado o sangue periférico de indivíduos saudáveis em 3 tubos com heparina por paciente. Separadas as células com Ficoll, contadas na câmara de Neubauer, contendo $5 \cdot 10^5$ células/poço, em placas de 96 poços, incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas.

[0087] Em seguida, adicionadas em 10 e 100µM, incubadas por 72 horas. O controle negativo recebeu somente veículo (meio completo). O controle de DMSO recebeu as concentrações de 0,1% e 0,2%, que representa a concentração final do solvente no poço.

[0088] Após 24h, foram adicionados 20µL de MTT por poço, incubado por 3h na estufa úmida 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, adicionou-se 130µL de SDS 20% ao abrigo da luz por 24h. Após esse período, procedeu-se a leitura da densidade ótica em espectrofotômetro no leitor de microplacas (EL808 - Biotek®) em absorvância de 570 nm. Foi avaliado, neste estudo, o potencial seletivo desses derivados ftalimido-tiazóis.

[0089] Por esta razão, as células não tumorais foram expostas ao tratamento com os novos compostos e com o controle positivo, a doxorubicina (utilizada atualmente na clínica). Em razão da necessidade de coleta de sangue periférico, o Projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Pernambuco (CEP-CCS/UFPE) e aprovado sob o parecer nº 74653617.0.0000.5208. Depois de realizado o protocolo para obtenção das células em questão, foram colocadas

placas de 96 poços, incubadas por 24 horas. A viabilidade dos compostos testados na concentração de 10µM variou de 83,67 a 100% e na concentração de 100µM variaram de 73,5 a 100%. Verificou-se que todos os compostos apresentaram valores de IC₅₀ > 100µM, enquanto que o controle positivo de doxorrubicina obteve IC₅₀ 7,2µM. Estes resultados demonstram que esta nova série de compostos é menos tóxica, em PBMCs, quando comparada ao fármaco de referência utilizado na clínica.

[0090] Quanto à avaliação da atividade antineoplásica destes compostos, o *screening* foi realizado em sete linhagens tumorais (Tabela 1), plaqueadas em placa de 96 poços, cada poço com a respectiva quantidade de célula conforme suas respectivas densidades de inoculação, controle branco, controle DMSO à 0,01% e controle positivo de Doxorrubicina em triplicata. Após 24h em estufa úmida a 37°C e 5% CO₂, foram adicionados os compostos na concentração de 10µM, incubados por 48h, seguido da adição da solução de MTT e após 3h foi acrescida a solução de SDS a 20%. Aguardou-se 24h para leitura da absorbância por espectroscopia a 570nm no leitor de microplacas EL808 - Biotek®. A média da densidade ótica dos poços teste foi comparada com a média do grupo controle para a determinação da viabilidade celular.

Tabela 1- Densidade de Inoculação das Linhagens Tumorais

Linhagem Tumoral	Nome	Densidade de Inoculação
MOLT-4	Leucemia Linfoblástica Aguda	3x10 ⁴
TOLEDO	Linfome de Não-Hodgkin de Células B	10x10 ⁴
HL-60-MX1	Leucemia de Promielocítica Aguda	4x10 ⁴
HL-60-MX1	Leucemia Promielocítica Aguda Resistente	2x10 ⁴
K562	Leucemia Micelogênica Crônica	1x10 ⁴
MCF7	Adenocarcinoma de Mama	1x10 ⁴

T47D	Carcino Ductal de Mama	2x10 ⁴
SK-MEL-28	Malanoma Maligno	1x10 ⁴

Tabela 2 – Screening frente às Linhagens Tumorais – Viabilidade Celular (%)

		MOLT-4	TOLEDO	HL-60-MX1	K562	MCF7	T47D	SK-MEL-28
DOXO	10µM	1	30	46	18		21	6
3b	10µM	30	1	34	96	63	58	64
4a	10µM	9	70	96	100	43	77	100
4b	10µM	28	79	100	47	57	59	100
4c	10µM	5	27	6	23	55	56	21
4d	10µM	42	30	11	30	54	75	100
4e	10µM	13	2	76	70	45	61	100
4f	10µM	23	15	5	26	59	59	46

[0091] Após o *screening*, os compostos que reduziram a viabilidade celular a valores inferiores a 59%, foram submetidos a novos ensaios para determinação da concentração de composto necessária para 50% de inibição *in vitro* (IC₅₀), a partir da média dos resultados de viabilidade adquiridos foicalculado com auxílio do OriginPro8 (Originlab CorporationK, MA, EUA), em seguida determinou-se o índice de seletividade (IS) através da razão IC₅₀ PBMC/ IC₅₀ linhagem tumoral. Concentração Inibitória em 50% (IC₅₀) dos Compostos em MOLT-4.

Tabela 3 – Concentração Inibitória em 50% (IC₅₀) dos Compostos em MOLT-4

Composto	IC₅₀ MOLT (µM)
DOXO	6,37±0,3
3b	6,04±0,04
4	7,1±0,95
4b	7,12±0,59
4c	5,94±0,79

4d	5,99±0,03
4e	6,9±0,87
4f	5,8±0,42

Tabela 4 – Concentração Inibitória em 50% (IC₅₀) dos Compostos em K562

Composto	IC₅₀ MOLT (µM)
DOXO	6,52±0,21
4b	11,97±1,54
4c	6,98±0,74
4d	7,74±2,47
4f	8,48±1,82

Tabela 5 – Concentração Inibitória em 50% (IC₅₀) dos Compostos em SKMEL-

28

Composto	IC₅₀ MOLT (µM)
DOXO	5,65±0,82
4e	5,67±1,81
4f	5,85±0,38

Tabela 6 – Concentração Inibitória em 50% (IC₅₀) dos Compostos em T47-D

Composto	IC₅₀ MOLT (µM)
DOXO	6,36±0,27
4e	11,97±1,81

[0092] Ao avaliar a atividade antineoplásica dos compostos frente às linhagens tumorais listadas, percebemos que os compostos mais volumosos, apresentam grupos retiradores de elétrons como halogênio ou nitro que exerceram papel promissor no aumento da atividade. As moléculas mais ativas possuem maior peso molecular, se mostraram menos tóxico e mais seletivo em comparação aos demais compostos revelando-se estruturas promissoras.

[0093] Pode-se verificar que os compostos **3b** e **4a-f** revelaram bons resultados exibindo menores valores em termos de percentual de viabilidade celular, se destacando em MOLT-4 o composto **4e** ($IC_{50} = 5,8\mu M$), em K562 o composto **4c** ($IC_{50} = 6,98\mu M$), em T47-D o composto **4c** ($IC_{50} = 11,97\mu M$) e em SKMEL-28 o composto **4c** ($IC_{50} = 5,66\mu M$). Em termos estruturais, esta série possui o núcleo ftalimida conectada a dois núcleos tiazol. Onde o nitrogênio (N) do núcleo tiazol não possui substituição.

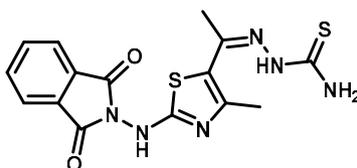
[0094] O índice de seletividade (IS) é um indicador da seletividade do composto, que consiste na razão entre o IC_{50} de células normais e o IC_{50} da célula tumoral, sugerindo potencial uso em testes clínicos, visto que quanto maior for a proporção, maior será a seletividade com células tumorais, ou seja, menor toxicidade em células normais, sugerindo maior seletividade e redução dos efeitos colaterais. O índice de seletividade, segundo Kommera et. al., 2010, preconiza que os compostos serão seletivos quando o $IS > 3$. Assim, o índice de seletividade dos compostos aqui testados frente a MOLT-4 variou de 14,08 a 17,24, em K562 variou de 8,4 a 15,87, em SKMEL-28 apresentou valores de 17,12 e 17,64 e em T47-D 8,35.

[0095] Os ensaios *in vitro* não permitem identificar os efeitos colaterais causados pelos compostos da presente invenção. No entanto, permitiram identificar que os compostos apresentaram índices de seletividade acima dos parâmetros identificados segundo Kommera et. al., 2010, que preconiza que os compostos serão seletivos quando o $IS > 3$. O índice de seletividade dos compostos aqui testados frente a MOLT-4 variou de 14,08 a 17,24, em K562 variou de 8,4 a 15,87, em SKMEL-28 apresentou valores de 17,12 e 17,64 e em T47-D 8,35. Essa seletividade demonstra que os derivados apresentam atividade antineoplásica em doses baixas, o que demonstra uma maior segurança, pois quanto maior for a razão entre o IC_{50} da célula normal dividido pelo IC_{50} da célula tumoral mais o derivado é seletivo frente à célula tumoral, desta forma, menor o efeito tóxico sobre as células não tumorais.

Exemplo 3 – Comprovação estrutural

[0096] A comprovação das estruturas dos compostos foi realizada através das análises espectroscópicas de infravermelho, ^1H RMN e ^{13}C RMN e espectrométrica de EMAR-ESI. Os espectros de infravermelho foram adquiridos em aparelho IFS 66 Bruker, em pastilha de KBr. As análises de ressonância magnética nuclear protônica e de carbono foram efetuadas em um aparelho Bruker AC 300 P, utilizado o DMSO-c4 como solvente. Os espectros de massas foram adquiridos por impacto eletrônico a 70eV registrados em um aparelho HP 5987. As características espectroscópicas e espectrométricas dos derivados 3a-d e 4a-i estão de acordo com as estruturas propostas.

[0097] 2-(1-(2-((1,3-dioxoisindolin-2-il)amino)-4-metiltiazol-5-il)etilideno)hidrazino-1-carbotioamida (3a)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelos claros; PF: 244-245°C; Rend.: 72%.

IV (KBr), principais sinais: 3419.79 (NH_2), 3277.06 (NH), 1714.72 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1} .

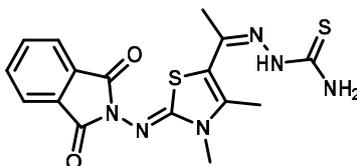
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.25 (s, 3H, CH_3), 2.29 (s, 3H, CH_3), 7.20 (s, 1H, NH_2), 7.91–7.97 (m, 4H, Ar), 8.15 (s, 1H, NH_2), 10.30 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 16.25 (CH_3), 16.99 (CH_3), 123.62 (C-H, Ar), 123.76 (C5, tiazol), 129.48 (C, Ar), 135.16 (C-H, Ar), 135.31 (C4, tiazol), 145.02 ($\text{C}=\text{N}$), 165.12 ($\text{C}=\text{O}$), 166.95 (S-C=N, tiazol), 177.89 (C=S).

Massa: $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 374.0620 g/mol

MS (ESI), m/z: 375.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 373.3 $[\text{M}-\text{H}]^+$

[0098] 2-(1-(2-((1,3-dioxoisindolin-2-il)imino)-3,4-dimetil-2,3-dihidrotiazol-5-il)etilideno)hidrazino-1-carbotioamida (3b)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelos claros; PF: 235-236°C;
Rend.: 95%.

IV (KBr), principais sinais: 3439.08 (NH₂), 3277.06 (NH), 1741.72 (C=O) cm⁻¹.

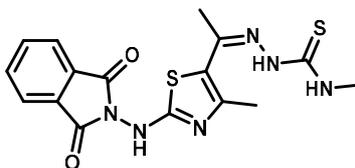
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 2.24 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 3.48 (s, 3H, CH₃), 7.19 (s, 1H, NH₂), 7.83–7.88 (m, 4H, Ar), 8.09 (s, 1H, NH₂), 10.32 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 13.58 (CH₃), 16.65 (CH₃), 31.50 (CH₃), 111.21 (C5, tiazol), 122.99 (C-H, Ar), 130.27 (C, Ar), 134.43 (C-H, Ar), 137.96 (C=N), 143.76 (C4, tiazol), 164.43 (C=O, ftalimida), 170.27 (S-C=N, tiazol), 178.26 (C=S)

Massa: C₁₆H₁₆N₆O₂S₂Exact Mass: 388.0776 g/mol

MS (ESI), m/z: 389.1 [M+H]⁺; 387.2 [M-H]⁺

[0099] 2-(1-(2-((1,3-dioxoisoindolin-2-il)amino)-4-metiltiazol-5-il)etilideno)-N-metilhidrazino-1-carbotioamida (3c)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelos claros; PF: 223-224°C;
Rend.: 84%.

IV (KBr), principais sinais: 3375.43 (NH), 3147.83 (NH), 1735.93 (C=O) cm⁻¹.

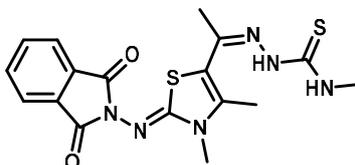
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 2.25 (s, 3H, CH₃), 2.29 (s, 3H, CH₃), 2.94–2.95 (d, J = 4 Hz, 3H, CH₃), 7.82–7.83 (d, J = 4 Hz, 1H, NH), 7.91–7.97 (m, 4H, Ar), 10.22 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 16.44 (CH₃), 17.02 (CH₃), 31.07 (CH₃), 123.61 (C-H, Ar), 123.73 (C5, tiazol), 129.58 (C, Ar), 135.12 (C-H, Ar), 135.24 (C4, tiazol), 144.77 (C=N), 165.09 (C=O), 165.05 (S-C=N, tiazol), 178.16 (C=S).

Massa: C₁₆H₁₆N₆O₂S₂Exact Mass: 388.0776 g/mol

MS (ESI), m/z: 389.1 [M+H]⁺; 387.2 [M-H]⁺

[0100] 2-(1-(2-((1,3-dioxoisoindolin-2-il)imino)-3,4-dimetil-2,3-dihidrotiazol-

5-il)etilideno)-N-metilhidrazino-1-carbotioamida (3d)

Características Físico-Químicas: Cristais amarelos; PF: 169-170°C; Rend.: 58%.

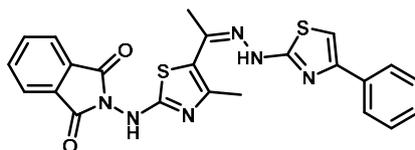
IV (KBr), principais sinais: 1708.93 (C=O) cm^{-1} .

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} : 2.25 (s, 3H, CH_3), 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.89–2.90 (d, $J = 4$ Hz, 3H, CH_3), 3.48 (s, 3H, CH_3), 7.78–7.81 (q, $J = 4$ Hz, 1H, NH), 7.84–7.89 (m, 4H, Ar), 10.22 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} : 13.68 (CH_3), 16.91 (CH_3), 31.16 (CH_3), 31.55 (CH_3), 111.00 (C5, tiazol), 123.04 (C-H, Ar), 130.33 (C, Ar), 134.50 (C-H, Ar), 137.87 (C4, tiazol), 143.91 (C=N), 164.51 (C=O), 170.25 (S-C=N, tiazol), 178.10 (C=S).

Massa: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 402.0933 g/mol

MS (ESI), m/z: 403.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 401.3 $[\text{M}-\text{H}]^+$

[0101] 2-((4-metil-5-(1-(2-(4-feniltiazol-2-il)hidrazono)etil)tiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (4a)

Características Físico-Químicas: Cristais marrons claros; PF: 252-253°C; Rend.: 70%.

IV (KBr), principais sinais: 3136.25 (NH), 2960.73 (NH), 1732.08 (C=O) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} : 2.17 (s, 3H, CH_3), 2.21 (s, 3H, CH_3), 7.13 (s, 1H, tiazol), 7.15–7.20 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, Ar), 7.25–7.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, Ar), 7.70–7.72 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, Ar), 7.84–7.85 (m, 4H, Ar), 8.70 (sl, 1H, NH).

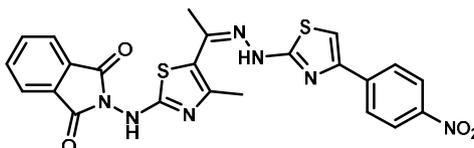
RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} : 33.54 (CH_3), 98.20 (C-H, tiazol), 123.19 (C-H, Ar), 128.87 (C-H, Ar), 129.00 (C-H, Ar), 129.55 (C-H, Ar), 130.13 (C, Ar), 130.17 (C, Ar), 134.65 (C-H, Ar), 140.98 (C, tiazol), 164.58 (S-

C=N, tiazol), 172.30 (C=O).

Massa: C₂₃H₁₈N₆O₂S₂Exact Mass: 474.0933 g/mol

MS (ESI), m/z: 475.2 [M+H]⁺

[0102] 2-((4-metil-5-(1-(2-(4-(4-nitrofenil)tiazol-2-il)hidrazono)etil)tiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (4b)



Características Físico-Químicas: Cristais vermelho escuro; PF: 243-244°C; Rend.: 80%.

IV (KBr), principais sinais: 3331.07 (NH), 1732.08 (C=O) cm⁻¹.

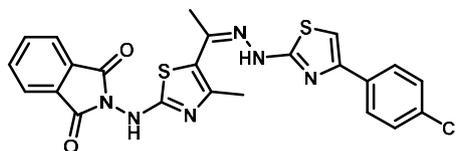
RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 2.29 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 5.33 (sl, 1H, NH), 7.65 (s, 1H, tiazol), 7.92–8.00 (m, 4H, Ar), 8.07–8.10 (d, J = 9 Hz, 2H, Ar), 8.25–8.28 (d, J = 9 Hz, 2H, Ar).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 16.34 (CH₃), 16.69 (CH₃), 108.93 (C-H, tiazol), 123.75 (C-H, Ar), 124.14 (C-H, Ar), 126.31 (C-H, Ar), 129.64 (C, Ar), 135.25 (C-H, Ar), 142.91 (C=N), 146.17 (C4, tiazol), 148.37 (C4, tiazol), 165.06 (C=O), 166.42 (S-C=N, tiazol), 169.72 (S-C=N, tiazol).

Massa: C₂₃H₁₇N₇O₄S₂Exact Mass: 519.0783 g/mol

MS (ESI), m/z: 520.1 [M+H]⁺; 518.3 [M-H]⁺

[0103] 2-((5-(1-(2-(4-(4-clorofenil)tiazol-2-il)hidrazono)etil)-4-metiltiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (4c)



Características Físico-Químicas: Cristais marrons; PF: 250-251°C; Rend.: 85%.

IV (KBr), principais sinais: 3329.14 (NH), 2939.52 (NH), 1726.29 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 7.32 (s, 1H, tiazol), 7.44–7.46 (d, J = 8 Hz, 2H, Ar), 7.84–7.86 (d, J = 8 Hz, 2H,

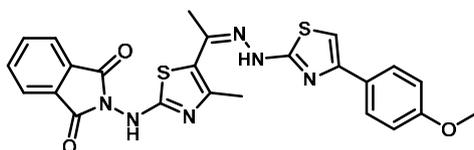
Ar), 7.89–8.03 (m, 4H, Ar), 9.36 (sl, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 16.35 (CH_3), 16.76 (CH_3), 104.62 (C-H, tiazol), 120.23 (C_5 , tiazol), 123.75 (C-H, Ar), 127.11 (C-Cl, Ar), 128.68 (C-H, Ar), 129.65 (C-H, Ar), 131.97 (C, Ar), 133.34 (C_4 , tiazol), 135.18 (C-H, Ar), 143.00 (C=N), 148.63 (C, Ar), 164.99 (C=O), 166.34 (S-C=N, tiazol), 169.47 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{ClN}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 508.0543 g/mol

MS (ESI), m/z: 509.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0104] 2-((5-(1-(2-(4-(4-metoxifenil)tiazol-2-il)hidrazono)etil)-4-metiltiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (4d)



Características Físico-Químicas: Cristais beges; PF: 252-253°C; Rend.: 74%.

IV (KBr), principais sinais: 3124.68 (NH), 2964.59 (NH), 1739.79 (C=O) cm^{-1} .

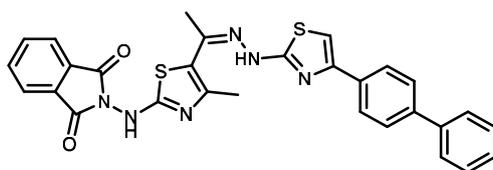
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.28 (s, 3H, CH_3), 2.31 (s, 3H, CH_3), 3.78 (s, 3H, CH_3), 6.95–6.97 (d, J = 8 Hz, 2H, Ar), 7.06 (s, 1H, tiazol), 7.75–7.77 (d, J = 8 Hz, 2H, Ar), 7.93–7.99 (m, 4H, Ar), 10.31 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 16.32 (CH_3), 16.90 (CH_3), 55.13 (CH_3), 101.59 (C-H, tiazol), 114.00 (C-H, Ar), 123.70 (C-H, Ar), 126.84 (C, Ar), 127.14 (C, Ar), 129.59 (C-H, Ar), 135.13 (C-H, Ar), 142.95 (C=N), 165.16 (C=O), 166.25 (S-C=N, tiazol), 169.27 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}_2$ Exact Mass: 504.1038 g/mol

MS (ESI), m/z: 505,1603 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0105] 2-((5-(1-(2-(4-(bifenil-4-il)tiazol-2-il)hidrazono)etil)-4-metiltiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (4e)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelos claros; PF: 264-265°C;

Rend.: 69%.

IV (KBr), principais sinais: 3142.04 (NH), 2970.38 (NH), 1732.08 (C=O) cm^{-1} .

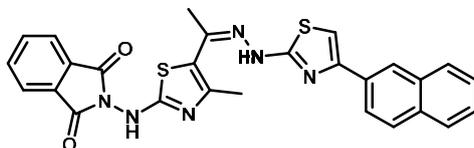
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.30 (s, 3H, CH_3), 2.33 (s, 3H, CH_3), 7.32 (s, 1H, tiazol), 7.34–7.38 (t, J = 8 Hz, 1H, Ar), 7.45–7.49 (t, J = 8 Hz, 2H, Ar), 7.62–7.76 (m, 4H, Ar), 7.87–8.02 (m, 6H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 15.13 (CH_3), 16.33 (CH_3), 104.33 (C-H, tiazol), 120.32 (C_5 , tiazol), 123.72 (C-H, Ar), 126.08 (C-H, Ar), 126.42 (C-H, Ar), 126.73 (C-H, Ar), 127.40 (C, Ar), 127.88 (C, Ar), 128.87 (C, Ar), 128.91 (C-H, Ar), 129.57 (C-H, Ar), 133.35 (C, Ar), 135.23 (C-H, Ar), 139.05 (C_4 , tiazol), 139.60 (C_4 , tiazol), 142.95 (C=N), 165.06 (C=O), 166.38 (S-C=N, tiazol), 169.39 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 550.1246 g/mol

MS (ESI), m/z: 551.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0106] 2-((4-metil-5-(1-(2-(4-(naftalen-2-il)tiazol-2-il)hidrazono)etil)tiazol-2-il)amino)isoindolono-1,3-diona (4f)



Características Físico-Químicas: Cristais marrons claros; PF: 254-256°C;

Rend.: 84%.

IV (KBr), principais sinais: 3147.83 (NH), 2962.66 (NH), 1739.79 (C=O) cm^{-1} .

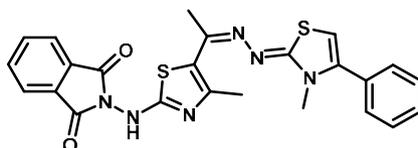
RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 2.30 (s, 3H, CH_3), 2.33 (s, 3H, CH_3), 7.31 (s, 1H, tiazol), 7.36–7.49 (m, 3H, Ar), 7.69–7.72 (m, 3H, Ar), 7.91–7.97 (m, 5H, Ar), 8.18 (s, 1H, NH), 10.33 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 16.30 (CH_3), 16.83 (CH_3), 104.09 (C-H, tiazol), 123.68 (C-H, Ar), 123.72 (C-H, Ar), 126.06 (C-H, Ar), 126.45 (C-H, Ar), 126.83 (C-H, Ar), 127.49 (C-H, Ar), 128.95 (C-H, Ar), 129.62 (C, Ar), 133, 39 (C, Ar), 135.21 (C-H, Ar), 135.55 (C, Ar), 139.09 (C_4 , tiazol), 139.57 (C_4 , tiazol), 142.88 (C=N) 165.04 (C=O), 169.36 (S-C=N, tiazol), 178.28 (S-C=N, tiazol).

Massa: C₂₇H₂₀N₆O₂S₂Exact Mass: 524.1089 g/mol

MS (ESI), m/z: 525.2 [M+H]⁺

[0107] 2-((4-metil-5-(1-((3-metil-4-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazono)etil)tiazol-2-il)amino)isoindolino-1,3-diona (4g)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelo claros; PF: 252-253°C;

Rend.: 99%.

IV (KBr), principais sinais: 3223.05 (NH), 1695.43 (C=O) cm⁻¹.

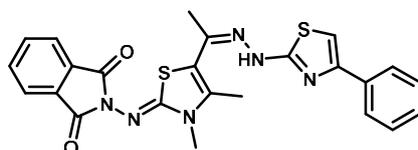
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.38 (s, 3H, CH₃), 3.33 (s, 3H, CH₃), 6.45 (s, 1H, tiazol), 7.49 (m, 5H, Ar), 7.93–8.01 (m, 4H, Ar), 8.25 (sl, 1H, Ar).

RMN de ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 15.79 (CH₃), 16.62 (CH₃), 33.78 (CH₃), 103.43 (C-H, tiazol), 123.67 (C-H, Ar), 123.94 (C-H, Ar), 129.66 (C-H, Ar), 135.18 (C-H, Ar), 136.65 (C, Ar), 138.97 (C4, tiazol), 147.45 (C4, tiazol), 150.26 (C=N), 165.05 (C=O), 166.91 (S-C=N, tiazol), 167.84 (S-C=N, tiazol).

Massa: C₂₄H₂₀N₆O₂S₂Exact Mass: 488.1089 g/mol

MS (ESI), m/z: 489.1 [M+H]⁺; 487.4 [M-H]⁺

[0108] 2-((3,4-dimetil-5-(1-(2-(4-feniltiazol-2-il)hidrazono)etil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (4h)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelos alaranjados; PF: 237-238°C; Rend.: 84%.

IV (KBr), principais sinais: 1712.79 (C=O) cm⁻¹.

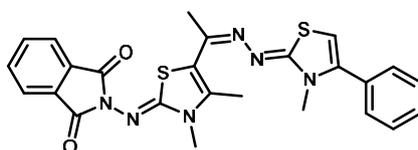
RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃), 3.49 (s, 3H, CH₃), 7.31 (s, 1H, tiazol), 7.36–7.50 (m, 2H, Ar), 7.68–7.72 (m, 3H, Ar), 7.85–7.91 (m, 4H, Ar), 10.29 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} : 13.48 (CH_3), 16.61 (CH_3), 31.59 (CH_3), 104.74 (C-H, tiazol), 111.29 (C_5 , tiazol), 113.92 (C-H, Ar), 123.08 (C-H, Ar), 126.75 (C-H, Ar), 126.95 (C, Ar), 128.75 (C, Ar), 130.15 (C, Ar), 134.60 (C-H, Ar), 136.09 (C_4 , tiazol) 142.18 (C=N), 158.79 (C_4 , tiazol), 164.49 (C=O), 169.05 (S-C=N, tiazol), 170.12 (S-C=N, tiazol).

Massa: $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 488.1089 g/mol

MS (ESI), m/z: 489.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0109] 2-((3,4-dimetil-5-(1-((3-metil-4-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazono)etil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)isoindolino-1,3-diona (4i)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelo escuros; PF: 250-251°C; Rend.: 72%.

IV (KBr), principais sinais: 1708.93 (C=O) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} : 2.38 (s, 3H, CH_3), 2.48 (s, 3H, CH_3), 3.29 (s, 3H, CH_3), 3.50 (s, 3H, CH_3), 6.32 (s, 1H, tiazol), 7.44–7.49 (m, 5H, Ar), 7.85–7.91 (m, 4H, Ar).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} : 33.54 (CH_3), 98.20 (C-H, tiazol), 123.19 (C-H, Ar), 128.87 (C-H, Ar), 129.00 (C-H, Ar), 129.55 (C-H, Ar), 130.13 (C, Ar), 130.17 (C, Ar), 134.65 (C-H, Ar), 140.98 (C, tiazol), 164.58 (S-C=N, tiazol), 172.30 (C=O).

Massa: $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ Exact Mass: 502.1246 g/mol

MS (ESI), m/z: 503.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Exemplo 4 – Testes *in vivo*

[0110] No ensaio de migração, utilizando o método de *Wound Healing*, o composto AM1b na concentração do IC_{50} não inibiu a migração celular na linhagem de melanoma maligno (SK-MEL-28), em comparação com o Não Tratado (NT) e o DMSO 0,1% nos tempos 6, 12 e 24h. Enquanto o composto AM1f na concentração do IC_{25} no tempo de 24 horas mostrou reduzir a motilidade

celular, porém não interferiu significativamente a migração ($p=0,2460$).

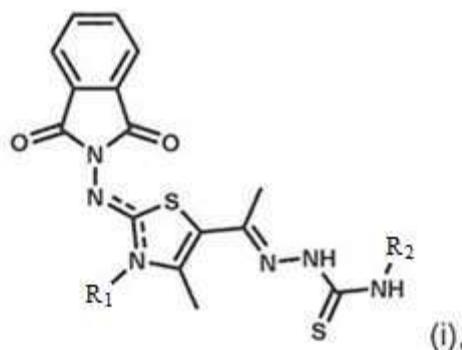
[0111] Observou-se que o composto AM1b apresentou uma resposta mais precoce e o AM1f mais tardia, onde no tempo de 24h o AM1b reduziu significativamente o número de colônias ($p=0,0286$) e o AM1f demonstrou no limite da significância uma redução na formação de colônias ($p=0,0571$), ambos em relação ao DMSO 0,1%. Já no tempo de 48h o composto AM1f reduziu significativamente as colônias ($p=0,0101$), em relação a capacidade da formação colônias de células de Melanoma Maligno (SKMEL-28). Realizado através do ensaio clonogênico, para determinação da habilidade de divisão e proliferação em comparação com o controle.

[0112] Na citometria de fluxo, buscou-se do mesmo modo analisar a ação dos compostos AM1b e AM1f no ciclo celular, baseado nos valores obtidos no IC_{50} . Os dois compostos foram testados em SKMEL-28, o AM1b foi avaliado em K562 e o AM1f em MOLT-4. Pode observar que ambos promoveram arraste celular na fase G0/G1 nas linhagens, porém não obtiveram resultados estatisticamente significativos. O composto AM1f influenciou na redução significativa de células marcadas para necrose e apoptose tardia em K562, enquanto o composto AM1b influenciou na redução da marcação de células Duplamente Marcadas do tempo 24h para 48h. Os compostos AM1b em MOLT-4 e SK-MEL-28 & AM1f em K562 e SK-MEL-28 na concentração de $10\mu M$ promoveram o arraste celular na fase G0/G1, de forma não significativa.

[0113] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes e alternativas, abrangidas pelo escopo das reivindicações a seguir.

Reivindicações

1. Agente bioativo, **caracterizado por** ser de ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas e ter fórmula:



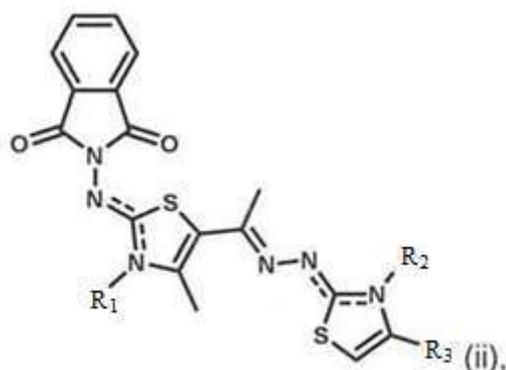
em que R₁ e R₂ são permutados entre hidrogênio e metila.

2. Agente bioativo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** apresentar IC₅₀ = 5,8μM para a linhagem tumoral Leucemia Linfoblástica Aguda.

3. Composição, **caracterizado por** compreender o agente bioativo ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 2.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado por** compreender adicionalmente um meio de cultura apropriado para cada célula, soro fetal bovino e DMSO e por apresentar atividade antineoplásica e/ou atividade antiproliferativa.

5. Agente bioativo, **caracterizado por** ser de ftalimido-*bis*-tiazóis e ter fórmula:



em que R_1 e R_2 são permutados entre hidrogênio e metila e R_3 é selecionado entre o grupo que compreende: Fenil, 4-MeO-Fenil, 4-Cl-Fenil, 4- NO_2 -Fenil, 4-Bifenil e 2-Naftil.

6. Agente bioativo, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado por** apresentar ter fórmula (ii) com R_1 e R_2 sendo H e R_3 4-Cl-Fenil, e apresentar $\text{IC}_{50} = 6,98\mu\text{M}$ para a linhagem tumoral Leucemia Micelogênica Crônica, apresentar $\text{IC}_{50} = 11,97\mu\text{M}$ para a linhagem tumoral Carcino Ductal de Mama e apresentar $\text{IC}_{50} = 5,66\mu\text{M}$ para a linhagem tumoral Malanoma Maligno.

7. Agente bioativo, de acordo a reivindicação 5, **caracterizado por** ter fórmula (ii) com R_1 e R_2 sendo H e R_3 4-Fenil-Fenil, e apresentar $\text{IC}_{50} = 5,8\mu\text{M}$ para a linhagem tumoral Leucemia Linfoblástica Aguda.

8. Composição, **caracterizado por** compreender o agente bioativo ftalimido-*bis*-tiazóis, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 5 a 7.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** compreender adicionalmente um meio de cultura apropriado para cada célula, soro fetal bovino e DMSO e por apresentar atividade antineoplásica e/ou atividade antiproliferativa.

10. Processo de obtenção dos agentes bioativos de derivados ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas e ftalimido-*bis*-tiazóis, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado por** compreender as etapas de:

- (i) preparo das ftalimido-tiossemicarbazidas;
- (ii) preparo dos intermediários ftalimido-5-acetil-tiazóis;
- (iii) preparo dos derivados ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas;
- (iv) preparo dos derivados ftalimido-*bis*-tiazóis.

11. Processo de obtenção de ftalimido-tiossemicarbazidas, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado por** compreender as etapas de:

(i) reação de 20-40 mmol de anidrido ftálico com 20-40 mmol de tiossemicarbazida ou 20-40 mmol de 4-metil-3-tiossemicarbazida, utilizando 5-10 mL (ou 100-200 gotas) de *N,N*-dimetilformamida como solvente sob refluxo por 2 a 4 horas;

- (ii) resfriamento até temperatura ambiente;
- (iii) precipitação devido à adição de água destilada;
- (iv) purificação através da dissolução em propanona, seguida de filtração.

12. Processo de obtenção de intermediários ftalimido-5-acetil-tiazóis, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado por** compreender as etapas de:

- (i) mistura de 1-4 mmol da respectiva ftalimido-tiossemicarbazida em 10-20 mL (200-400 gotas) de propanona;
- (ii) adição de 2,0-4,0 mL (40-80 gotas) de 3-cloro-2,4-pentanodiona (1-4 mmol) e permanência em agitação magnética e refluxo por 90-180 minutos;
- (iii) formação de precipitado, seguida de filtração.

13. Processo de obtenção de derivados ftalimido-tiazol-tiossemicarbazidas, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado por** compreender as etapas de:

- (i) mistura de 1-4 mmol do respectivo ftalimido-5-acetil-tiazol em 10-20 mL (200-400 gotas) de etanol;
- (ii) adição de 5-10 gotas de ácido sulfúrico e percurso de 30-60 minutos em ultrassom (40 MHz);
- (iii) adição de 1-4 mmol de tiossemicarbazida ou 1-4 mmol de 4-metil-3-tiossemicarbazida;
- (iv) permanência de 3-6 horas em ultrassom, com formação de

precipitado, seguida de filtração.

14. Processo de obtenção de derivados de ftalimido-*bis*-tiazóis, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado por** compreender as etapas de:

(i) mistura de 1-4 mmol da respectiva ftalimido-tiazol-tiossemicarbazona em 10-20 mL (200-400 gotas) de 2-propanol;

(ii) adição de 1-4mmol da respectiva α -halo-acetofenona;

(iii) banho de ultrassom (40 MHz), por 4-6 horas a temperatura ambiente;

(iv) formação de precipitado, seguida de filtração e lavagem com 2-propanol.

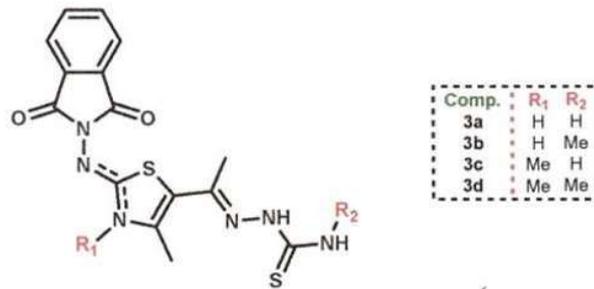
15. Uso do agente bioativo de ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas, conforme definido em qualquer umas reivindicações 1 a 2, **caracterizado por** ser para preparar um medicamento para tratar o câncer.

16. Uso do agente bioativo de ftalimido-*bis*-tiazóis, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 5 a 7, **caracterizado por** ser para preparar um medicamento para tratar o câncer.

17. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 16, **caracterizado pelo** câncer ser selecionado entre as linhagens: Leucemia Linfoblástica Aguda, Linfome de Não-Hodgkin de Células B, Leucemia de Promielocítica Aguda, Leucemia Promielocítica Aguda Resistente, Leucemia Micelogênica Crônica, Adenocarcinoma de Mama, Carcino Ductal de Mama e Malanoma Maligno.

Figuras 1- 6

(i)



(ii)

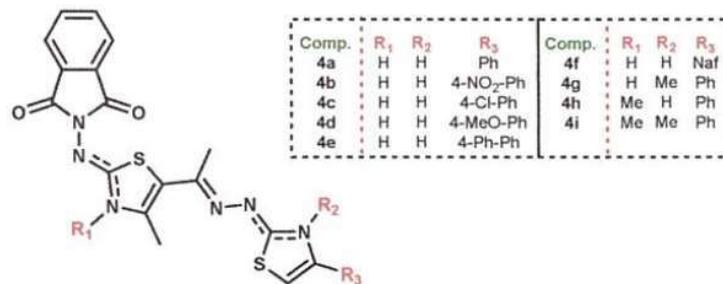


Figura 1

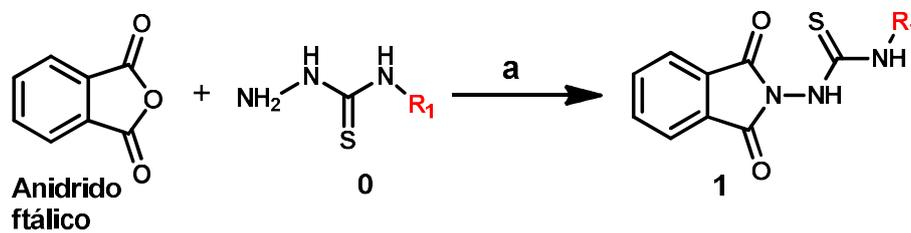


Figura 2

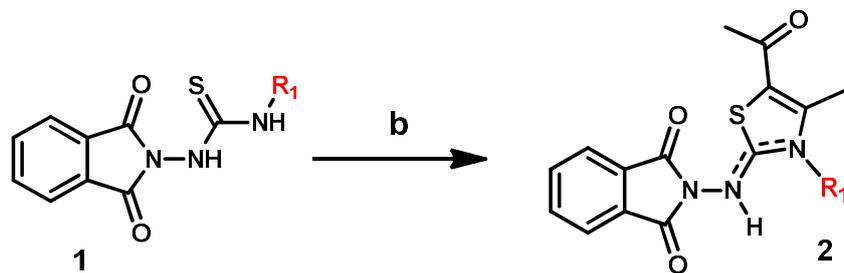


Figura 3

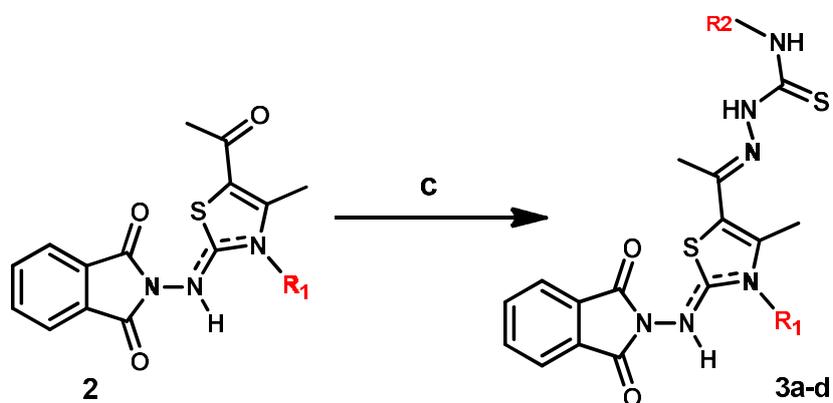


Figura 4

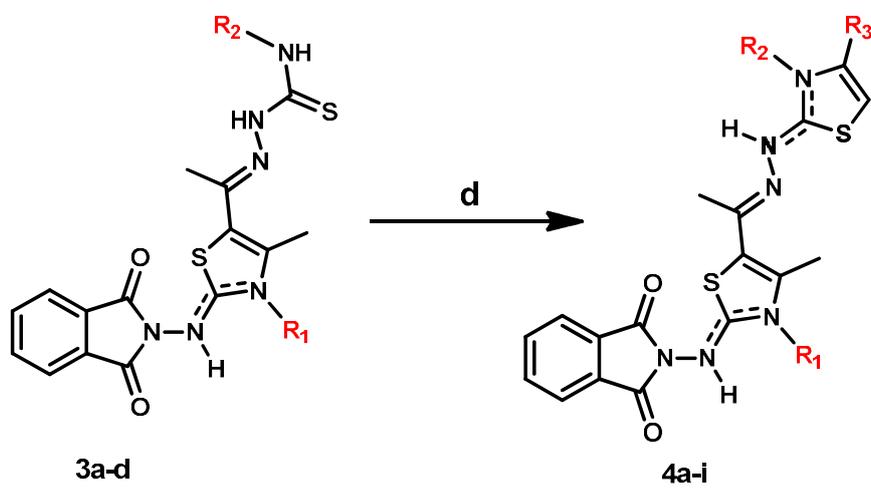


Figura 5

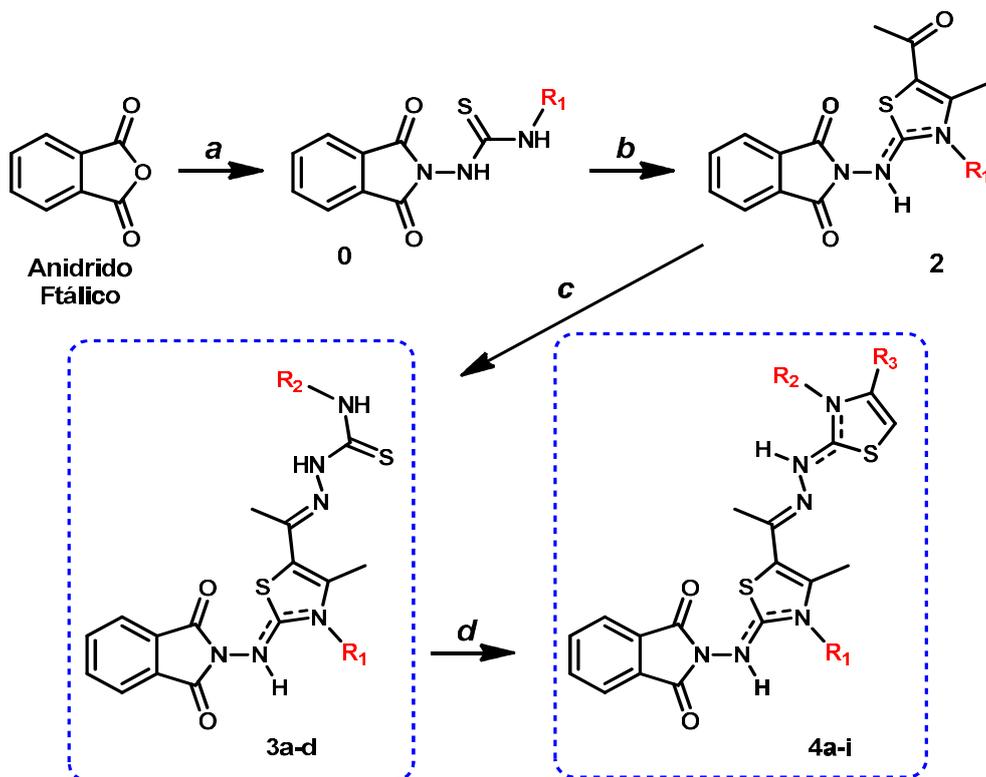


Figura 6

Resumo**AGENTES BIOATIVOS, COMPOSIÇÕES, PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS
AGENTES BIOATIVOS E USOS**

A presente invenção apresenta a identificação de novos agentes bioativos com atividade antineoplásica. Mais especificamente, a presente invenção é composta por moléculas que possuem em sua estrutura ftalimido-tiazóis-tiossemicarbazonas ou ftalimido-*bis*-tiazóis, apresentam ação antiproliferativa frente às linhagens tumorais, além do processo de obtenção dos ditos compostos e seu uso para o tratamento de células tumorais. A presente invenção se situa nos campos da Medicina, Farmácia e Bioquímica.