



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* PT 773782 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A61K031/415 A

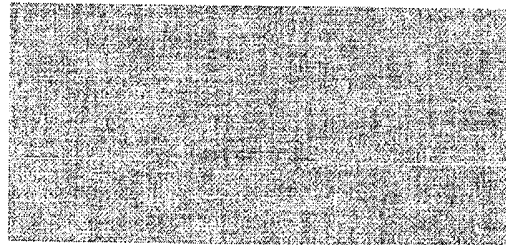
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1996.04.23	(73) <i>Titular(es):</i> PHARMACIA ITALIA S.P.A. VIA ROBERT KOCH 1.2 MILÃO	IT
(30) <i>Prioridade:</i> 1995.05.16 GB 9509888		
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1997.05.21	(72) <i>Inventor(es):</i> MARINA CIOMEI CARLO BATTISTINI FRANCESCO PIETRA MICHELE D'AMBROSIO ANTONIO GUERRIERO	IT IT IT IT IT
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.03.14	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA	PT

(54) *Epígrafe:* DERIVADOS TERPENOIDICOS (SARCODICTIINAS) ÚTEIS COMO AGENTES ANTITUMOR

(57) *Resumo:*

DERIVADOS TERPENOIDICOS (SARCODICTINAS) ÚTEIS COMO AGENTES ANTITUMOR



ZS

Descrição

“Derivados terpenoidicos (Sarcodictiinas) úteis como agentes antitumor”

A presente invenção diz respeito a derivados terpenoidicos conhecidos na técnica como Sarcodictiinas (Helvetica Chimica Acta Vol. 70, 1987, 2019-2027 e Helvetica Chimica Acta, Vol. 71, 1988, 964-976), os quais podem ser utilizados como agentes terapêuticos.

Uma aplicação terapêutica possível das sarcodictiinas mencionadas no presente pedido de patente de invenção não foi referida anteriormente.

Em particular, de acordo com a presente invenção, as sarcodictiinas, tendo em conta a sua actividade citotóxica, podem ser úteis como agentes terapêuticos antineoplásicos no tratamento de cancros em seres humanos ou animais.

Por consequência, a presente invenção refere-se a um composto escolhido de entre o grupo que consiste em:

(E)-3-(1-Metil-1H-imidazol-4-il)-acrilato de (-)-(4R, 4aR, 7R, 10S, 11S, 12aR, 1Z, 5E, 8Z)-7,10-epoxi-3, 4, 4a, 7, 10, 11, 12, 12a-octa-hidro-7-hidroxi-6-(metoxicarbonil)-1,10-dimetil-4-(1-metiletil)-benzo-ciclodecen-11-ilo (Sarcodictiina A);

(E)-3-(1-Metil-1H-imidazol-4-il)-acrilato de (-)-(4R, 4aR, 7R, 10S, 11S, 12aR, 1Z, 5E, 8Z)-7,10-epoxi-6-(etoxicarbonil)-3, 4, 4a, 7, 10, 11, 12, 12a-octa-hidro-7-hidroxi-1,10-dimetil-4-(1-metiletil)-benzo-ciclodecen-11-ilo (Sarcodictiina B);

(E)-3-(1-Metil-1H-imidazol-4-il)-acrilato de (-)-(3R, 4S, 4aS, 7S, 10R, 11R, 12aS, 1Z, 5E, 8Z)-7,10-epoxi-3, 4, 4a, 7, 10, 11, 12, 12a-octa-hidro-3,7-di-hidroxi-6-(metoxicarbonil)-1,10-dimetil-4-(1-metiletil)-benzo-ciclodecen-11-ilo (Sarcodictiina C);

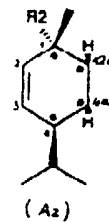
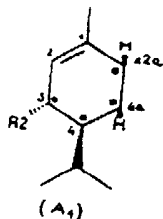
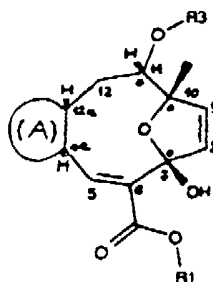
(E)-3-(1-Metil-1H-imidazol-4-il)-acrilato de (-)-(3R, 4S, 4aS, 7S, 10R, 11R, 12aS, 1Z, 5E, 8Z)-3-acetoxi-7,10-epoxi-3, 4, 4a, 7, 10, 11, 12, 12a-octa-hidro-7-hidroxi-6-(metoxicarbonil)-1,10-dimetil-4-(1-metiletil)-benzo-ciclododecen-11-ilo (Sarcodictina D);

(Z)-3-(1-Metil-1H-imidazol-4-il)-acrilato de (+)-(3R, 4S, 4aS, 7S, 10R, 11R, 12aS, 1Z, 5E, 8Z)-7,10-epoxi-3, 4, 4a, 7, 10, 11, 12, 12a-octa-hidro-3,7-di-hidroxi-6-(metoxicarbonil)-1,10-dimetil-4-(1-metiletil)-benzo-ciclododecen-11-ilo (Sarcodictina E);

(E)-3-(1-Metil-1H-imidazol-4-il)-acrilato de (+)-(1R, 4R, 4aR, 7R, 10S, 11S, 12aR, 2Z, 5E, 8Z)-7,10-epoxi-1, 4, 4a, 7, 10, 11, 12, 12a-octa-hidro-1,7-di-hidroxi-6-(metoxicarbonil)-1,10-dimetil-4-(1-metiletil)-benzo-ciclododecen-11-ilo (Sarcodictina F);

para utilização como agente terapêutico.

As fórmulas de estrutura dos compostos indicados anteriormente encontram-se indicadas no Quadro 1 abaixo com referência às fórmulas seguintes:



Nas fórmulas anteriores o símbolo * representa um centro de quiralidade.

Quadro 1

COMPOSTO	(A)	R ₁	R ₂	R ₃
Sarcodictiina A	(A ₁)	Me	H	(E)u
Sarcodictiina B	(A ₁)	Et	H	(E)u
Sarcodictiina C	(A ₁)	Me	OH	(E)u
Sarcodictiina D	(A ₁)	Me	OAC	(E)u
Sarcodictiina E	(A ₁)	Me	OH	(Z)u
Sarcodictiina F	(A ₂)	Me	OH	(E)u

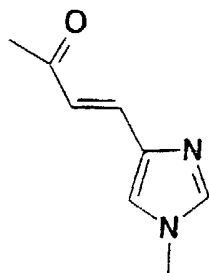
No Quadro 1 anterior :

o símbolo Me significa metilo;

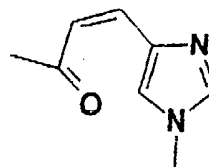
o símbolo Et significa etilo;

o símbolo OAc significa OCOCH₃,

os símbolos (E)u e (Z)u representam, cada um, respectivamente, o radical urocanoílo (E) e (Z) de fórmula



(E) urocanoílo



(Z) urocanoílo

Em particular, as Sarcodictiinas A a F referidas anteriormente podem ser úteis como agentes terapêuticos no tratamento de cancros em seres humanos ou animais em virtude da sua actividade citotóxica antitumor. O cancro pode ser escolhido de entre sarcomas, carcinomas, linfomas, neuroblastomas, melanomas, mielomas, tumor de Wilms, leucemias e adenocarcinomas.

As Sarcodictiinas de acordo com a presente invenção podem ser obtidas mediante isolamento a partir de Mediterranean Stoloniferan Coral "Sarcodictyon Roseum" (Rolandia rosea) (Forbes 1847) de acordo com o método referido em Helvetica Chimica Acta Vol. 70, 1987, pag. 2025.

A actividade biológica das Sarcodictiinas de acordo com a presente invenção foi demonstrada por (a) ensaio "in vitro" para avaliar a sua actividade na promoção da associação da tubulina e (b) ensaio "in vitro" para avaliar a sua actividade citotóxica tanto sobre células L 1210 como sobre células L 1210 resistentes à Doxorubicina (L 1210/Dx).

Como exemplo, avaliou-se a actividade da Sarcodictiina A (código interno FCE 29123) e da Sarcodictiina C (código interno FCE 29119) de acordo com os métodos descritos nos ensaios (a) e (b).

(a) Ensaio da associação da tubulina

Preparou-se tubulina de cérebro de vitela por meio de dois ciclos de associação-desassociação (Shelanski M. L., Gaskin F. e Cantor C. R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 765-768, 1973 e guardaram-se em azoto líquido em MAB (0,1 M MES, 2,5 mM EGTA, 0,5 mM MgSO₄, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, pH 6,4).

Realizaram-se todas as experiências sobre proteína armazenada durante menos de 4 semanas.

Antes de cada experiência, manteve-se a tubulina durante 30 minutos à temperatura de 4°C. Controlou-se a associação pelo método de Gaskin et al. (Gaskin F. Cantor C. R. e Shelanski M. L., J. Molec. Biol. 89, 737-758, 1974).

Aqueceu-se a cubeta (comprimento de 1 cm) contendo tubulina (1 mg/ml) e 1 mM GTP a 37°C e realizaram-se medições contínuas da turvação a 340 nm num

espectrofotômetro de feixe duplo de comprimento duplo Perkin-Elmer 557 equipado com um registrador automático e uma câmara de amostras regulada termostaticamente.

Decorridos 30 minutos, adicionou-se 4 mM CaCl_2 e mediu-se a despolimerização durante 10 minutos à medida que teve lugar o decréscimo da turvação.

A intervalos regulares de 15 minutos adicionou-se doses controladas dos compostos em estudo e seguiram-se as variações da turvação.

Exprimiram-se os resultados como percentagem da repolimerização induzida pelos compostos em estudo.

Os resultados obtidos encontram-se reunidos no Quadro 2

Quadro 2

COMPOSTO	Dosagem (μM)	Associação de tubulina (%)
Sarcodictiina A (FCE 29123)	4 40	70 162
Sarcodictiina C (FCE 29119)	3,9 39	112 173

Os resultados indicados anteriormente mostram claramente que as Sarcodictiinas ensaiadas são susceptíveis de promover a repolimerização da tubulina mesmo na presença de CaCl_2 que inibe habitualmente a associação da tubulina.

Como é bem conhecido na técnica, os microtubulos encontram-se entre os alvos subcelulares mais estratégicos da quimioterapia anticancro (Rowinsky et al., Review, Vol. 82, Nº. 15, 1 de Agosto de 1990).

Pelo contrário, os agentes clássicos antimicrotubulos tais como a colchicina e os alcaloides de vinca que induzem a despolimerização dos microtubulos, as

Sarcodictiinas parecem possuir um mecanismo de acção semelhante ao do Taxol, um dos agentes anticâncer mais interessantes que emergiram da desmistagem dos produtos naturais pela indução da polimerização da tubulina e formação de microtubulos não funcionais e extremamente estáveis.

As Sarcodictiinas podem, por consequência, ser úteis como agentes antineoplásicos terapêuticos no tratamento de cânceros em seres humanos ou em animais, tendo em conta a sua capacidade para catalisar a formação rápida de microtubulos e a estabilização que provoca a suspensão de divisão celular nas células do tumor.

(b) Culturas de células e ensaio da sensibilidade ao fármaco

Desenvolveram-se linhas celulares de leucemia murina L1210 e L1210/DX (resistentes à Doxorubicina) in vitro como uma cultura de suspensão estacionária em meio RPMI 1640 (GIBCO, Grand island, NY) complementado com 10% de soro fetal de vitela (Flow, Irvine, UK), 2 mM L-glutamina (Gibco Europe, Glasgow, IK), 10 μ M β -mercaptoetanol, 100 Unidades/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomina.

Semearam-se células de crescimento exponencial (1×10^5 cel/ml) em placas com 12 cavidades (Costar, Cambridge, MA) e, imediatamente após a sementeira, adicionaram-se diversas concentrações dos compostos em estudo.

Incubaram-se as placas à temperatura de 37°C sob uma atmosfera humidificada com 5% de CO₂ durante 48 horas.

Avaliou-se a inibição do crescimento celular mediante contagem das células sobreviventes em um ZBI Coulter Counter (Hialeah, FL). Calculou-se a

concentração inibidora 50% (CI₅₀) sobre a curva derivada de concentração-resposta.

Para cada concentração de composto em estudo utilizaram-se culturas duplicadas.

Os resultados obtidos encontram-se indicados no Quadro 3.

Quadro 3

Composto	DI ₅₀ (nM)*		I.R.
	L1210	L1210/DX	
Sarcodictiina A (FCE 29123)	539,2 ± 97,7	754,5 ± 80,3	1,4
Sarcodictiina C (FCE 29119)	408,5 ± 21,3	5787,0 ± 182,6	14,2

* 48 h de tratamento

$$\text{I.R.} = \text{Índice de resistência} = \frac{\text{DI}_{50} \text{ L1210/DX}}{\text{DI}_{50} \text{ L1210}}$$

Como é evidente dos resultados indicados anteriormente, as Sarcodictiinas exibem uma boa actividade citotóxica “in vitro” tanto sobre células L1210 como L1210 resistentes à Doxorubicina (L1210/Dx).

Tendo em vista a sua eficácia sobre as células L 1210/DX, as Sarcodictiinas podem ser úteis no tratamento de um tumor resistente a um agente quimioterapêutico, tal como, por exemplo, um glicosido antraciclínico, em particular a Doxorubina.

Um ser humano ou um animal pode ser tratado por um método que compreende a administração ao mesmo de uma quantidade eficaz sob o ponto de vista farmacêutico de um composto escolhido de entre Sarcodictiina A, Sarcodictiina B, Sarcodictiina C, Sarcodictiina D, Sarcodictiina E e Sarcodictiina F.

O estado do ser humano ou do animal pode ser assim melhorado.

As Sarcodictiinas de acordo com a presente invenção podem ser administradas em uma variedade de formas de dosagem, por exemplo por via oral, sob a forma de comprimidos, cápsulas, comprimidos revestidos com açúcar ou com película, soluções ou suspensões líquidas; por via reactual sob a forma de

supositórios; por via parentérica, por exemplo, por via intramuscular, ou por injeção ou infusão intravenosa.

A dosagem depende da idade, do peso, do estado do paciente e da via de administração; por exemplo, a dosagem adoptada para a administração por via oral a seres humanos adultos, por exemplo, para o composto representativo de acordo com a presente invenção FCE 29213 (Sarcodictiina A) pode variar entre cerca de 0,01 g e cerca de 1 g por dia.

A invenção inclui também composições farmacêuticas que compreendem uma Sarcodictiina de acordo com a presente invenção como princípio activo em associação com um excipiente aceitável sob o ponto de vista farmacêutico (que pode ser um veículo ou um diluente).

As composições farmacêuticas que contêm os compostos de acordo com a presente invenção são preparados habitualmente seguindo métodos convencionais e são administradas em uma forma apropriada sob o ponto de vista farmacêutico.

Por exemplo, as formas sólidas orais podem conter, conjuntamente com o composto activo, diluentes, por exemplo, lactose, dextrose, sacarose, celulose, amido de milho ou amido de batata; lubrificantes, por exemplo sílica, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio ou de cálcio e/ou polietileno-glicóis; agentes ligantes, por exemplo um amido, gomas arábicas, gelatina, metilcelulose, carboximetilcelulose ou polivinil-pirrolidona; agentes desagregantes, por exemplo o amido, ácido alginico, alginatos ou glicolato de amido e sódio; misturas efervescentes; corantes; edulcorantes; agentes molhantes tais como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; e, em geral, substâncias inactivas farmacologicamente e não tóxicas utilizadas em formulações farmacêuticas.

As referidas preparações farmacêuticas podem ser preparadas por uma maneira conhecida, por exemplo mediante processos de mistura, granulação, formação de comprimidos, revestimento com açúcar ou revestimento com película.

As dispersões líquidas para administração por via oral podem ser, por exemplo, xaropes, emulsões e suspensões.

Os xaropes podem conter, como veículo, por exemplo, sacarose ou sacarose com glicerina e/ou manitol e/ou sorbitol.

As suspensões e as emulsões podem conter como veículo, por exemplo, uma goma natural, agar, alginato de sódio, pectina, metilcelulose, carboximetilcelulose ou álcool polivinílico.

A suspensão ou solução para injeções intramusculares pode conter, por exemplo, conjuntamente com o composto activo, um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, por exemplo, água estéril, azeite, oleato de etilo, glicóis, por exemplo propileno-glicol e, se se desejar, uma quantidade apropriada de cloridrato de lidocaína.

As soluções para injeções ou infusão intravenosa podem conter, como veículo, por exemplo, água estéril ou, de preferência, podem apresentar-se sob a forma de soluções de soro fisiológico estéril, aquosas isotónicas.

Os supositórios podem conter conjuntamente com o composto activo um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico e, por exemplo, manteiga de cacau, polietileno-glicol, um agente tensioactivo de éster de ácido gordo de polioxietileno-sorbitano ou lecitina.

Lisboa, 23 de Maio de 2001

José de Sampaio
O Agente Oficial do Propriedade Industrial

JOSÉ DE SAMPAIO
A.G.R.I.
Rua do Sautro, 191, 1.º-Dr.
1239-023 LISBOA

Reivindicações

1. Composto escolhido de entre o grupo que consiste em:

(E)-3-(1-Metil-1H-imidazol-4-il)-acrilato de (-)-(4R, 4aR, 7R, 10S, 11S, 12aR, 1Z, 5E, 8Z)-7,10-epoxi-3, 4, 4a, 7, 10, 11, 12, 12a-octa-hidro-7-hidroxi-6-(metoxicarbonil)-1,10-dimetil-4-(1-metiletil)-benzo-ciclodecen-11-ilo (Sarcodictiina A);

(E)-3-(1-Metil-1H-imidazol-4-il)-acrilato de (-)-(4R, 4aR, 7R, 10S, 11S, 12aR, 1Z, 5E, 8Z)-7,10-epoxi-6-(etoxicarbonil)-3, 4, 4a, 7, 10, 11, 12, 12a-octa-hidro-7-hidroxi-1,10-dimetil-4-(1-metiletil)-benzo-ciclodecen-11-ilo (Sarcodictiina B);

(E)-3-(1-Metil-1H-imidazol-4-il)-acrilato de (-)-(3R, 4S, 4aS, 7S, 10R, 11R, 12aS, 1Z, 5E, 8Z)-7,10-epoxi-3, 4, 4a, 7, 10, 11, 12, 12a-octa-hidro-3,7-di-hidroxi-6-(metoxicarbonil)-1,10-dimetil-4-(1-metiletil)-benzo-ciclodecen-11-ilo (Sarcodictiina C);

(E)-3-(1-Metil-1H-imidazol-4-il)-acrilato de (-)-(3R, 4S, 4aS, 7S, 10R, 11R, 12aS, 1Z, 5E, 8Z)-3-acetoxi-7,10-epoxi-3, 4, 4a, 7, 10, 11, 12, 12a-octa-hidro-7-hidroxi-6-(metoxicarbonil)-1,10-dimetil-4-(1-metiletil)-benzo-ciclodecen-11-ilo (Sarcodictiina D);

(Z)-3-(1-Metil-1H-imidazol-4-il)-acrilato de (+)-(3R, 4S, 4aS, 7S, 10R, 11R, 12aS, 1Z, 5E, 8Z)-7,10-epoxi-3, 4, 4a, 7, 10, 11, 12, 12a-octa-hidro-3,7-di-hidroxi-6-(metoxicarbonil)-1,10-dimetil-4-(1-metiletil)-benzo-ciclodecen-11-ilo (Sarcodictiina E);

(E)-3-(1-Metil-1H-imidazol-4-il)-acrilato de (+)-(1R, 4R, 4aR, 7R, 10S, 11S, 12aR, 2Z, 5E, 8Z)-7,10-epoxi-1, 4, 4a, 7, 10, 11, 12, 12a-octa-hidro-1,7-di-hidroxi-6-(metoxicarbonil)-1,10-dimetil-4-(1-metiletil)-benzo-ciclodecen-11-ilo (Sarcodictiina F);

para utilização como agente terapêutico.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, para utilização como acelerador da associação de tubulina que provoca a suspensão da divisão celular em células de tumor.

3. Composto de acordo com a reivindicação 1, para utilização como agente antitumor.

4. Composto de acordo com a reivindicação 1, para utilização no tratamento de um tumor resistente a um agente quimioterapêutico.

5. Composto de acordo com a reivindicação 4 em que o agente quimioterapêutico é um glicosido antraciclínico.

6. Composto de acordo com a reivindicação 5 em que o glicosido antraciclínico é a Doxorubicina.

7. Utilização de um composto de acordo com a reivindicação 1, na preparação de um medicamento para utilização como agente terapêutico antineoplásico no tratamento de câncros em seres humanos ou em animais.


8. Composição farmacêutica que compreende, como ingrediente ativo, um composto de acordo com a reivindicação 1 e um veículo e/ou diluente aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

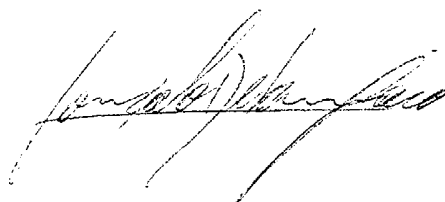
9. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 8, para utilização como um acelerador da associação de tubulina que provoca a suspensão da divisão celular nas células de tumor.

10. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 8, para utilização como agente terapêutico antineoplásico no tratamento de câncros em seres humanos ou em animais.

11. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 8, para utilização no tratamento de tumores resistentes a agentes quimioterapêuticos.
12. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que o agente quimioterapêutico é um glicosido antraciclínico.
13. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 12, em que o glicosido antraciclínico é a Doxorubicina.

Lisboa, 23 de Maio de 2001

 O Agente Oficial do Proprietário Industrial



JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua da Restauração, 100
1050-100 Lisboa