

(11) Número de Publicação: **PT 2152676 E**

(51) Classificação Internacional:

C07D 251/18 (2013.01) **C07D 251/70** (2013.01)
A61K 31/53 (2013.01) **A61P 35/00** (2013.01)
A61P 37/00 (2013.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2008.04.25**

(30) Prioridade(s): **2007.04.30 US 924111 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2010.02.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.04.03**
118/2013

(73) Titular(es):

PROMETIC BIOSCIENCES INC.
531, BOULEVARD DES PRAIRIES, ÉDIFICE 15
LAVAL (QUEBEC) H7V 1B7 **CA**

(72) Inventor(es):

CHRISTOPHER PENNEY **CA**
BOULOS ZACHARIE **CA**
LYNE GAGNON **CA**
LILIANNE GEERTS **CA**
BRIGITTE GROUX **CA**

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **DERIVADOS DE TRIAZINA, COMPOSIÇÕES CONTENDO TAIS DERIVADOS, E MÉTODOS DE TRATAMENTO DO CANCRO E DE DOENÇAS AUTOIMUNES USANDO TAIS DERIVADOS**

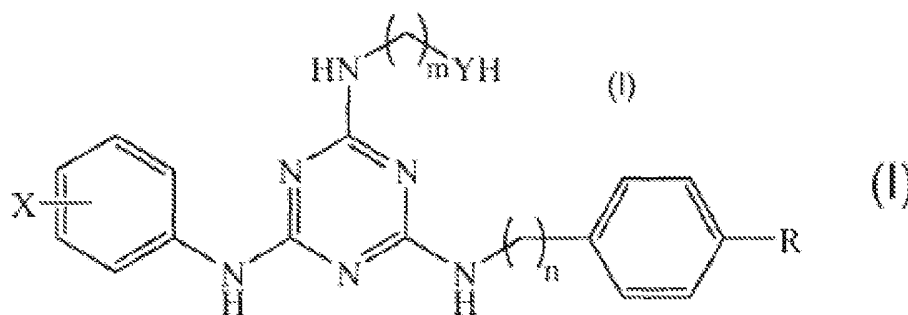
(57) Resumo:

DESCREVEMOS COMPOSTOS DA FÓRMULA GERAL (I) SEGUINTE: EM QUE X É FLÚOR OU CLORO; Y É OXIGÉNIO, ENXOFRE, OU UM GRUPO AMINO; R É UM GRUPO AMINO, HIDROXILO, SULFONAMIDA, OU CARBOXAMIDA OU UM SEU ANÁLOGO DE N-MONOMETILO OU N-DIMETILO; M É UM NÚMERO INTEIRO DE 2 A 6, E N É UM NÚMERO INTEIRO DE 0 A 2. OS COMPOSTOS PODEM SER USADOS PARA O TRATAMENTO DE CERTOS CANCROS E DOENÇAS AUTOIMUNES.

RESUMO

"DERIVADOS DE TRIAZINA, COMPOSIÇÕES CONTENDO TAIS DERIVADOS, E MÉTODOS DE TRATAMENTO DO CANCRO E DE DOENÇAS AUTOIMUNES USANDO TAIS DERIVADOS"

Descrevemos compostos da fórmula geral (I) seguinte: em que X é flúor ou cloro; Y é oxigénio, enxofre, ou um grupo amino; R é um grupo amino, hidroxilo, sulfonamida, ou carboxamida ou um seu análogo de N-monometilo ou N-dimetilo; m é um número inteiro de 2 a 6, e n é um número inteiro de 0 a 2. Os compostos podem ser usados para o tratamento de certos cancros e doenças autoimunes.



DESCRIÇÃO

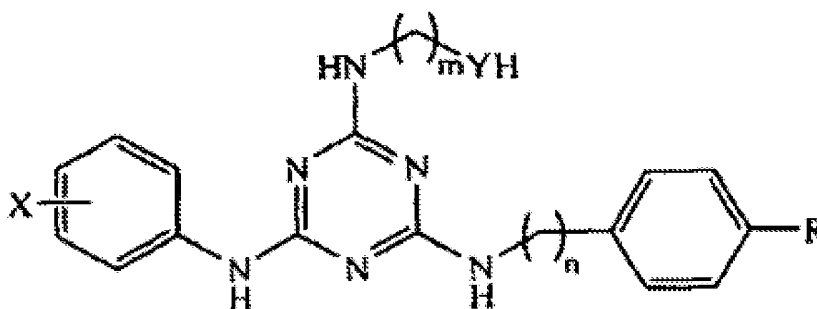
"DERIVADOS DE TRIAZINA, COMPOSIÇÕES CONTENDO TAIS DERIVADOS, E MÉTODOS DE TRATAMENTO DO CANCRO E DE DOENÇAS AUTOIMUNES USANDO TAIS DERIVADOS"

Referência cruzada a aplicação relacionada

Esta aplicação reivindica o benefício prioritário da Aplicação No. 60/924,111, depositada em 30 abril, 2007.

Área da invenção

A presente invenção relaciona-se com compostos da seguinte fórmula:



em que X é flúor ou cloro; Y é oxigénio, enxofre, ou um grupo amino; R é um grupo amino, hidroxilo, sulfonamida, ou carboxamida ou um seu análogo de N-monometilo ou N-dimetilo; m é um número inteiro de 2 a 6; e n é um número inteiro de 0 a 2. Os compostos podem ser usados para o tratamento de certos cancros e doenças autoimunes.

Antecedentes da invenção

O cancro refere-se a mais do que uma centena de formas clinicamente distintas da doença. Quase todos os tecidos do corpo podem originar cancro e alguns podem mesmo originar vários tipos de cancro. O cancro é caracterizado por um crescimento anormal de células que podem invadir o tecido

de origem ou disseminar-se para outros locais. De facto, a gravidade de um cancro particular, ou o grau de malignidade, é baseada na propensão das células cancerígenas para a invasão do tecido da vizinhança e para a disseminação. Isto é, vários cancros humanos (*e.g.*, carcinomas) diferem apreciavelmente quanto à sua capacidade de se disseminarem de um local ou tumor primário, e de se metastizarem através do corpo. Efetivamente é o processo de metastização do tumor que é prejudicial à sobrevivência a longo prazo do paciente com cancro. Um cirurgião pode remover um tumor primário, mas um cancro que se tenha metastizado alcança frequentemente demasiados locais para permitir uma cura cirúrgica. Para metastizar com sucesso, as células cancerígenas têm de se separar da sua localização original, invadir um vaso sanguíneo ou linfático, viajar na circulação até um novo local, e estabelecer um tumor aí.

Os doze principais cancros são os cancros da próstata, da mama, do pulmão, colorretal, da bexiga, linfoma de não Hodgkin, uterino, melanoma, do rim, leucemia, ovárico, e pancreático. O melanoma é um cancro principal e um problema de saúde global crescente em virtude da sua capacidade de metastizar na maioria dos órgãos no corpo que incluem nódulos linfáticos, pulmões, fígado, cérebro, e osso. O resultado clínico para pacientes com metastização em locais distantes é significativamente pior do que aquele visto com metástases do nódulo linfático regional. O tempo de sobrevivência médio para pacientes com metástases no pulmão é de onze meses enquanto para pacientes com metástases no fígado, no cérebro, e no osso é de quatro meses. Quatro tipos de tratamento têm sido usados para metástases distantes do melanoma: cirurgia, terapia de radiação, quimioterapia, e imunoterapia. A cirurgia é o mais frequentemente usada para melhorar a qualidade de vida de

um paciente, tal como a remoção de uma metástase que esteja a obstruir o trato gastrointestinal. A terapia de radiação tem algum grau de eficácia no controlo local das metástases, mas está primariamente limitada a metástases cutâneas e/ou do nódulo linfático. Um número de agentes quimioterapêuticos tem sido avaliado para o tratamento do melanoma metastático. No entanto, somente dois fármacos citotóxicos são capazes de alcançar uma taxa de resposta de 10% ou mais. Estes fármacos são a decarbazina (DTIC) e as nitrosoureas. Somente a DTIC está aprovada para o tratamento do melanoma na maioria dos países. Subsequentemente, a falta de efeitos clinicamente significativos, benéficos, a longo prazo da cirurgia, da terapia de radiação, e da quimioterapia para o tratamento do melanoma metastático tem levado ao uso de imunoterapia. Até agora, a maioria da atenção tem sido dada às citocinas interleucina-2 e interferão- α . Ensaio clínico têm originado melhores resultados com a interleucina-2 mas, em média, somente 15% dos pacientes com melanoma metastático exibem uma redução significativa na carga do tumor em resposta à interleucina-2.

Similares ao melanoma, outros cancros tornam-se um sério risco de vida logo que a metastização ocorra. O cancro pancreático origina uma probabilidade de 3% de sobrevivência para além de um ano após metastização (e.g., primeiro diagnóstico). Esta aumenta somente para 18% após tratamento com o fármaco citotóxico gemcitabina e para 24% após tratamento com gemcitabina, tarceva, e o inibidor de cinase rFCE. O cancro da próstata pode ser controlado com sucesso por cirurgia ou radiação desde que o cancro esteja confinado à próstata. Mas existe pouco tratamento eficaz disponível logo que a metastização ocorra, especialmente se a terapia de privação de androgénio falha.

Outros cancros podem ser mais eficazmente tratados com agentes quimioterapêuticos que não o melanoma, o cancro pancreático, ou da próstata. Os agentes quimioterapêuticos, no entanto, sofrem de duas grandes limitações. Primeiramente, os agentes quimioterapêuticos não são específicos em relação às células cancerígenas e particularmente em altas doses eles são tóxicos para células normais que se dividem rapidamente. Em segundo lugar, com o tempo as células cancerígenas desenvolvem resistência aos agentes quimioterapêuticos não proporcionando desse modo benefício adicional ao paciente. Como mencionado para o melanoma, outras modalidades de tratamento têm sido exploradas para resolver as limitações surgindo do uso de agentes quimioterapêuticos. Mesmo assim, estes tratamentos adicionais têm tido sucesso limitado no tratamento de outros cancros. Exemplos de tratamentos adicionais contra o cancro e das suas limitações incluem cirurgia (incapacidade de remover completamente metástases extensivas), radiação (incapacidade de distribuir seletivamente a radiação às células cancerígenas), e imunoterapia (o uso de citocinas tóxicas com eficácia limitada). Por esta razão, outras abordagens terapêuticas mais novas estão sob exploração (e.g., agentes antiangiogénese, agentes da apoptose, terapia de gene) mas estes tratamentos estão, relativamente falando, na sua infância. Portanto, existe ainda uma necessidade para novas abordagens exemplificadas por novos agentes quimioterapêuticos que sejam eficazes (e.g., redução do tamanho do tumor ou da disseminação das metástases), tenham toxicidade limitada no tratamento do cancro, prolonguem o tempo de desenvolvimento de resistência a fármacos, ou qualquer sua combinação.

A EP 1479397 A1 relaciona-se com um agente antidemência que usa um inibidor do canal de potássio BEC 1 como o

ingrediente ativo. É dito que o inibidor do canal de potássio BEC 1 tem uma ação para melhorar distúrbios da aprendizagem e é útil como um agente preventivo ou terapêutico para doenças, preferencialmente demência, nas quais o canal de potássio BEC 1 seja considerado como estando relacionado. É igualmente dito que um composto tendo 2,4,6-triamino-1,3,5-triazina tem uma ação inibidora do canal de potássio BEC 1.

A WO 9710887 A1 relaciona-se com conjugados de afinidade ligando-matriz compreendendo um ligando, cujo ligando está anexado a uma matriz de suporte, opcionalmente através de uma braço espaçador interposto entre a matriz e o ligando. O ensinamento deste documento relaciona-se para além disso com estes conjugados de afinidade ligando-matriz e a sua preparação e uso na purificação de materiais proteínáceos tais como e.g. imunoglobulinas, insulinas, Fator VII, ou Hormona do Crescimento humano ou seus análogos, derivados e fragmentos e precursores.

A CA 2216486 A1 diz respeito a compostos de triazina, seus sais de adição ácida farmaceuticamente aceitáveis e formas estereoquimicamente isoméricas, para o fabrico de um medicamento para o tratamento de sujeitos sofrendo de infecção pelo VIH (Vírus da Imunodeficiência Humana).

A CA 2578995 A1 descreve compostos de triazina que se dizem úteis na ligação na porção de cauda ou Fc de imunoglobulinas e assim têm utilidade naquelas aplicações que requerem a interação da ligação não covalente de uma molécula com a porção Fc das imunoglobulinas. Tais aplicações incluem a deteção e purificação das imunoglobulinas bem como o tratamento de certas doenças autoimunes.

Sumário da invenção

Numa forma de realização são proporcionados compostos, composições contendo tais compostos, e usos de tais compostos em métodos de fabrico de medicamentos.

Estes compostos, composições e medicamentos podem atuar através de um mecanismo útil com toxicidade reduzida para o tratamento de pelo menos alguns cancros. Embora eles possam ser usados sozinhos para tratar o cancro, um tratamento mais eficaz pode compreender o uso dos compostos em combinação com outros fármacos ou terapias anticancro. O uso dos compostos em combinação com agentes quimioterapêuticos pode proporcionar um método potencial para resolver as limitações mencionadas acima que surgem com o uso da quimioterapia: toxicidade do fármaco e resistência ao fármaco. Assim, os compostos podem ser relativamente menos tóxicos do que outros agentes quimioterapêuticos, como evidenciado pela citotoxicidade da célula e dados de animais, e o seu diferente mecanismo de ação deve atenuar a resistência ao fármaco quimioterapêutico, especialmente se a dose do agente quimioterapêutico puder ser diminuída quando usado em combinação com compostos da presente invenção. Os compostos podem ser usados no fabrico de um medicamento para o tratamento do cancro.

Além disso, estes compostos, composições e medicamentos podem atuar através de um mecanismo útil de ação com toxicidade reduzida para o tratamento de pelo menos algumas doenças autoimunes. Embora eles possam ser usados sozinhos para tratar a doença autoimune, um tratamento mais eficaz pode compreender o uso dos compostos em combinação com outros fármacos ou terapias anti-inflamatórias. Os compostos podem ser usados no fabrico de um medicamento para o tratamento da doença autoimune.

Aspetos adicionais da invenção serão aparentes a uma pessoa perita na técnica a partir das seguintes descrição e reivindicações.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 mostra o efeito do composto V na adesão de células PC-3 numa variedade de substratos: (A) laminina, (B) matriz de membrana basal MATRIGEL™, ou (C) colagénio.

A Figura 2 mostra os efeitos antitumor num melanoma primário B16F10 de diferentes compostos. Os efeitos do composto I, do composto II, ou da doxorrubicina são comparados na Fig. 2A. Os efeitos do composto V ou do citoxano são comparados na Fig. 2B.

A Figura 3 mostra os efeitos antitumor da administração intravenosa do composto II, do composto IV, do composto V, ou da ciclofosfamida num tumor da mama DA-3.

A Figura 4 mostra os efeitos antitumor da administração intravenosa de combinações de compostos num tumor da mama DA-3. Os efeitos do composto II, da ciclofosfamida, e da ciclofosfamida + composto II são comparados na Fig. 4A. Os efeitos do composto I, da ciclofosfamida, e da ciclofosfamida + composto I são comparados na Fig. 4B. Os efeitos do composto V, da ciclofosfamida, e da ciclofosfamida + composto V são comparados na Fig. 4C.

A Figura 5 mostra a eficácia antitumor da administração oral de cisplatina sozinha comparada com a combinação do composto VII e da cisplatina num tumor da mama DA-3.

A Figura 6 mostra a eficácia antitumor do composto I, do composto II, do composto V, ou do ácido acetilsalicílico num mastocitoma P815.

A Figura 7 mostra a eficácia antitumor do composto II num tumor do pulmão LL/2. Os efeitos do composto II e da cisplatina são comparados na Fig. 7A. Os efeitos do composto II sozinho, da ciclofosfamida sozinha, e da ciclofosfamida + composto II são comparados na Fig. 7B.

A Figura 8 mostra a eficácia antitumor do composto II, do composto III, do composto VII, ou da ciclofosfamida num tumor do pulmão LL/2.

A Figura 9 mostra a eficácia antitumor do composto II, do composto V, ou da gemcitabina num tumor pancreático PAN02.

A Figura 10 mostra a eficácia antitumor de compostos num tumor da próstata PC-3: composto II sozinho (Fig. 10A), combinação de ciclofosfamida + composto II (Fig. 10B), e comparação do composto V com a combinação de ciclofosfamida + composto V (Fig. 10C).

A Figura 11 mostra o efeito do composto V na inibição da PGE₂ liberta pela indução de LPS de células J774A.1.

A Figura 12 mostra o efeito do composto I na mortalidade de camundongos NZB x NZW.

A Figura 13 mostra o efeito da administração intravenosa do composto I no desenvolvimento da hipersensibilidade do tipo atrasada (HTA): desafio primário (Fig. 13A) e desafio secundário (Fig. 13B).

A Fig. 14 mostra o efeito da administração intravenosa do composto II no desenvolvimento da hipersensibilidade do tipo atrasada (HTA): desafio primário (Fig. 14A) e desafio secundário (Fig. 14B).

A Figura 15 mostra o efeito da administração oral do composto IV ou do composto V na inflamação como medida pela espessura do ouvido após HTA.

A Figura 16 mostra o efeito da administração oral do composto III no desenvolvimento da hipersensibilidade do tipo atrasada (HTA): desafio primário (Fig. 16A) e desafio secundário (Fig. 16B).

A Figura 17 mostra o efeito da administração intravenosa do composto X ou do composto XI na inflamação como medida pela espessura do ouvido após HTA.

A Figura 18 mostra o efeito da administração oral do composto I, do composto IV, ou do composto V na artrite induzida por adjuvante (AIA).

A Figura 19 mostra o efeito da administração intravenosa do composto II ou do composto V na contagem de glóbulos brancos induzida por lipopolissacarídeo (LPS).

A Figura 20 mostra o efeito da administração intravenosa do composto II ou do composto V na produção de diferentes mediadores solúveis num modelo de rato de bolsa de ar duas horas após indução por lipopolissacarídeo (LPS): FNT α (Fig. 20A), PGE₂ (Fig. 20B), LTB₄ (Fig. 20C), ou MCP-1 (Fig. 20D).

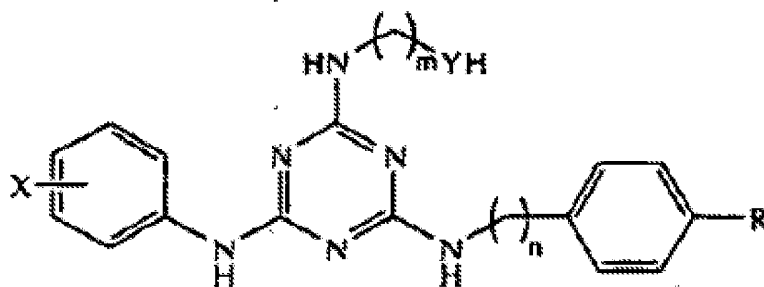
A Figura 21 mostra o efeito da administração intravenosa do composto II ou do composto V na produção de diferentes mediadores solúveis num modelo de rato de bolsa de ar doze horas após indução por lipopolissacarídeo (LPS): FNT α (Fig. 21A) ou PGE₂ (Fig. 21B).

A Figura 22 mostra a inibição do dano macroscópico do cólon distal pelo composto V.

A Figura 23 mostra o efeito do composto V em sinais clínicos de encefalomielite autoimune experimental (EAE).

Descrição de certas formas de realização da invenção

Os compostos da presente invenção, ou seus derivados farmacologicamente aceitáveis, são descritos pela seguinte fórmula:



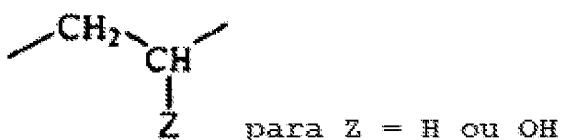
em que X é F ou Cl;

Y é NH, O, ou S;

R é NH₂, OH, SO₂NH₂, SO₂N(CH₃)H, SO₂N(CH₃)₂, ou CONH₂;

m é 2, 3, 4, 5 ou 6; e

n é 0, 1 ou 2 no qual um fragmento de dois carbonos (n = 2) pode ser representado por



Em formas de realização preferenciais, um ou mais dos seguintes pode-se aplicar:

X = F; e/ou

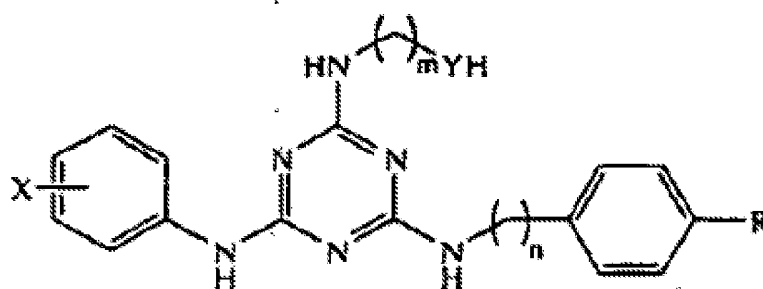
Y = NH ou O; e/ou

R = NH₂, OH, SO₂NH₂, ou SO₂N(CH₃)₂; e/ou

m = 4, 5 ou 6; e/ou

n = 2.

A presente invenção diz respeito além disso a um composto da seguinte fórmula:



em que X é F ou Cl;

Y é NH, O, ou S;

R é NH₂, OH, F ou Cl;

m é um número inteiro de 2 a 6; e

n é um número inteiro de 0 a 2

para o tratamento do cancro ou para o tratamento de uma doença autoimune num paciente humano com necessidade dele.

Uma forma de realização preferencial deste aspeto da invenção é o composto XII mostrado abaixo.

Particularmente preferenciais são os compostos I-XI que têm as seguintes estruturas:

Composto	Estrutura
I	
II	
III	
IV	
V	
VI	
VII	
VIII	
IX	
X	
XI	
XII	

Embora alguns compostos sejam descritos pela fórmula geral acima, será apreciado por qualquer um perito na técnica que certas modificações estruturais que se encontram fora da fórmula, mas que são em todo o caso óbvias, estão dentro do âmbito desta invenção. Por exemplo, é possível sintetizar compostos descritos pela fórmula acima mas que não contenham uma substituição de halogéneo no anel de fenilo. Tais compostos foram fabricados, mas observou-se que eram geralmente mais tóxicos do que compostos de triazina substituídos por monoclouro ou fluorofenilo. Similarmente, compostos de triazina substituídos por dihalofenilo estão dentro do âmbito da presente invenção. Adicionalmente, embora a fórmula geral descreva compostos de fenetilo para-substituídos (amino, hidroxilo, sulfonamida, etc.), é possível que tais substituintes possam ser também fabricados em posições *orto* ou *meta* da porção de anel de benzeno da fração de fenetilo. Finalmente, a porção de etileno da fração de fenetilo substituído pode ser substituída por um fragmento de etileno insaturado ou uma estrutura cíclica fundida (anel com cinco ou seis membros) com o anel de benzeno para introduzir uma estrutura com menos graus de liberdade do que a fração de fenetilo ou uma alternativa mais rigidificada.

Uma nova abordagem ao tratamento do cancro reside na descoberta de compostos que são eficazes na redução do tamanho do tumor e/ou da disseminação da metastização e que podem também reduzir a inflamação. Os compostos da presente invenção podem satisfazer este requisito de uma tal nova classe de compostos úteis para o tratamento do cancro. Isto é, compostos que exibem simultaneamente propriedades anticancro e anti-inflamatórias significativas oferecem uma potencial abordagem em duas frentes que se direciona quer para células do tumor geneticamente instáveis (alta taxa de mutação e subsequente resistência à quimioterapia), quer

para células geneticamente normais presentes no tecido inflamado.

Esta abordagem em duas frentes ao tratamento do cancro é tornada mais atraente pela percepção crescente de que existe uma ligação entre inflamação crónica e o subsequente desenvolvimento do cancro. Esta inflamação crónica é, por seu turno, frequentemente o resultado de infeção viral ou bacteriana persistente e sem risco de vida (no momento). De facto, a etiologia de numerosos cancros específicos pode estar diretamente ligada a patógenos específicos. Por exemplo, o vírus do papiloma humano, o vírus da hepatite B ou C, e o vírus de Epstein-Barr são fatores de risco para o cancro cervical, para o carcinoma hepatocelular, e para as desordens linfoproliferativas respetivamente. A *H. pylori* é um dos principais contribuintes para o cancro gástrico. Foi mais recentemente descoberto que a doença periodontal (gengiva), uma condição inflamatória crónica associada à presença de um número mais alto de bactérias na boca, está ligada a um risco significativamente maior de desenvolver cancro pancreático.

A ligação entre cancro e inflamação parece ter as suas raízes ao nível molecular. Moléculas associadas com a inflamação, ou uma resposta imune pró-inflamatória, estão ligadas à progressão do cancro. Por exemplo, o fator de necrose tumoral (FNT α) pode ser considerado como a mais importante das citocinas pró-inflamatórias uma vez que regula a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (e.g. IL-1, IL-6, IL-8, e FEC-GM). Interessantemente, altas doses de FNT α administradas a animais carregando tumores apresentam atividade anticancro. Isto não se tem, no entanto, traduzido em atividade anticancro significativa em humanos como evidenciado por um ensaio clínico de fase I com FNT α recombinante. Mais importante, o FNT α é expresso

numa gama de tumores humanos e a sua presença é geralmente associada a mau prognóstico. De facto, parece que concentrações relativamente baixas de FNT α endógeno cronicamente produzido no microambiente do tumor intensificam o desenvolvimento e a disseminação do tumor. Isto é, esta atividade anticancro do FNT α é somente observada a concentrações suprafisiológicas desta citocina. Outra molécula, ou conjunto de moléculas de proteína, para a qual foi recentemente formulada a hipótese de proporcionar uma ligação entre cancro e inflamação é o fator de transcrição FN- κ B. O FN- κ B, uma família de proteínas de ligação ao ADN, pode ser o ativador transcricional mais forte nas células de mamífero. Este fator de transcrição ativa a biossíntese de um número de proteínas que inclui várias citocinas pró-inflamatórias (incluindo o FNT α) e quimiocinas. Como mencionado acima para o FNT α , muitos cancros têm elevada atividade do FN κ B. Trabalho com um número de modelos de camundongo esclareceu o mecanismo pelo qual a ativação sustentada do FN κ B pode ligar a inflamação à promoção e progressão do tumor. Este trabalho foi recentemente revisto por Karin & Greten (*Nature Immunology*, 5: 749-759, 2005). Exemplos de doenças autoimunes que podem ser tratadas incluem artrite (e.g., artrite reumatoide ou psoriática), psoríase, doença de Crohn, doença inflamatória do intestino, espondilite anquilosante, síndrome de Sjögren, doença de Still (síndrome da ativação dos macrófagos), esclerose múltipla, uveíte, escleroderma, miosite, síndrome de Reiter, síndrome de Wegener, lúpus eritematoso sistémico (LES), púrpura trombocitopénica imune (PTI), glomerulonefrite, e vasculite.

Uma indicação da capacidade dos compostos da presente invenção em visar pelo menos uma das ligações moleculares descritas acima entre cancro e inflamação, FNT α , é

demonstrada nos Exemplos 21 e 22. Nestes exemplos, é mostrado em ensaios baseados em células (células WEHI-13VAR e J774A.1) que os compostos da presente invenção podem antagonizar a atividade pró-inflamatória do FNT α . Isto é, estes compostos podem inibir o efeito do FNT α como determinado pela sua capacidade de inibirem a apoptose ou citotoxicidade induzida pelo FNT α na linha celular WEHI-12VAR e de inibirem a produção do FNT α induzida por LPS na linha celular J774A.1.

Outra indicação da capacidade dos compostos da presente invenção em visar outras ligações moleculares descritas acima entre cancro e inflamação, metabolitos do ácido araquidónico, é demonstrada no Exemplo 28. Neste exemplo, é mostrado num modelo de bolsa de ar induzido por LPS que os compostos da presente invenção induzem uma inibição da produção da prostaglandina E₂ (PGE₂) e do leucotrieno B₄ (LTB₄). Adicionalmente às suas propriedades pró-inflamatórias está bem documentado que a via eicosanoide é ativada no cancro da próstata, da mama, e do cólon. Os metabolitos da ciclooxygenase (COX; prostaglandina) e da lipoxigenase (LOX; leucotrieno) contribuem para a progressão da doença através da promoção da proliferação, motilidade, invasão, e angiogénese das células. Isto é, estes compostos podem inibir o cancro e as doenças inflamatórias pelo seu efeito inibidor na produção da PGE₂ e do LTB₄ como determinado pela sua capacidade de inibirem a inflamação induzida por LPS no modelo de bolsa de ar.

Os compostos da presente invenção incluem todos os derivados farmaceuticamente aceitáveis, tais como sais, bem como quaisquer isómeros ou enantiómeros geométricos. Podem ser preparadas formulações do composto ativo de modo a proporcionar uma composição farmacêutica numa forma adequada para administração enteral, mucosal (e.g.

sublingual, pulmonária, e retal), parenteral (e.g. intramuscular, intra-arterial, intradérmica, subcutânea, e intravenosa), ou tópica (e.g., pomadas, cremes, e loções). Em particular, os compostos da presente invenção podem ser solubilizados num solvente de álcool ou de poliol (e.g., ésteres de polioxietileno SOLUTOL® HS 15 do ácido 12-hidroxiesteárico da BASF, glicerol, etanol, etc.), solução aquosa de mono ou dissacarídeos, ou qualquer outro solvente biocompatível tal como sulfóxido de dimetilo (DMSO) ou óleo de rícino polietoxilado CREMOPHOR EL® (também da BASF). A formulação pode, onde apropriado, ser convenientemente apresentada em unidades de dosagem discreta e pode ser preparada por qualquer um dos métodos bem conhecidos na técnica da formulação farmacêutica. Todos os métodos incluem o passo de reunir o ingrediente farmacêutico ativo com transportadores líquidos ou transportadores sólidos finamente divididos ou ambos caso seja necessário. Quando apropriado, as formulações acima descritas podem ser adaptadas de modo a proporcionarem a libertação sustentada do ingrediente farmacêutico ativo. Formulações de libertação sustentada bem conhecidas na técnica incluem o uso de uma injeção por bólus, infusão contínua, polímeros biocompatíveis, ou lipossomas.

Escolhas adequadas em quantidades e regulação de doses, formulação, e rotas de administração podem ser feitas com os objetivos de alcançar uma resposta favorável no mamífero (i.e., eficácia), e evitar toxicidade indevida ou outro dano nele (i.e., segurança). Portanto, "eficaz" refere-se às tais escolhas que envolvem a manipulação rotineira de condições para alcançar um efeito desejado: e.g., redução da morbidade ou da mortalidade de um paciente com um cancro ou doença autoimune; diminuição do crescimento ou da metastização das células cancerígenas; alteração do ciclo

ou apoptose das células; redução ou de outro modo melhoria do ferimento no tecido associado a uma resposta imune aos constituintes do corpo (órgãos e tecidos como glândula adrenal, olho, rim, fígado, pulmão, pâncreas, sistema nervoso, pele, articulação sinovial, tireoide, etc.); restauração do estado imunológico ou normalização de uma desordem/condição patológica do mamífero (título de anticorpos, subconjuntos de células imunes, sinalização por citocinas ou quimiocinas, complexos imunes de anticorpo-antígeno, etc.); remoção de anticorpos livres e/ou de complexos imunes de anticorpo-antígeno da circulação; melhoria dos indícios laboratoriais da doença autoimune (concentração ou quantidade absoluta de mediadores solúveis da inflamação, presença de autoanticorpos, proliferação celular, etc.); aumento da eficácia da terapia convencional com fármacos quimioterapêuticos ou anti-inflamatórios; e suas combinações. Em particular, os efeitos deletérios do tratamento quimioterapêutico ou anti-FNT α convencional podem ser evitados. O mamífero pode ser um animal ou um paciente humano.

A quantidade de composto administrado é dependente de fatores tais como, por exemplo, bioatividade e biodisponibilidade do composto (e.g., meia-vida no corpo, estabilidade, e metabolismo); propriedades químicas do composto (e.g., peso molecular, hidrofobicidade, e solubilidade); rota e programa de administração; e similares. Será também entendido que o nível de dose específica a ser alcançado para qualquer paciente particular pode depender de uma variedade de fatores, incluindo idade, saúde, historial médico, peso, combinação com um ou mais compostos, e gravidade da doença.

O termo "tratamento" refere-se, *inter alia*, à redução ou melhoria de um ou mais sintomas do cancro ou da doença

autoimune. Para um dado paciente, a melhoria de um sintoma, o seu agravamento, regressão ou progressão pode ser determinado por uma medida objetiva ou subjetiva.

Finalmente será apreciado por aqueles peritos na técnica que a referência aqui ao tratamento se estende à profilaxia bem como à terapia de um cancro ou doença autoimune estabelecida. Assim, por exemplo, os compostos da presente invenção poderiam ser usados após remoção cirúrgica do tumor primário ou antes da cirurgia ou quimioterapia agressiva ou mesmo quando o paciente estivesse em remissão. A falta relativa de toxicidade dos compostos observada nos estudos de camundongo *in vivo* (e.g., como observado nos exemplos anexados) quando comparada com terapias padrão contra o cancro permite melhor uso profilático do que seria aconselhável com terapias convencionais. Similarmente, os compostos da presente invenção podem ser usados em combinação com outros modos de tratamento do cancro ou da doença autoimune existentes ou agentes usados para o tratamento do cancro (e.g., fármacos citotóxicos, inibidores da angiogénese, imunoestimulantes, inibidores de cinase de proteínas) ou doença autoimune (e.g., corticoesteroides anti-inflamatórios, fármacos anti-inflamatórios não esteroides, metotrexato, FARMDs, biológicos tais como proteína recombinante ou anticorpo monoclonal). Exemplos de agentes quimioterapêuticos que podem ser usados com um ou mais compostos da invenção incluem decarbazina, doxorubicina, daunorubicina, ciclofosfamida, vinblastina, vincristina, bleomicina, topotecano, irinotecano, taxotero, taxol, 5-fluorouracilo, gemcitabina, cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, satraplatina, e clorambucilo. Exemplos de agentes terapêuticos que podem ser usados com um ou mais compostos da invenção incluem aqueles que bloqueiam a ligação do FNT α ao seu recetor ou subsequente transdução de sinal (e.g.,

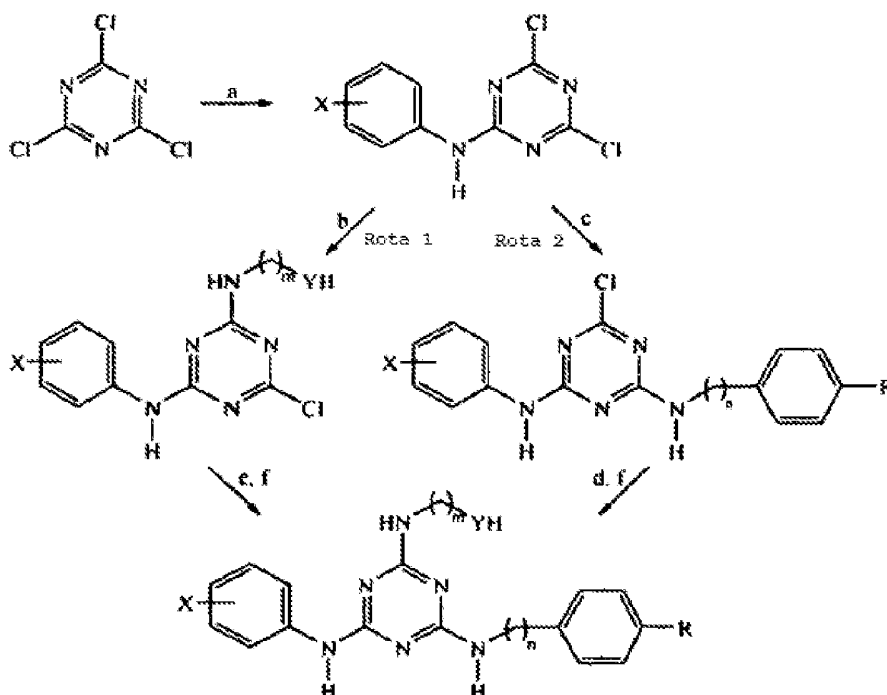
proteínas recombinantes que se ligam especificamente ao FNT α , anticorpos anti-FNT α , recetores solúveis do FNT α , compostos não proteínáceos que têm menos do que 1000 PM). A dose do composto a ser administrado irá ser em última análise à discricção do oncologista, reumatologista, ou outro médico. Em geral, a dose estará na gama de cerca de 1 a cerca de 75 mg/kg por dia. Mais preferencialmente, a gama será de cerca de 2 a cerca de 50 mg/kg por dia.

Os seguintes exemplos ilustram adicionalmente a prática desta invenção mas não se destinam a ser limitantes ao âmbito da presente invenção como especificado pelas reivindicações anexadas.

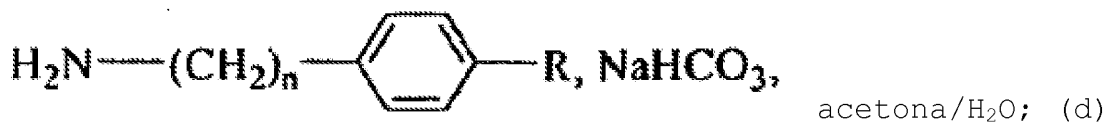
Exemplos

A sequência sintética geral para a preparação dos compostos úteis na presente invenção está delineada na rota 1 ou na rota 2 (Esquema 1). A rota 1 ilustra a reacção do cloreto cianúrico com a haloanilina para dar o intermediário de dicloro-triazina. Arilo ou aralquiloamindas foram depois adicionadas seguidas das alquiloaminas. A rota 2 demonstra a preparação do intermediário de dicloro-triazina como na rota 1 seguida primeiramente pela reacção com alquiloaminas e depois pela adição de arilo ou araquiloaminas. O último passo foi a remoção dos grupos protetores.

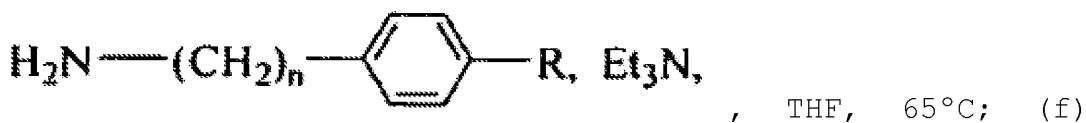
Esquema 1



Reagentes: (A) haloanilina, acetona/água, $-10^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$; (b) alquilodiamina ou alcanolamina ou tioalquiloamina, $\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{THF}/\text{acetona}$, t.a.; (c)



alquilodiamina ou alcanolamina ou tioalquiloamina, THF/MeOH , $130^{\circ}\text{C}/10$ min, micro-ondas; (e)



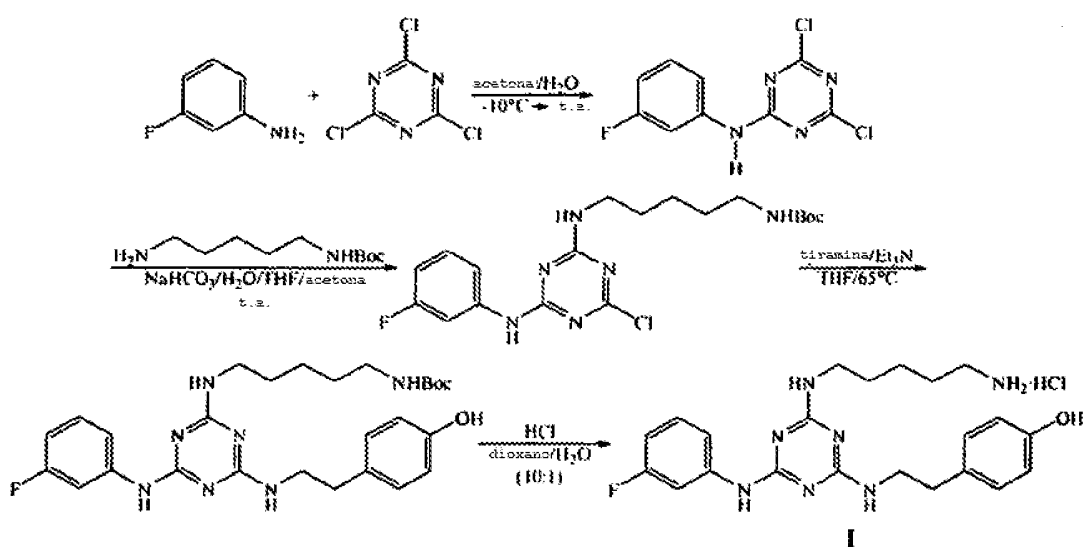
remoção do grupo protetor (onde aplicável).

Instrumentação

Todos os cromatogramas de CLAR e espectros de massa foram registados num instrumento Agilent CL-EM HP 1100 usando um detetor de matriz de díodo. Foi usada uma coluna C18 analítica (75 x 4,6 mm, 5 microns) com um gradiente de acetonitrilo-água 1%-40% contendo ATF a 0,01% em 6 min e um

caudal de 2 mL/min (método 1), uma coluna C18 analítica (75 x 4,6 mm, 5 microns) com um gradiente de acetonitrilo-água 15-99% contendo ATF a 0,01% em 6 min e um caudal de 2 mL/min (método 2), uma coluna C18 analítica (75 x 4,6 mm, 5 microns) com um gradiente de acetonitrilo-água 0,1%-20% contendo ATF a 0,01% em 5 min e um caudal de 1mL/min (método 3), ou uma coluna C18 analítica (75 x 4,6 mm, 5 microns) com um gradiente de acetonitrilo-água 1%-50% contendo ATF a 0,01% em 5 min e um caudal de 1 mL/min (método 4).

Exemplo 1: Síntese do composto I (exemplo representativo da rota 1)



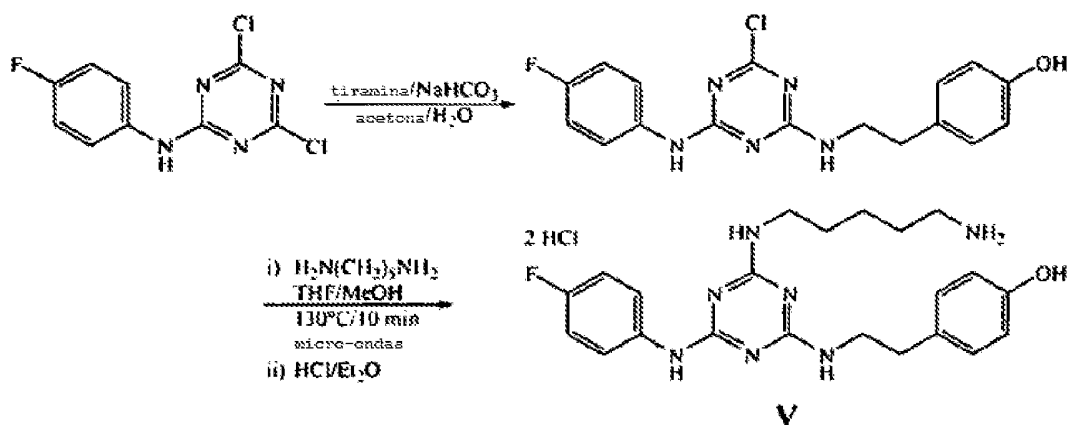
Cloreto cianúrico (10,0 g, 54,2 mmol) foi adicionado em pequenas porções a uma mistura arrefecida (-10°C) de água (50 mL) e acetona (50 mL). Uma solução da 3-fluoroanilina (5,2 mL, 54,2 mmol) em acetona (50 mL) foi adicionada lentamente ao longo de 50 min, mantendo-se a temperatura da reação abaixo de -5°C. A reação foi depois agitada à temperatura ambiente durante uma hora. O pH da reação foi ajustado de 2 a 8 com bicarbonato de sódio aquoso saturado

(200 mL), e a agitação foi continuada durante 30 min adicionais. O sólido precipitado foi recolhido por filtração, lavado com água e seco *in vacuo*. Isto deu 2,4-dicloro-3-fluorofeniloamina-1,3,5-triazina como um sólido branco: 13,3 g, rendimento de 94%; ^1H RMN (400 MHz, d_6 -DMSO): δ 6,97 – 7,01 (1 H, m), 7,38 – 7,43 (2 H, m), 7,52 – 7,55 (1 H, m), 11,25 (1 H, la); EMBR (IEP): m/z 259 (MH+); CLAR (método 2): 4,1 min. O produto foi usado no próximo passo sem purificação adicional. Este derivado de dicloro-triazina (6,4 g, 24,7 mmol) foi dissolvido em THF (70 mL) à temperatura ambiente e foi tratado com uma solução de 5-(*tert*-butoxicarboniloamino)pentiloamina (7,5 g, 37,0 mmol) numa mistura de acetona (50 mL) e água (50 mL). A solução resultante foi depois tratada com bicarbonato de sódio aquoso saturado (70 mL). A reação foi agitada à temperatura ambiente durante 2,5 h a 3 h. A mistura foi depois concentrada *in vacuo*, diluída com água, e extraída com acetato de etilo. Os extratos orgânicos combinados foram lavados com cloreto de sódio aquoso saturado, HCl aquoso a 2 M, cloreto de sódio saturado, bicarbonato de sódio saturado, e cloreto de sódio saturado, depois secos (sufalto de magnésio-carvão vegetal), filtrados através de terra diatomácea CELITE, e concentrados *in vacuo* até 200 mL. Esta solução foi vertida, com agitação, em 1,2 L de hexano e o precipitado foi recolhido por filtração, lavado com hexano, e seco *in vacuo* para originar o derivado de monocloro-[1,3,5]triazina como um sólido branco: 6,6 g, rendimento de 63%. ^1H RMN (400 MHz, d_6 -DMSO): δ 1,23 – 1,30 (2 H, m), 1,31 – 1,56 (2 H, m), 1,34 (9 H, s), 1,44 – 1,56 (2 H, m); 2,85 – 2,91 (2 H, m), 3,20 – 3,30 (2 H, m), 6,70 – 6,77 (1 H, m), 6,79 – 6,85 (1 H, m), 7,25 – 7,33 (1 H, m), 7,38 – 7,43 (1 H, m), 7,67 – 7,75 & 7,76 – 7,85 (1 H, la), 8,14 – 8,21 & 8,22 – 8,30 (1 H, la), 10,05 – 10,11 & 10,15 – 10,26 (1 H, la); EMBR (IEP): m/z 425 (MH+), 447 (MH

+ Na); CLAR (método 2): 4,5 min. Uma solução de monoclorotriazina (6,6 g, 15,6 mmol) em THF (300 mL) foi tratada com tiramina (6,4 g, 46,7 mmol) e trietiloamina (77,7 mmol, 10,9 mol). A reação foi aquecida a 65-70°C durante 16 hr a 60 hr, depois arrefecida até à temperatura ambiente e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi extraído com acetato de etilo e filtrado. O filtrado foi lavado com HCl aquoso a 1 M, cloreto de sódio saturado, bicarbonato de sódio aquoso saturado, e cloreto de sódio saturado, depois seco (sufalto de magnésio-carvão vegetal), filtrado através de terra diatomácea CELITE, e concentrados *in vacuo*. O resíduo foi depois dissolvido em éter (150 mL) e esta solução foi adicionada gota a gota a 1,4 L de hexano com agitação vigorosa. O sólido precipitado foi recolhido por filtração e seco *in vacuo* para originar o derivado de tri(amino-substituído)-[1,3,5]triazina como um sólido esbranquiçado: 6,5 g, rendimento de 80%. ¹H RMN (400 MHz, *d*₆-DMSO): δ 1,21 - 1,29 (2 H, m), 1,32 - 1,41 (2 H, m), 1,34 (9 H, s), 1,44 - 1,54 (2 H, m), 2,65 - 2,71 (2 H, m), 2,88 (2 H, dt, *J* = 6,5, 6,5 Hz), 3,15 - 3,27 (2 H, m), 3,33 - 3,42 (2 H, m), 6,61 - 6,70 (1 H, m), 6,67 (2 H, d, *J* = 8,5 Hz), 6,71 - 6,76 (1 H, m), 6,84 - 7,02 (1 H, m), 7,01 (2 H, d, *J* = 8,5 Hz), 7,16 - 7,23 (1 H, m), 7,39 - 7,47 (1 H, m), 7,87 - 7,91 (1 H, m), 8,92 - 8,94 & 9,00 - 9,06 (1 H, 2 x 1a), 9,13 (1 H, s); EMBR (IEP): *m/z* 526 (MH⁺), 548 (MH + Na); CLAR (método 2): 2,9 min. Uma solução do composto protegido por Boc (6,5 g, 12,4 mmol) em HCl a 4 M/1,4-dioxano (100 mL) e água (10 mL) foi agitada à temperatura ambiente durante 2 hr. Os solventes e o ácido em excesso foram evaporados *in vacuo* e os vestígios de água foram removidos por coevaporação (x 2) com isopropanol (25 mL). O resíduo seco foi dissolvido em isopropanol (25 mL) e a solução foi adicionada gota a gota a éter (450 mL) com agitação vigorosa. O sólido precipitado foi recolhido por filtração,

seco *in vacuo*, e depois dissolvido em água isenta de pirogêneos (800 mL), filtrado (0,22 μm), e liofilizado para dar o composto desprotegido I como um sólido esbranquiçado: 5,5 g, rendimento de 89%. ^1H RMN (400 MHz, d_6 -DMSO): δ 1,26 – 1,35 (2 H, m), 1,47 – 1,57 (4 H, m), 2,64 – 2,73 (4 H, m), 3,32 – 3,55 (5 H, m, $\text{CH}_2 + \text{NH}_3^+$), 6,63 (2 H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,81 – 7,93 (3 H, m), 8,15 – 8,25, 8,40 – 8,60, 9,10 – 9,30, 10,25 – 10,40 & 10,55 – 10,65 (2 H, 1a); ^{19}F RMN (376,5 MHz, CD_3OD): δ -114,50 a -113,84 (1 F, m); EMBR (IEP): m/z 426 (MH $^+$), 448 (MH + Na); CLAR (método 2): 1,6 min.

Exemplo 2: Síntese do composto V (exemplo representativo da rota 2)



A 2,4-dicloro-4-fluorofeniloamino-1,3,5-triazina foi preparada de acordo com o Exemplo 1 usando 4-fluoroanilina (18 mL, 190 mmol) em substituição da 3-fluoroanilina para originar um sólido branco: 44,3 g, rendimento de 90%; ^1H RMN (400 MHz, d_6 -DMSO) δ ; EMBR (IEP): m/z 259 (MH $^+$); CLAR (método 2): 4,0 min. A dicloro-triazina (44,2 g, 0,2 mol) foi acoplada com tiramina (35,1 g, 0,3 mol) de acordo com o Exemplo 1 com tiramina em substituição da 5-(*tert*-butoxicarboniloamino)pentiloamina para originar um sólido

branco: 56,1 g, rendimento de 91%; EMBR (IEP): m/z 360 (MH⁺), 382 (MH + Na); CLAR (método 2): 3,7 min. Uma solução de monoclorotriazina (15,0 g, 41,8 mmol) e 1,5-diaminopentano (24,5 mL, 209 mmol) em tetrahidrofurano (125 mL) e metanol (60 mL) foi dividida em nove porções. Cada porção foi aquecida num dispositivo de química de micro-ondas a 130°C durante 10 min. As porções foram depois recombinadas, concentradas *in vacuo*, e o resíduo dissolvido em acetato de etilo. A solução de acetato de etilo foi lavada com água e com cloreto de sódio saturado, e depois extraída com HCl aquoso a 2 M. O extrato aquoso foi lavado com acetato de etilo, depois alcalinizado com bicarbonato de sódio aquoso saturado. O precipitado foi extraído com acetato de etilo e os extratos foram lavados com cloreto de sódio saturado, depois secos (sufalto de magnésio-carvão vegetal), filtrados através de terra diatomácea CELITE, e concentrados *in vacuo*. O resíduo foi dissolvido em metanol (300 mL), e a solução foi tratada com uma solução de HCl a 1 M em éter (60 mL) e a solução foi concentrada *in vacuo*. O resíduo foi dissolvido em isopropanol quente (150 mL) e esta solução foi adicionada gota a gota a éter (1,5 L) com agitação vigorosa. O sólido precipitado foi recolhido por filtração, seco *in vacuo*, e depois dissolvido em água isenta de pirogêneos (1,6 L), filtrado (0,22 µm) e liofilizado para dar o composto V como o seu sal de hidrocloreto: 14,9 g, rendimento de 72%; pf 130 - 133°C; ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 1,16 - 1,27 (2 H, m), 1,37 - 1,54 (4 H, m), 2,53 - 2,64 (4 H, m), 2,76 - 2,83 (2 H, m), 3,09 - 3,17 (2 H, m), 3,21 - 3,48 (2 H, m), 6,56 - 6,64 (2 H, m), 6,85 - 7,02 (4 H, m), 7,16 - 7,27 (2 H, m); ¹⁹F RMN (376,5 MHz, CD₃OD): δ -118,1 a -116,0 (1 F, m); EMBR (IEP): m/z 426 (MH⁺); CLAR (método 2): 1,6 min.

Exemplo 3: Composto II

O composto acima foi preparado de acordo com o Exemplo 1 usando 4-[2-aminoetilo]benzeno-sulfonamida em vez de tiramina. Sólido branco, rendimento de 77%; pf 145 - 147°C; ^1H RMN (400 MHz, D_2O) δ 1,14 - 1,26 (2 H, m), 1,33 - 1,44 (2 H, m), 1,46 - 1,55 (2 H, m), 2,64 - 2,84 (4 H, m), 3,04 - 3,15 (2 H, m), 3,33 - 3,56 (2 H, m), 6,68 - 6,84 (1 H, m), 6,88 - 6,99 (1 H, m), 7,09 - 7,32 (4 H, m), 7,44 - 7,63 (2 H, m); ^{19}F RMN (376,5 MHz, CD_3OD): δ -114,50 a -113,81 (1 F, m); EMBR (IEP): m/z 489 (MH+); CLAR (método 2): 1,6 min.

Exemplo 4: Composto III

O composto acima foi preparado de acordo com o Exemplo 2 usando *N,N*-dimetilo-4-[2-aminoetilo]benzeno-sulfonamida em vez de tiramina. A *N,N*-dimetilo-4-[2-aminoetilo]benzeno-sulfonamida, a qual foi sintetizada como se segue: Uma solução de 4-[2-aminoetilo]benzenosulfonamida (26,5 g, 0,1 mol) em DMF anidro (120 mL) foi tratada com anidrido ftálico (23,5 g, 0,2 mol), e a reação foi aquecida a 70°C durante 4 hr. A reação foi arrefecida até à temperatura ambiente e 1,1'-carbonilodiimidazol (21,5 g, 0,1 mol) foi adicionado em pequenas porções, e a reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. O solvente foi evaporado *in vacuo*, e o resíduo foi lavado com água, seco, e triturado com acetato de etilo para dar o composto protegido pelo ftaloílo como um sólido branco: 38,1 g, rendimento de 89%; ^1H RMN (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 2,98 (2 H, t, $J = 7,0$ Hz), 3,82 (2 H, t, $J = 7,0$ Hz), 7,29 (2 H, s), 7,38 (2 H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,69 (2 H, t, $J = 8,0$ Hz), 7,76 - 7,84 (4 H, m); EMBR (IEP): m/z 331 (MH+), 348 (MH + Na); CLAR (método 2): 2,9 min. Uma solução do composto protegido pelo ftaloílo (12,7 g, 38,6 mmol) em DMF anidro (120 mL) sob N_2 a 0°C foi tratada com NaH (dispersão de 66% em óleo; 3,5 g, 88,8 mmol) em pequenas porções ao longo de 15 min e

a reação foi agitada sob N₂ a 0°C durante uma hora. Iodometano (4,8 mL, 77,2 mmol) foi depois adicionado gota a gota ao longo de 15 min e a reação foi agitada sob N₂ a 0°C à temperatura ambiente durante a noite. A suspensão amarela resultante foi vertida em gelo/água (1,4 L), e foi agitada durante 30 min. O precipitado foi recolhido por filtração, lavado sequencialmente com água, hexano, e éter e depois seco *in vacuo* para dar o derivado de *N,N*-dimetilo-benzenosulfonamida como um sólido branco: 11,3 g, rendimento de 81%; EMBR (IEP): *m/z* 359 (MH⁺), 34881 (MH + Na); CLAR (método 2): 3,7 min. Uma solução do composto protegido pelo ftaloílo (11,3 g, 31,5 mmol) e hidrato de hidrazina (4,6 mL, 44,6 mmol) em etanol a 95% (125 mL) foi aquecida a refluxo durante 2 hr. O sólido branco que se formou foi removido por filtração e lavado com etanol. O filtrado e as lavagens combinadas foram concentrados *in vacuo*, e o sólido que se formou foi removido por filtração e lavado com etanol. Este procedimento foi repetido três vezes e o filtrado final foi evaporado até à secura *in vacuo*. O sólido foi extraído com acetato de etilo. Os extratos foram concentrados *in vacuo* para dar a amina livre como um óleo amarelo; 4,8 g, rendimento de 67%; ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 2,65 (2 H, s), 2,84 - 2,92 (4 H, m), 7,47 (2 H, d, *J* = 8,5 Hz), 7,71 (2 H, d, *J* = 8,05 Hz); EMBR (IEP): *m/z* 229 (MH⁺), 251 (MH + Na); CLAR (método 2): 2,3 min. Este composto foi feito reagir com a dicloro-triazina seguida da amina de alquilo, e depois desprotegido para dar o produto final. Sólido branco (2,2 g, 92%); pf 143 - 146°C; ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 1,42 - 1,53 (2 H, m), 1,64 - 1,78 (4 H, m), 2,60 & 2,64 (6 H, 2 x s), 2,92 - 2,99 (2 H, m), 3,01 - 3,07 (2 H, m), 3,39 - 3,48 (2 H, m), 3,68 - 3,78 (2 H, m), 6,83 - 6,92 (1 H, m), 7,24 - 7,37 (2 H, m), 7,42 - 7,71 (5 H, m); EMBR (IEP): *m/z* 517 (MH⁺), 539 (MH + Na); CLAR (método 1): 4,3 min.

Exemplo 5: Composto IV

O composto acima foi preparado de acordo com o Exemplo 1 usando 2-[4-aminofenilo]-etiloamina em vez de tiramina. Sólido amarelo, rendimento de 97%; pf 155 - 158°C; ^1H RMN (400 MHz, D_2O) δ 1,42 - 1,53 (2 H, m), 1,63 - 1,76 (4 H, m), 2,87 - 3,02 (4 H, m), 3,40 - 3,48 (2 H, m), 3,62 - 3,77 (2 H, m), 7,07 - 7,15 (2 H, m), 7,28 - 7,38 (3 H, m), 7,40 - 7,49 (1 H, m), 7,52 - 7,63 (2 H, m); EMBR (IEP): m/z 425 (MH⁺), 447 (MH + Na); CLAR (método 3): 1,9 min.

Exemplo 6: Composto VI

O composto acima foi preparado de acordo com o Exemplo 2 usando 4-[2-aminoetilo]benzamida e 3-fluoroanilina em vez de tiramina e 4-fluoroanilina, respectivamente. A 4-[2-aminoetilo]benzamida foi preparada como se segue: Uma suspensão de hidrocloreto do ácido 4-[2-aminoetilo]benzoico (5,0 g, 24,8 mmol) em metanol (200 mL) foi tratada com uma solução de HCl a 4 M em 1,4-dioxano (10 mL, 40 mmol) e a reação foi aquecida a refluxo durante a noite. Os solventes e o ácido em excesso foram removidos *in vacuo*. O resíduo foi triturado com éter e seco *in vacuo* para dar o éster como um sólido branco: (5,5 g, quantitativo); ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 3,04 (2 H, t, $J = 7,0$ Hz), 3,21 (2 H, td, $J = 7,0, 0,5$ Hz), 3,89 (3 H, s), 7,41 (2 H, dd, $J = 8,0, 0,5$ Hz), 8,00 (2 H, d, $J = 8,0$ Hz). Uma suspensão deste sal de hidrocloreto (5,4 g, 24,8 mmol) em tetrahidrofurano (60 mL) e metanol (30 mL) foi tratada com diisopropiloetiloamina (4,8 mL, 27,3 mmol) e dicarbonato de di-*tert*-butilo (8,1 g, 37,2 mmol). A reação foi agitada à temperatura ambiente sob N_2 durante 5 hr. Os solventes foram evaporados *in vacuo* e o resíduo foi dissolvido em acetato de etilo. A solução foi lavada com água e cloreto de sódio saturado, depois seca (sulfato de magnésio), filtrada, e evaporada *in vacuo*. O resíduo foi triturado com éter frio e seco *in vacuo* para

dar o composto protegido como um sólido branco (5,6 g, 81%); EMBR (IEP): m/z 192 (MH⁺), 302 (MH + Na); CLAR (método 2): 3,9 min. Uma solução do éster (5,6 g, 20,0 mmol) em 1,4-dioxano (36 mL) foi tratada com amônia aquosa saturada (36 mL). A reação foi aquecida num tubo selado a 100°C durante a noite. Após arrefecimento, o sólido precipitado foi recolhido por filtração, lavado com água, e seco *in vacuo* para dar a amida como um sólido branco (4,4 g, 82%); EMBR (IEP): m/z 287 (MH + Na); CLAR (método 2): 2,6 min. A desproteção do composto de *tert*-butoxicarbonilo (4,4 g, 16,5 mmol) foi realizada por uma modificação do procedimento no Exemplo 2 na qual o cosolvente água foi omitido e o sólido foi seco *in vacuo* em vez de liofilizado, para originar um sólido branco (3,3 g, quantitativo); EMBR (IEP): m/z 165H⁺), 187 (MH + Na); CLAR (método 2): 0,3 min. Este composto foi feito reagir com a dicloro-triazina, seguida da amina de alquilo, e depois desprotegido para dar o produto final. Sólido branco, 1,0 g, rendimento de 20%; pf 190 - 192°C; ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 1,13 - 1,26 (2 H, m), 1,31 - 1,55 (4 H, m), 2,54 - 2,84 (4H, m), 2,99 - 3,12 (2 H, m), 3,23 - 3,49 (2 H, m), 6,66 - 6,82 (1 H, m), 6,86 - 7,14 (3 H, m), 7,16 - 7,25 (2 H, m), 7,36 - 7,57 (2 H, m); EMBR (IEP): m/z 453 (MH⁺); CLAR (método 2): 1,5 min.

Exemplo 7: Composto VII

O composto protegido por Boc (4,8 mmol) foi desprotegido por uma variação do procedimento usado no Exemplo 1. Neste caso, foi usado HCl a 4 M/1,4-dioxano (36 mL) em cloreto de metileno (30 mL), a 0°C até à temperatura ambiente, para originar um sólido branco, com baixa densidade, rendimento de 87%; pf 165 - 168°C; ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 1,40 - 1,51 (2 H, m), 1,62 - 1,44 (4 H, m), 2,87 - 3,04 (4 H, m), 2,93 (2 H, t, J 7,5 Hz), 3,01 (2 H, t, J 6,5 Hz), 3,41 (2 H, t, J 7,5 Hz), 3,64 - 3,77 (12 H, m), 7,07 - 7,16 (2 H,

m), 7,29 - 7,48 (42 H, m), 7,50 - 7,632 (2 H, m), 7,77 - 7,86 (2 H, m); ^{19}F RMN (376,5 MHz, CD_3OD): δ -120,2 a -119,8 (1 F, m); EMBR (IEP): m/z 245 (MH+), 489 (MH + Na); CLAR (método 1): 3,6 min.

Exemplo 8: Composto VIII

O composto acima foi preparado de acordo com o Exemplo 2 usando 4-aminobenzeno-sulfonamida e 3-fluoroanilina em vez de tiramina e 4-fluoroanilina, respectivamente. Sólido bege pálido, rendimento de 95%; pf 162 - 163°C; ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 1,47 - 1,56 (2 H, m), 1,67 - 1,78 (4 H, m), 2,95 (2 H, t, $J = 7,5$ Hz), 3,52 (2 H, t, $J = 7,0$ Hz), 6,92 - 7,00 (1 H, m), 7,29 - 7,42 (2 H, m), 7,60 - 7,78 (1 H, m), 7,82 - 7,95 (4 H, m); ^{19}F RMN (376,5 MHz, CD_3OD): δ -114,17 a -113,71 (1 F, m); EMBR (IEP): m/z 461 (MH+), 483 (MN + Na); CLAR (método 4): 3,7 min.

Exemplo 9: Composto IX

O composto acima foi preparado de acordo com o Exemplo 2 usando 4-[2-aminoetilo]benzeno-sulfonamida e 4-aminobutiloamina em vez de tiramina e 5-aminopentiloamina, respectivamente. Sólido branco, rendimento de 74%; pf 181 - 184°C; ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 1,65 - 1,77 (4 H, m), 2,93 - 3,04 (4 H, m), 3,42 - 3,54 (2 H, m), 3,68 - 3,78 (2 H, m), 6,86 - 6,95 (1 H, m), 7,24 - 7,50 (4 H, m), 7,57 - 7,66 (1 H, m), 7,78 - 7,86 (2 H, m); ^{19}F RMN (376,5 MHz, CD_3OD): δ -116,10 a -115,43 (1 F, m); EMBR (IEP): m/z 475 (MH+), 497 (MN + Na); CLAR (método 1): 3,6 min.

Exemplo 10: Composto X

O composto acima foi preparado de acordo com o Exemplo 2 usando *N,N*-dimetilo-4-(2-aminoetilo)benzeno-sulfonamida em vez de tiramina. Sólido bege pálido, rendimento de 57%; pf 290 - 295°C (decomp.); ^1H RMN (400 MHz, D_2O) δ 1,12 - 1,27

(2 H, m), 1,32 - 1,57 (4 H, m), 2,30 - 2,44 (6 H, m), 2,75 - 2,84 (4 H, m), 3,06 - 3,19 (2 H, m), 3,53 - 3,65 (2 H, m), 6,98 - 7,04 (2 H, m), 7,17 - 7,35 (3 H, m), 7,37 - 7,48 (2 H, m), 7,52 - 7,58 (1 H, m); EMBR (IEP): m/z 517 (MN + Na); CLAR (método 2): 1,8 min.

Exemplo 11: Composto XI

O composto acima foi preparado de acordo com o Exemplo 2 usando [±]-octopamina em vez de tiramina. Sólido branco, rendimento de 36%; pf 122 - 125°C (decomp.); ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 1,36 - 1,43 (2 H, m), 1,50 (2 H, tt, $J = 7,0$, 7,0 Hz), 1,57 - 1,63 (2 H, m), 2,62 (2 H, t, $J = 7,0$ Hz), 3,28 - 3,40 (2 H, m), 3,45 (1 H, $J = 13,5$, 8,0 Hz), 3,54 - 3,63 (1 H, m), 4,67 - 4,75 (1 H, m), 6,69 (2 H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,96 - 7,00 (2 H, m), 7,13 (2 H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,56 - 7,67 (2 H, m); EMBR (IEP): m/z 517 (MN +); CLAR (método 1): 3,3 min.

Atividade anticâncer

Exemplo 12: Citotoxicidade *in vitro* de compostos avaliada em células normais e cancerígenas

Este ensaio foi realizado para determinar o efeito dos compostos da presente invenção na citotoxicidade das células. As células foram incubadas na presença ou ausência dos compostos no seu respectivo meio condicionado. Após incubação de 24 hr ou de 72 hr, 50 μL de brometo de 3-(4,5-dimetilo)-2-tiazilo)-2,5-difenilo-2H-tetrazólio (MTT; 2 mg/mL) foram adicionados e incubados adicionalmente durante 4 hr. O sobrenadante foi descartado e 100 μL de dimetilosulfóxido (DMSO) foram adicionados. A absorvância foi lida a 270 nm com um leitor de placas ELISA TecanSunrise. O grupo de controle consistiu em células sem

compostos e é referido como 100% de células viáveis. A CI_{50} foi determinada usando *software* Prism.

A tabela 1 representa o efeito (CI_{50}) dos compostos em linhas celulares normais (FEHN ou fibroblasto dérmico humano normal; CEVUH ou célula endotelial da veia umbilical humana) e cancerígenas (célula do carcinoma da próstata humana PC-3; célula do mastocitoma de murino P815) numa cultura de células com 24 hr ou com 72 hr. Todos os compostos têm um fraco efeito na citotoxicidade das células. A utilidade preditiva dos ensaios de citotoxicidade baseados em células para avaliar a potencial atividade anticâncer *in vivo* de compostos com linhas celulares cancerígenas selecionadas está bem estabelecida na técnica e o uso de células inteiras, em vez de recetores de proteínas isolados ou enzimas, proporciona uma determinação mais confiável da atividade. Ver, por exemplo, Paull *et al.* (*J. Nat'l Cancer Inst.* 81: 1088-1092, 1989); Monks *et al.* (*J. Nat'l Cancer Inst.* 83: 757-766, 1991); Bandes *et al.* (*J. Nat'l Cancer Inst.* 86: 770-775, 1994); e Kamate *et al.* (*Int'l J. Cancer* 100: 571-579, 2002).

Tabela 1. Efeito dos compostos na citotoxicidade de células normais e cancerígenas em culturas de células com 24 horas ou 72 horas.

Composto	CI_{50} da cultura com 24 horas				CI_{50} da cultura com 72 horas			
	FDHN	CEVUH	PC-3	P815	FDHN	CEVUH	PC-3	P815
I	56,8	18,8	49,4	34	16,3	10,1	11,8	4,0
II	> 100	92,2	32,2	66,5	28,6	38,9	18,5	1,6
III	nd	nd	30,1	13,6	nd	nd	27,6	5,5
IV	82,1	51,3	56,6	33	42,5	> 100	51,9	nd
V	78,6	31,8	43,3	23,5	45,8	> 100	26,8	7,5
VII	nd	nd	17,7	12,6	nd	nd	14,1	4,0
VIII	nd	nd	31,0	10,9	nd	nd	5,2	2,9
XII	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9,0	21,7

nd = não determinada

Exemplo 13: Efeito *in vitro* dos compostos na migração ou invasão das células PC-3

Um ensaio de migração *in vitro* foi usado para avaliar a mobilidade das células em duas dimensões. As células PC-3 foram plaqueada numa placa com 12 poços e crescidas até à confluência em RPMI + SBF a 10%. Uma vareta de borracha foi usada para criar uma área desnudada. As células confluentes foram desativadas por tratamento com mitomicina C (0,5 μ M) à concentração usada para prevenir a questão confusa da proliferação das células e a síntese proteica. Estas células foram também incubadas na presença ou ausência do fator de crescimento endotelial (FGE) e do composto durante 24 hr, depois elas foram fotografadas.

Os efeitos do FGE e do composto V na migração ou invasão das células PC-3 no ensaio de migração *in vitro* foram determinados. O FGE promove a migração ou invasão das células PC-3 com mitomicina em comparação com o controlo (*i.e.*, nenhum FGE adicionado). A adição de diferentes concentrações (*i.e.*, 1 μ M a 10 μ M) do composto V ao meio de cultura das células produz uma inibição da migração ou invasão das PC-3 induzida pelo FGE. Resultados similares foram observados com o composto I. A adição de diferentes concentrações (*i.e.*, 1 μ M a 10 μ M) do composto I à cultura de células produz uma inibição da migração ou invasão das PC-3 induzida pelo FGE após 24 hr de cultura.

Exemplo 14: Efeito *in vitro* dos compostos na adesão das células PC-3 a componentes da matriz extracelular

Um ensaio de adesão *in vitro* das células foi usado para avaliar o efeito dos compostos na adesão das células cancerígenas. Placas de microtitulação com 96 poços foram revestidas durante 1 hr à temperatura ambiente com 50 μ L/mL de ligandos adesivos previamente diluídos até 5 μ g/mL para

a laminina, 10 µg/mL para a matriz de membrana basal MATRIGEL™, ou 10 µg/mL para o colagénio em TFS. Os poços foram bloqueados com uma solução de BSA a 1% em TFS (100 µL/poço) durante 1 hr a 37°C. Culturas subconfluentes de células PC-3 foram incubadas com uma solução a 5 µM de calceína-AM durante 30 min a 37°C, e depois a calceína-AM foi eluviada (30 min) por incubação das células PC-3 em meio sem calceína-AM. As células marcadas com calceína-AM foram tripsinizadas, lavadas, e ressuspensas em tampão de adesão (RPMI-1640, TFS a 10% suplementado com 1 mM de MgCl₂). As células PC-3 marcadas foram pré-incubadas na ausência ou presença de compostos durante 30 min e depois permitiu-se que um volume final de 100 µL de células pré-incubadas se anexasse a 37°C num incubador humidificado durante 15 min, 30 min, ou 60 min a 37°C. As células não anexadas foram removidas por duas lavagens com TFS e as células anexadas foram lisadas com 100 µL de uma solução de Triton X-100 a 1%. As placas foram lidas num leitor de fluorescência Tecan GENios Plus com um comprimento de onda de excitação de 485 nm e um comprimento de onda de emissão de 530 nm. O número de células anexadas foi calculado com base em curvas padrão. A anexação não específica de células (anexação a poços revestidos com BSA) foi sempre menor do que 5%.

A adição de diferentes concentrações do composto V no ensaio de adesão de células *in vitro* acima descrito inibe a adesão de células PC-3 de uma maneira dependente da dose numa variedade de substratos: laminina (Fig. 1A), matriz de membrana basal MATRIGEL™ (Fig. 1B), ou colagénio (Fig. 1C).

Exemplo 15: Efeitos antitumor dos compostos num tumor de melanoma primário B16F10

Camundongos fêmeas C57BL/6 com 6-8 semanas de idade foram injetados intradermicamente no dia 0 com 50 µL de 3,75 x

10^4 células de melanoma B16F10 viáveis de ATCC (fonte da cultura das células, Dr. I.J. Fidler). No dia 14, os tumores alcançaram 80 mm e os animais foram randomizados para os tratamentos. Os animais foram depois injetados IV com salino (controle negativo) ou composto V (5 mg/kg, 25 mg/kg, ou 50 mg/kg) no dia 14, no dia 16, e no dia 18 ou 10 mg/kg de doxorrubicina (controle positivo) no dia 14. Os camundongos foram sacrificados no dia 29. O peso corporal e o volume do tumor foram registados. O volume do tumor em série foi obtido por medições do diâmetro bidimensional com paquímetros, usando a fórmula $0,4 (a \times b^2)$ onde "a" era o diâmetro principal do tumor e "b" o diâmetro perpendicular menor. Um efeito antitumor pode ser quantificado pela T/C, que é calculada como (Volume do tumor tratado/Volume do tumor de controle) x 100%.

A Figura 2A mostra a eficácia antitumor dos compostos I ou II nas células B16F10 do tumor primário. Ambos os compostos induzem uma fraca redução (T/C à volta de 80%) do volume do tumor comparada com o controle. A Fig. 2B mostra a eficácia antitumor do composto V nas células B16F10 do tumor primário. O composto V induz uma redução significativa (T/C < 40%, $p = 0,001$) do volume do tumor comparada com o controle.

Exemplo 16: Efeitos antitumor dos compostos num tumor da mama DA-3

A linha celular DMBA3 (DA-3, modelo de carcinoma da mama) singénica surgiu de uma lesão pré-neoplásica tratada com 7,12-dimetilbenzantraceno em camundongos fêmeas BALB/c. As células DA-3 foram crescidas como culturas de monocamadas em frascos de plástico em RPMI-1640 contendo aminoácidos não essenciais a 0,1 mM, piruvato de sódio a 0,1 μ M, L-glutamina a 2 mM. Isto foi adicionalmente suplementado com 2-mercaptoetanol a 50 μ M e soro bovino fetal a 10%. Os

tumores DA-3 foram repicados em série *in vitro* por inoculação intradérmica de 50 μ L de 5×10^5 células do tumor viáveis para produzir tumores localizados em camundongos BALB/c com 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram depois monitorizados em série por palpação manual para evidência dos tumores. Os camundongos foram tratados ao dia 11, 18, e 25 com ciclofosfamida (100 mg/kg, injeção IV) e por tratamento intravenoso ao dia 11, ao dia 12, ao dia, 13, ao dia, 15, ao dia 18, ao dia 20, ao dia 22, e ao dia 25 com o composto. Os camundongos foram sacrificados do dia 27 ao dia 55. O volume do tumor em série foi obtido por medições do diâmetro bidimensional com paquímetros, usando a fórmula $0,4 (a \times b^2)$ onde "a" era o diâmetro principal do tumor e "b" o diâmetro perpendicular menor. Os tumores eram palpáveis, em geral, de 7 dias a 10 dias após a inoculação. O Instituto Nacional do Cancro (EUA) define o produto como eficaz se T/C for $\leq 40\%$.

A Figura 3 mostra a eficácia antitumor da administração intravenosa (5 mg/kg) do composto II, do composto IV, do composto V, ou da ciclofosfamida. Todos os compostos induzem uma inibição significativa ($p < 0,05$) do volume do tumor com uma T/C entre 25% e 70%. Além do mais, em comparação com a ciclofosfamida, a qual induz uma inibição significativa ($p < 0,05$) do volume do tumor com uma T/C entre 24% e 50%, todos os compostos foram similares à ciclofosfamida até ao dia 20. A eficácia antitumor de combinações do composto e ciclofosfamida CITOXANO foi também determinada contra o tumor DA-3.

A Figura 4A mostra a eficácia antitumor da administração intravenosa (50 mg/kg) do composto II sozinho com a combinação do composto II e da ciclofosfamida. O composto II induz uma inibição significativa ($p < 0,05$) do volume do tumor com uma T/C entre 40% e 70%, Além do mais, quando

comparados com a ciclofosfamida, a qual induz uma inibição significativa ($p < 0,05$) do volume do tumor com uma T/C entre 24% e 50%, os camundongos tratados com a combinação de ciclofosfamida e composto II demonstram também uma inibição significativa ($p < 0,0001$) do volume do tumor com uma regressão e uma T/C menor do que 10%. Uma regressão e efeito citostático (nenhum crescimento) foram observados no regime de combinação.

A Figura 4B compara a eficácia antitumor da administração intravenosa (50 mg/kg) do composto I sozinho com a combinação do composto I e da ciclofosfamida. O composto I tem um fraco efeito inibidor no crescimento do tumor DA-3. A ciclofosfamida induz uma inibição significativa ($p < 0,01$) do volume do tumor com uma T/C entre 20% e 50%. Os camundongos tratados com a combinação de ciclofosfamida e composto I demonstram também uma inibição significativa ($p < 0,05$) do volume do tumor com uma T/C entre 10% e 40%. Um efeito citostático (nenhum crescimento) foi observado no regime de combinação até ao dia 35. Todos os tratamentos foram parados ao dia 35. Os camundongos tratados com ciclofosfamida e tratados com a combinação de CI + composto I foram mantidos para observar o recrescimento do tumor. O recrescimento do tumor foi similar em ambos os grupos, mas menos pronunciado ou atrasado no grupo do regime de combinação.

A Figura 4C compara a eficácia antitumor da administração intravenosa (12,5 mg/kg) do composto V sozinho com a combinação do composto V e da ciclofosfamida. Todos os regimes induzem inibição significativa ($p < 0,04$) do volume do tumor até ao dia 20. Os camundongos tratados com o composto V demonstraram uma redução do volume do tumor com uma T/C entre 36% e 74%. No entanto, em comparação com a ciclofosfamida, a qual induz uma inibição do volume do

tumor com uma T/C entre 30% e 45%, os camundongos tratados com a combinação de ciclofosfamida e composto V demonstram também uma inibição significativa do volume do tumor com uma T/C entre 1% e 20%.

A Figura 5 compara a eficácia antitumor da administração oral (50 mg/kg) de cisplatina sozinha comparada com a combinação do composto VII e da cisplatina. A cisplatina induz uma inibição significativa ($p < 0,01$) do volume do tumor com uma T/C entre 40% e 77% dia 44 ao 77. Os camundongos tratados com a combinação de cisplatina e composto VII demonstram também uma inibição significativa ($p < 0,01$) do volume do tumor com uma T/C entre 34% e 71% do dia 34 ao 71.

Exemplo 17: Efeitos antitumor dos compostos no tumor de mastocitoma primário P815

O P815 singênico é um mastocitoma derivado de DBA/2 (H-2^d) obtido da ATCC (TIB64). As células P815 foram crescidas em MEMD contendo soro bovino fetal a 10%. Ao dia 0, 50 μ L de 5×10^5 células P815 viáveis foram intradermicamente injetados para produzir tumores localizados em camundongos DBA/2 com 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram depois monitorizados em série por palpação manual para evidência dos tumores. Os camundongos foram depois tratados todos os dias com administração oral do veículo (controle negativo), ácido acetilsalicílico (controle positivo, 50 mg/kg), ou composto (50 mg/kg). Os camundongos foram sacrificados ao dia 23. O volume do tumor em série foi obtido por medições do diâmetro bidimensional com paquímetros, usando a fórmula $0,4 (a \times b^2)$ onde "a" era o diâmetro principal do tumor e "b" o diâmetro perpendicular menor. Os tumores eram palpáveis, em geral, de 3 dias a 5 dias após a inoculação. A Figura 6 mostra o efeito da administração oral do composto I, do composto II, do composto V, ou do ácido

acetilsalicílico 8 (controle positivo) em células P815 do tumor primário. Todos os compostos induzem uma redução significativa (T/C entre 40% e 50%) do crescimento do tumor. Além do mais, os efeitos de todos os compostos foram comparáveis com o padrão de ouro, ácido acetilsalicílico solúvel.

Exemplo 18: Efeitos antitumor dos compostos num tumor do carcinoma do pulmão de Lewis primário LL/2

O LL/2 singênico é uma linha celular de tumor do pulmão obtida da ATCC (CRL-1642). As células LL/2 foram crescidas em MEMD contendo soro bovino fetal a 10%. Ao dia 0, 50 μ L de 5×10^5 células LL/2 viáveis foram intradermicamente injetados para produzir tumores localizados em camundongos LL/2 com 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram depois monitorizados em série por palpação manual para evidência dos tumores. Os camundongos foram depois tratados todos os dias com administração oral do veículo (controle negativo), ou composto (50 mg/kg) e com injeção intravenosa de cisplatina (5 mg/kg) ao dia 6 e ao dia 13. Os camundongos foram sacrificados ao dia 16. O volume do tumor em série foi obtido por medições do diâmetro bidimensional com paquímetros, usando a fórmula $0,4 (a \times b^2)$ onde "a" era o diâmetro principal do tumor e "b" o diâmetro perpendicular menor. Os tumores eram palpáveis, em geral, de 3 dias a 5 dias após a inoculação.

A Figura 7A mostra a eficácia antitumor da administração oral do composto II ou da cisplatina (controle positivo) em células do tumor primário LL/2. O composto II induz uma redução significativa (T/C entre 36% e 60%, $p < 0,04$) do crescimento do tumor do dia 7 ao dia 16. A cisplatina induz uma redução significativa (T/C entre 42% e 84%, $p < 0,04$) do crescimento do tumor ao dia 7 e ao dia 8. Noutra experiência, a ciclofosfamida (100 mg/kg) foi usada como

controle positivo e foi injetada ao dia 9 e ao dia 15. Os camundongos foram sacrificados ao dia 20. A Fig. 7B mostra o efeito da terapia de combinação da ciclofosfamida e do composto II. Esta terapia de combinação alcançou uma atividade sinérgica na redução das células do tumor primário LL/2.

A Figura 8 mostra o efeito da administração oral do composto II, do composto III, do composto VII, ou da ciclofosfamida (controle positivo) em células do tumor primário LL/2. O composto II induz uma redução (T/C entre 53% e 74%) do crescimento do tumor. O composto III induz uma redução (T/C entre 67% e 96%) do crescimento do tumor. O composto VII induz uma redução (T/C entre 72% e 85%) do crescimento do tumor. A ciclofosfamida induz uma redução (T/C entre 50% e 67%) do crescimento do tumor.

Exemplo 19: Efeitos antitumor dos compostos num tumor pancreático PAN02

O PAN02 singênico é uma linha celular de tumor pancreático obtida do NCI (0507232). As células PAN02 foram crescidas em RPMI-1640 contendo soro bovino fetal a 10%. Ao dia 0, 50 μ L de $7,5 \times 10^5$ células PAN02 viáveis foram intradermicamente injetados para produzir tumores localizados em camundongos C57BL/6 com 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram depois monitorizados em série por palpação manual para evidência dos tumores. Os camundongos foram depois tratados todos os dias com administração oral do veículo (controle negativo), ou composto (50 mg/kg) e com injeção intraperitoneal de gemcitabina (50 mg/kg) ao dia 6 e ao dia 12. Os camundongos foram sacrificados ao dia 40. O volume do tumor em série foi obtido por medições do diâmetro bidimensional com paquímetros, usando a fórmula $0,4 (a \times b^2)$ onde "a" era o diâmetro principal do tumor e

"b" o diâmetro perpendicular menor. Os tumores eram palpáveis, em geral, de 3 dias a 5 dias após a inoculação.

A Figura 9 mostra o efeito da administração oral do composto I, do composto V, ou da gemcitabina (controle positivo) em células do tumor primário PAN02. Ambos os compostos I e V induzem uma fraca redução (T/C entre 17% e 67% e 40% e 84%, respectivamente) do crescimento do tumor. Além do mais, os efeitos de todos os compostos foram compatíveis com o padrão de ouro gemcitabina (T/C entre 52% e 77%), usado para a terapia do cancro pancreático.

Exemplo 20: Efeitos antitumor dos compostos num tumor da próstata humana de xenoenxerto PC-3

O tumor da próstata humana xenogénico PC-3 foi obtido do ATCC (CRL1435). As células PC-3 foram crescidas em RPMI-1640 contendo soro bovino fetal a 10%. Ao dia 0, 50 μ L de células PC-3 viáveis ($1,5$ a 2×10^6) foram intradermicamente injetados para produzir tumores localizados em camundongos CD1 nu/nu com 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram depois monitorizados em série por palpação manual para evidência dos tumores. Quando os tumores alcançaram um volume satisfatório, os camundongos foram randomizados, e depois tratados quatro, três, e três vezes por semana durante a primeira, segunda, e terceira semanas respetivamente com injeção intravenosa do veículo (controle negativo), de ciclofosfamida (controle positivo, 100 mg/kg), ou do composto (5 mg/kg). Os camundongos foram sacrificados entre o dia 56 e o dia 65. O volume do tumor em série foi obtido por medições do diâmetro bidimensional com paquímetros, usando a fórmula $0,4 (a \times b^2)$ onde "a" era o diâmetro principal do tumor e "b" o diâmetro perpendicular menor. Os tumores eram palpáveis, em geral, de 3 dias a 5 dias após a inoculação.

A Figura 10A mostra o efeito do composto II ou da ciclofosfamida no tumor da próstata humana de xenoinxerto PC-3. O composto I induz uma redução significativa (T/C entre 29% e 75%) do crescimento do tumor. A ciclofosfamida induz uma redução significativa (T/C entre 1% e 52%) do crescimento do tumor. Além do mais, o composto II demonstrou um efeito citostático (nenhum crescimento) até ao dia 42.

A Figura 10B mostra o efeito do composto II, da ciclofosfamida, ou da combinação do composto II e da ciclofosfamida no tumor da próstata humana de xenoinxerto PC-3. A ciclofosfamida induz uma redução significativa (T/C entre 8% e 31%) do crescimento do tumor. O tratamento da combinação do composto II e da ciclofosfamida resultou numa redução significativa (T/C entre 1% e 23%) seguida de regressão do tumor. O recrescimento do tumor foi mais rápido no grupo tratado com ciclofosfamida após terminação do tratamento ao dia 48.

A Figura 10C mostra a eficácia antitumor da administração oral do composto V com ou sem ciclofosfamida no tumor da próstata humana de xenoinxerto PC-3. A administração oral do composto V induz uma inibição significativa ($p < 0,05$) do volume do tumor com uma T/C entre 14% e 40%. A ciclofosfamida induz uma inibição significativa ($p < 0,05$) do volume do tumor com uma T/C entre 1% e 39%. Os camundongos tratados com a combinação de ciclofosfamida e a administração oral do composto V demonstraram uma inibição significativa ($p < 0,01$) do volume do tumor com uma T/C entre 1% e 40% acompanhada de regressão do tumor.

Atividade Anti-Inflamatória

Exemplo 21: Efeito dos compostos na apoptose induzida pelo FNT α na linha celular WEHI-13VAR

O efeito dos compostos na apoptose induzida pelo FNT α foi medido por um ensaio biológico padrão usando células WEHI-13VAR. Estas células sofrem apoptose quando são incubadas na presença do FNT α e actinomicina D. 2×10^4 células de WEHI-13VAR foram incubadas em RPMI suplementado com piruvato de sódio a 1% e SBF a 10%, durante a noite a 37°C para a aderência das células. As células foram depois cultivadas na presença de 1 μ g/mL de actinomicina D (para inibir a síntese proteica) e FNT α a 0,01 nM com ou sem compostos a 37°C. Após 16 hr a 24 hr, 50 μ L de uma solução de MTT a 2 mg/mL foram adicionados a cada poço e a placa foi depois incubada durante 4 hr a 37°C. Somente as células viáveis metabolizam o MTT para formar sal de formazano, o qual é detetável pela medição da absorvância a 570 nm. Após a incubação, a placa foi invertida para remover o meio e as células mortas. Foram adicionados 150 μ L de DMSO a cada poço para parar a reação e solubilizar o sal de formazano. A densidade ótica foi lida num leitor de microplacas Bio-Tek EL 800 UV. Uma diminuição na densidade ótica é evidência direta da apoptose das células induzida pelo FNT α . Os compostos foram também comparados com a atividade de um anticorpo neutralizante anti-FNT α .

A tabela 2 representa a percentagem de inibição pelo FNT α (apoptose) dos compostos testados no ensaio de proliferação celular WEHI-13VAR sensível ao FNT α e baseado em células. Os compostos demonstraram uma atividade inibidora pelo FNT α na gama de 40-80%. Em comparação, o anticorpo do FNT α demonstrou uma atividade inibidora pelo FNT α de 90-95%. Estes dados ilustram a capacidade dos compostos desta

invenção de inibirem a atividade apoptótica do FNT α em células WEHI-13VAR sensíveis ao FNT α .

Tabela 2. Efeito dos compostos na inibição pelo FNT α (apoptose).

Composto	Ensaio WEHI-13VAR (% de inibição da apoptose)			
	4 x 10 ⁻⁵ M	42 x 10 ⁻⁵ M	41 x 10 ⁻⁵ M	5 x 10 ⁻⁶ M
I	-	58,9	33,1	17,9
II	78,9	83,8	64,2	45,2
III	-	89,7	52,0	20,4
IV	47,2	31,6	13,1	3,7
V	75,9	51,9	22,2	8,2
VI	89,5	74,1	54,8	28,2
VII	118,1	99,9	65,8	30,0
VIII	55,6	48,1	35,6	17,0
IX	65,5	46,7	29,8	13,2
X	53,9	79,9	44,4	19,4
XI	35,0	23,7	14,6	9,9

Exemplo 22: Efeito dos compostos na produção do FNT α induzida por LPS na linha celular J774A.1 de camundongo. O efeito dos compostos na produção do FNT α foi medido por ELISA usando células J774A.1 estimuladas por LPS. As células J774A.1 foram cultivadas na presença ou ausência de LPS e do composto. As células foram cultivadas durante 24 h a 37°C e por conseguinte os sobrenadantes foram recolhidos para a determinação da concentração do FNT α por ELISA como recomendado pelo fabricante (BD Biosciences). Os dados foram analisados no *software* Excel da Microsoft e a concentração do composto que inibe 50% da produção do FNT α (CI₅₀) foi calculada usando *software* Prism.

A tabela 3 resume o efeito dos compostos na produção do FNT α induzida por LPS em células J774A.1

Tabela 3. Efeito dos compostos na produção do FNT α induzida por LPS.

Composto	CI ₅₀ (μ M)
I	29
V	13

Exemplo 23: Efeito dos compostos na produção da PGE₂ induzida por LPS na linha celular J774A.1 de camundongo

O efeito dos compostos na produção da PGE₂ foi medido por ELISA usando células J774A.1 estimuladas por LPS. As células J774A.1 foram cultivadas na presença ou ausência de LPS e do composto. As células foram cultivadas durante 24 h a 37°C e por conseguinte os sobrenadantes foram recolhidos para a determinação da concentração da PGE₂ por ELISA como recomendado pelo fabricante (GE Healthcare). Os dados foram analisados no *software* Excel da Microsoft e a concentração do composto que inibe 50% da produção da PGE₂ (CI₅₀) foi calculada usando *software* Prism.

A Figura 11 mostra o efeito do composto V na produção de PGE₂ em J774A.1 estimuladas por LPS. O composto V inibe a produção da PGE₂ com uma CI₅₀ de 2 μ M.

Exemplo 24: Efeito dos compostos na citotoxicidade das células, síntese do ADN, do ARN, e de proteínas dos leucócitos mononucleares do sangue periférico (LMSP)

Os LMSP foram obtidos do sangue periférico de voluntários saudáveis. O sangue foi submetido a centrifugação de gradiente com meio Linfólito-Poli (Cedarlane, Hornby, Canadá). A camada contendo os leucócitos mononucleares foi recolhida e as células lavadas três vezes em TFS. As células foram depois suspensas em RPMI (Gibco, Burlington, Canadá) suplementado com TFS a 10% (Hyclone, Logan, EUA). A viabilidade foi maior do que 99% como determinado por exclusão do azul de tripiano.

Os LMSP foram ressuspensos a 2×10^6 células/mL. 100 μ L de LMSP (2×10^5 células) foram incubados numa placa de microtitulação com 96 poços durante 48 hr na presença ou ausência do composto. As células foram desativadas ou estimuladas com concanavalina A (con A; células T) ou mitógeno da erva-do-cancro (MEC; células B). Após incubação, as células foram tratadas com MTT (citotoxicidade) ou pulsadas com 1 μ Ci de [^{3} H]-timidina (síntese do ADN), [^{3} H]-uridina (síntese do ARN), ou [^{3} H]-leucina (síntese de proteínas) durante 6 hr. As placas foram colhidas num Tomteck e contadas num contador Microbeta β .

A tabela 4 resume o efeito dos compostos na citotoxicidade das células, síntese do ADN, do ARN, e de proteínas em leucócitos mononucleares do sangue periférico (LMSP) humanos. Não foi observada citotoxicidade das células. No entanto, todos os compostos suprimem o ADN quando os LMSP são estimulados com con A, um mitógeno estimulando a proliferação das células T e com MEC, um mitógeno estimulando a proliferação das células B. A síntese do ARN é inibida nos LMSP quer em repouso, quer estimulados (con A e MEC). No entanto, somente os compostos I e II inibem a síntese de proteínas nos LMSP estimulados. Estes resultados sugerem uma supressão de ambas as células T e B. Estas células estão fortemente implicados em doenças inflamatórias tais como doenças autoimunes.

Tabela 3. Efeito dos compostos na citotoxicidade, síntese do ADN, do ARN, e de proteínas dos LMSP em repouso ou estimulados

Composto	LMSP (Resultados da CI ₅₀ em µM)											
	Citotoxicidade			Síntese do ADN			Síntese do ARN			Síntese de Proteínas		
	Em repouso	Con A	MEC	Em repouso	Con A	MEC	Em repouso	Con A	MEC	Em repouso	Con A	MEC
I	> 10	> 10	> 10	> 10	3,7	2,8	6,8	nd	2,2	> 10	4,4	9,9
II	> 10	> 10	> 10	> 10	2,9	1,7	5,8	nd	1,1	> 10	6,4	5,7
V	> 10	> 10	> 10	> 10	8	6,1	7,4	6	4,5	> 10	> 10	> 10

nd = não determinada

Exemplo 25: Efeitos dos compostos no lúpus eritematoso sistêmico (LES)

Camundongos da Nova Zelândia do cruzamento híbrido F1 NZB x NZW desenvolvem a maioria das anormalidades autoimunes vistas no LES humano e morrem de glomerulonefrite tipo LES mediada pelo complexo imune (CI). Os camundongos desenvolvem altos títulos de anticorpos anti-ADN (de cadeia dupla e de cadeia simples) e do extrato nuclear (EN), bem como manifestações clínicas relacionadas com o LES incluindo leucopenia, trombocitopenia, proteinúria, e glomerulonefrite. Estes camundongos desenvolvem anticorpos anti-ADN após a idade de três meses, com um pico da resposta de anticorpos anti-ADN ocorrendo aos sete meses. Subsequentemente, a concentração no soro dos anticorpos anti-ADN diminui, presumivelmente como uma consequência da uremia progressiva. As primeiras manifestações serológicas da doença ocorrem a cerca de 150 dias (*i.e.*, cinco meses). A sua sobrevivência é avaliada a aproximadamente 250 dias.

A Figura 12 mostra o efeito do composto I na mortalidade dos camundongos NZB x NZW. A administração intravenosa do composto ou veículo foi realizada uma vez por semana da semana 10 à semana 46. Os resultados indicam que o composto I reduz a mortalidade dos camundongos NZB x NZW.

Exemplo 26: Efeitos dos compostos na hipersensibilidade do tipo atrasada (HTA)

Os compostos foram testados quanto à sua capacidade de tratar a hipersensibilidade do tipo atrasada (HTA) induzida por oxazolona em camundongos. No dia 0, os camundongos foram sensibilizados com 100 μ L de oxazolona em acetona a 5%. No dia 0, no dia 1, e no dia 2, os camundongos foram tratados por administrações intravenosa (IV) ou oral (PO) do veículo (controle) ou metotrexato (MTX; controle positivo/IV) ou hidrocortisona (controle positivo/PO) ou o composto a uma concentração menor do que ou igual a 50 mg/kg ou como especificado. Os camundongos foram desafiados com uma aplicação de 50 μ L de oxazolona na superfície do ouvido direito (primeiro desafio, dia 3; segundo desafio, dia 10). A espessura do ouvido foi medida do dia 4 ao dia 7, e do dia 11 ao dia 14. Foram também observadas vermelhidão e formação de crostas. Os camundongos foram sacrificados no dia 14. As células T_{HTA} (CD4) desempenham um papel importante na regulação da intensidade da resposta da HTA. Os compostos podem exercer uma influência inibidora na resposta da HTA através da sua inibição da ativação das células T e da síntese do ADN, do ARN, e/ou de proteínas.

Como mostrado na Figura 13A, a administração intravenosa (25 mg/kg) do composto I induz uma redução significativa da inflamação induzida após o primeiro desafio de oxazolona como visto pela espessura do ouvido diminuída. Além do mais, a inibição da inflamação induzida pelo composto I foi comparável aos resultados obtidos por uma dose imunossupressora de metotrexato. A administração intravenosa (25 mg/kg) do composto I induz uma redução significativa da inflamação induzida após o segundo desafio de oxazolona como visto pela espessura do ouvido diminuída (Fig. 13B). Além do mais, a inibição da inflamação induzida pelo composto I foi comparável aos resultados obtidos por uma dose imunossupressora de metotrexato.

Como mostrado na Figura 14A, a administração intravenosa (5 mg/kg) do composto II induz uma redução significativa da inflamação induzida após o primeiro desafio de oxazolona como visto pela espessura do ouvido diminuída. Além do mais, a inibição da inflamação induzida pelo composto II foi comparável aos resultados obtidos por uma dose imunossupressora de metotrexato. A administração intravenosa (5 mg/kg) do composto II induz uma redução significativa da inflamação induzida após o segundo desafio de oxazolona como visto pela espessura do ouvido diminuída (Fig. 14B). Além do mais, a inibição da inflamação induzida pelo composto II foi comparável aos resultados obtidos por uma dose imunossupressora de metotrexato.

Como mostrado na Figura 15, a administração oral (50 mg/kg) do composto IV ou do composto V induz uma redução significativa da inflamação como visto pela espessura do ouvido diminuída. Além do mais, a inibição da inflamação induzida pelo composto IV ou pelo composto V foi comparável ao resultado obtido por uma dose terapêutica (50 mg/kg) de hidrocortisona.

A Figura 16 mostra o efeito da administração oral de 50 mg/kg do composto III após o primeiro (Fig. 16A) e o segundo (Fig. 16B) desafios de oxazolona. O composto III induz uma redução significativa da inflamação como visto pela espessura do ouvido diminuída em ambos os desafios.

A Figura 17 mostra o efeito da administração intravenosa de 5 mg/kg ou de 25 mg/kg do composto X ou do composto XI, respectivamente, após o primeiro desafio de oxazolona. Os compostos IX e XI induzem uma redução significativa da inflamação como visto pela espessura do ouvido diminuída. Além do mais, a inibição da inflamação induzida pelo

composto X ou XI foi comparável aos resultados obtidos por uma dose imunossupressora de metotrexato.

Exemplo 27: Efeitos dos compostos na artrite induzida por adjuvante (AIA) de Freund

A AIA foi induzida em ratos fêmea de Lewis pela injeção de *Mycobacterium butyricum* liofilizada suspensa em óleo mineral na planta do pé. O desenvolvimento da artrite foi monitorizado ao longo de um período de 3 semanas após a injeção do adjuvante. A inflamação tem um pico ao dia 3 após a administração do adjuvante. A ativação imune aparece à volta do dia 10 ao dia 16. Os compostos foram oralmente administrados do dia -3 ao dia 21. O peso corporal foi registado. O índice de artrite, o qual é uma medida da inflamação (edema), da vermelhidão, e da rigidez das articulações, foi usado para monitorizar o desenvolvimento da doença. O grau de artrite foi determinado pela mediação de dois diâmetros perpendiculares dos tornozelos nos planos mediolateral e dorsoventral usando um paquímetro. A circunferência das articulações em milímetros é depois calculada usando uma fórmula geométrica.

Como mostrado na Figura 18, 100% dos animais desenvolveram sinovite rapidamente. Uma redução significativa na gravidade da artrite (índice inflamatório) foi observada por administração oral de indometacina (controlo positivo) do dia 1 ao dia 5 e por volta do dia 5 e seguintes. Uma redução similar do índice inflamatório foi também observada com os compostos do dia 1 ao dia 4 e por volta do dia 8 ao dia 16.

Exemplo 28: Efeito dos compostos no modelo de inflamação da bolsa de ar

Acredita-se que a inflamação induzida por LPS no modelo da bolsa de ar de rato mimetiza o processo patológico que

ocorre nas doenças das articulações tais como artrite. Isto é porque os tecidos conjuntivos formados ao longo da bolsa de ar são similares àqueles encontrados em doenças crônicas das articulações. A inflamação induzida por LPS e as doenças crônicas das articulações partilham outras características, incluindo PGE_2 marcadamente elevada, infiltração neutrófila, formação de citocinas, e dano no tecido.

Uma cavidade de ar foi produzida ao dia -6 por injeção subcutânea de 20 mL de ar estéril na área intraescapular das costas de ratos machos de Lewis (175 a 200 g). 10 mL adicionais de ar foram injetados na cavidade ao dia -3 para manter o espaço aberto. Ao dia 0, os compostos foram administrados intravenosamente e uma hora depois foi injetado lipopolissacarídeo (LPS: 2,5 mL de 2 $\mu\text{g/mL}$ em TFS) na bolsa para produzir uma reação inflamatória. Após 2 hr, 4 hr, ou 18 hr de tratamento com LPS, os animais foram eutanasiados por asfixia com CO_2 e 5 mL de TFS/heparina (10 U/mL)/indometacina (36 $\mu\text{g/mL}$) foram injetados na bolsa. O fluido da bolsa foi recolhido. O volume de exudados foi medido e o número de leucócitos presente nos exudados foi determinado com um contador de Coulter. A contagem diferencial foi determinada por coloração de Wright-Giemsa. A PGE_2 , o LTB_4 , o MCP, e o $\text{FNT}\alpha$ foram determinados nos exudados da bolsa por ELISAs específicas.

Como mostrado na Figura 19, a administração intravenosa do composto II ou do composto V induz uma inibição significativa da contagem de glóbulos brancos após indução pelo LPS. A contagem diferencial destes glóbulos brancos demonstrou mais do que 90% de neutrófilos como visto pela coloração de Wright-Giemsa. A inibição alcançada pelo composto II ou V foi similar à obtida do controlo positivo indometacina.

A Figura 20A mostra o efeito da administração intravenosa do composto II ou do composto V na produção do FNT α induzida pelo LPS (duas horas após indução) no modelo de rato da bolsa de ar. O composto V induz uma inibição significativa da produção do FNT α induzida pelo LPS. Mas quer o composto II, quer a indometacina aumentam a concentração do FNT α após duas horas após a indução pelo LPS.

A Figura 20B mostra o efeito da administração intravenosa do composto II ou do composto V na produção da PGE₂ induzida pelo LPS (duas horas após indução) no modelo de rato da bolsa de ar. O composto V e a indometacina induzem uma inibição significativa da produção da PGE₂ induzida pelo LPS. Mas foi observada uma inibição fraca e insignificante da produção da PGE₂ induzida pelo LPS com o composto II.

A Figura 20C mostra o efeito da administração intravenosa do composto II ou do composto V na produção do LTB₄ induzida pelo LPS (duas horas após indução) no modelo de rato da bolsa de ar. Os compostos II e V induzem uma fraca inibição da produção do LTB₄ induzida pelo LPS. Mas a indometacina não afetou a produção do LTB₄.

A Figura 20D representa o efeito da administração intravenosa do composto II ou do composto V na produção do MCP-1 induzida pelo LPS (duas horas após indução) no modelo de rato da bolsa de ar. O composto V induz uma fraca inibição da produção do MCP-1 induzida pelo LPS. Mas a indometacina induz um aumento significativo enquanto o composto II não tem influência na presença do MCP-1 nos exudados após duas horas após a indução pelo LPS.

Noutro conjunto de experiências, os exudados foram recolhidos após doze horas após a indução pelo LPS. A Figura 21A representa o efeito da administração intravenosa do composto II ou do composto V na produção do FNT α induzida pelo LPS. O composto V induz uma inibição significativa da produção do FNT α induzida pelo LPS. Mas o composto II não tem efeito na concentração do FNT α nos exudados após doze horas após a indução pelo LPS. A indometacina induz uma fraca inibição do FNT α nos exudados após doze horas após a indução pelo LPS.

A Figura 21B mostra o efeito da administração intravenosa do composto II ou do composto V na produção da PGE₂ induzida pelo LPS (doze horas após indução) no modelo de rato da bolsa de ar. O composto V ou a indometacina induz uma inibição significativa da produção da PGE₂ induzida pelo LPS. Mas foi observado um aumento fraco e insignificante da PGE₂ com o composto II.

Exemplo 29: Efeito do composto V na colite induzida pelo DNBS

O modelo de camundongo da colite experimental induzida pelo ácido 2,4-dinitrobenzenosulfónico (DNBS) serve com um modelo da doença inflamatória do intestino. No dia 0, camundongos CDI foram sensibilizados com DNBS por instilação intracolínica de 0,1 mL de uma solução etanólica (30%) de DNBS (40 mg/mL). O composto V foi administrado oralmente uma vez por dia durante quatro dias consecutivos a 25 mg/kg e 50 mg/kg, começando uma hora após sensibilização com DNBS. No quarto dia, os camundongos foram sacrificados e 8 cm do cólon distal foram recolhidos e abertos longitudinalmente para avaliação macroscópica.

O composto induziu um aumento fraco mas significativo do peso corporal ($p = 0,049$ a 25 mg/kg e $p = 0,038$ a 50 mg/kg)

comparado com o controlo negativo (veículo) sugerindo que os camundongos tratados estavam com melhor saúde. De facto, foi observada mortalidade no grupo de controlo mas não nos grupos tratados com o composto V.

Como mostrado na Figura 22, o composto V induziu uma diminuição forte e significativa na área de dano macroscópico induzido pelo DNBS do tecido mucosal do cólon ($p = 0,003$ a 25 mg/kg e $p = 0,012$ a 50 mg/kg) comparada com o controlo negativo (veículo).

Exemplo 30: Efeito do composto V na encefalomielite autoimune experimental

O modelo de camundongo da encefalomielite autoimune experimental (EAE) induzida pela PPL serve com um modelo de esclerose múltipla. No dia 0, camundongos SJL foram imunizados com 75 µg de PPL (139-141) emulsificada em adjuvante completo de Freund (200 µL de emulsão por camundongo s.c. dividida entre quatro locais) e com toxina pertussis (200 ng, i.p.). A injeção i.p. da toxina pertussis foi repetida no dia 2. O composto V foi administrado oralmente uma vez por dia a 25 mg/kg e 50 mg/kg, começando ao dia 0 e até 30 dias após a imunização, seis vezes por semana.

Os camundongos foram observados quanto a sinais clínicos da EAE até 30 dias após a imunização. A classificação clínica dos sintomas foi levada a cabo de acordo com a seguinte escala: 0 = nenhuma doença; 1 = cauda flácida; 2 = paraparésia moderada; 3 = paraparésia grave; 4 = estado moribundo; 5 = morte. Como mostrado na Figura 23, o composto V reduz de uma maneira dependente da dose o aparecimento de sinais da EAE. A 50 mg/kg, o composto V exibiu uma atividade significativa ($p = 0,048$) comparada com o controlo negativo (veículo).

Todas as modificações e substituições que caibam dentro do significado das reivindicações e da gama dos seus equivalentes legais como definido pelo Art. 69 EPC e pelo Protocolo sobre a Interpretação do Art. 69 EPC são para ser abrangidas pelo seu âmbito. Uma reivindicação usando a passagem "compreendendo" permite que a inclusão de outros elementos esteja dentro do âmbito da reivindicação.

Deve ser entendido que, de acordo com o Art. 69 EPC e com o Protocolo sobre a Interpretação do Art. 69 EPC, um elemento descrito nesta especificação não deve ser interpretado como uma limitação da invenção reivindicada a não ser que seja explicitamente mencionado nas reivindicações. Assim, as reivindicações são a base para a determinação do âmbito da proteção legal concedida em vez de uma limitação a partir da especificação que é lida nas reivindicações.

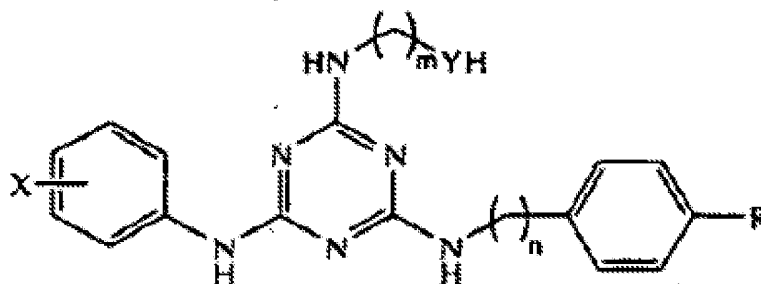
Todas as combinações e permutações possíveis dos elementos individuais divulgadas aqui que estão abrangidas pelo âmbito das reivindicações anexadas são consideradas como sendo aspetos da invenção; similarmente, as generalizações da descrição da invenção são consideradas como sendo parte da invenção.

A partir do acima mencionado, seria aparente a uma pessoa perita na técnica que a invenção pode ser realizada noutras formas específicas sem se afastar das suas características essenciais como especificado nas reivindicações anexadas. As formas de realização descritas devem ser somente consideradas como ilustrativas, não restritivas, porque o âmbito da proteção legal proporcionada para a invenção será indicado pelas reivindicações anexadas, as quais devem ser interpretadas em conformidade com o Art. 69 EPC e com o Protocolo sobre a Interpretação do Art. 69 EPC

Lisboa, 17 de Junho de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Um composto da seguinte fórmula:



em que X é F ou Cl;

Y é NH, O, ou S;

R é NH_2 , OH, SO_2NH_2 , $\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{H}$, $\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, ou CONH_2 ;

m é um número inteiro de 2 a 6; e

n é um número inteiro de 0 a 2 no qual um fragmento de dois carbonos ($n = 2$) inclui



2. O composto da reivindicação 1, em que:

X é F;

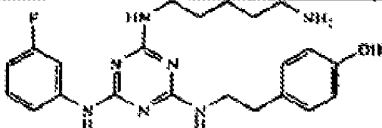
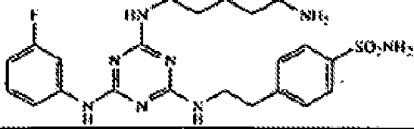
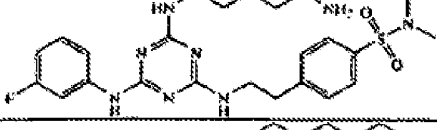
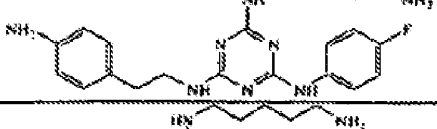
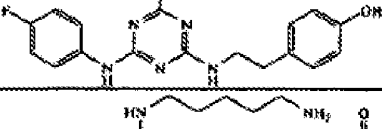
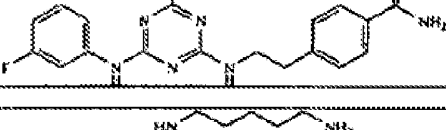
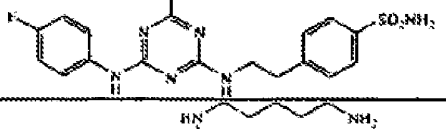
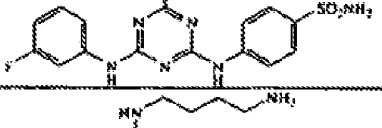
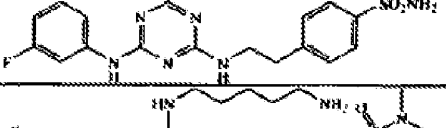
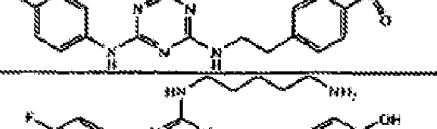
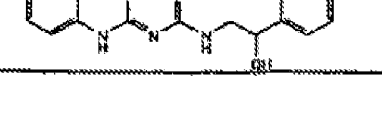
Y é NH ou O;

R é NH_2 , OH, SO_2NH_2 , $\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, ou CONH_2 ;

m é 4-6; e

n é 0 ou n é 2 quando Z é OH.

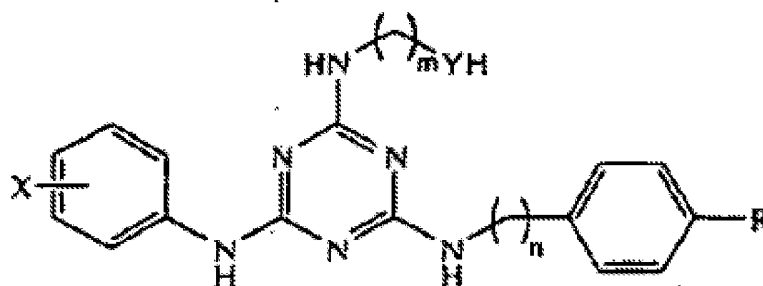
3. Um composto da reivindicação 1, o qual é selecionado do grupo consistindo em:

Composto	Estrutura
I	
II	
III	
IV	
V	
VI	
VII	
VIII	
IX	
X	
XI	

4. Uma composição farmacêutica compreendendo um ou mais compostos de qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e um transportador farmacêuticamente aceitável.
5. A composição da reivindicação 4, em que o transportador farmacêuticamente aceitável é selecionado do grupo consistindo em álcoois, solventes de poliol, e soluções aquosas de mono ou dissacarídeos.
6. A composição da reivindicação 4 ou 5, compreendendo adicionalmente um agente quimioterapêutico.
7. A composição da reivindicação 6, em que o agente quimioterapêutico é selecionado do grupo consistindo em decarbazina, doxorubicina, daunorrubicina, ciclofosfamida, vinblastina, vincristina, bleomicina, topotecano, irinotecano, taxotero, taxol, 5-fluorouracilo, gemcitabina, cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, satraplatina, e clorambucilo.
8. A composição da reivindicação 4 ou 5, compreendendo adicionalmente um agente terapêutico que bloqueia a ligação do FNT α ao seu recetor ou subsequente transdução de sinal.
9. A composição da reivindicação 4 ou 5, compreendendo adicionalmente um agente selecionado do grupo consistindo em metotrexato, um corticoesteroide anti-inflamatório, um fármaco anti-inflamatório não esteroide, e suas combinações.
10. Uso de um ou mais compostos de qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou de uma composição de qualquer

uma das reivindicações 4 a 7, para o fabrico de um medicamento para tratamento de um cancro.

11. Uso de um ou mais compostos de qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou de uma composição de qualquer uma das reivindicações 4, 5, 8 e 9, para o fabrico de um medicamento para tratamento de uma doença autoimune.
12. O uso de acordo com a reivindicação 1, em que a doença autoimune é doença de Crohn, doença inflamatória do intestino, ou esclerose múltipla.
13. Um composto de qualquer uma das reivindicações 1 a 3 para redução da inflamação num mamífero.
14. Um composto da seguinte fórmula:



em que X é F ou Cl;

Y é NH, O, ou S;

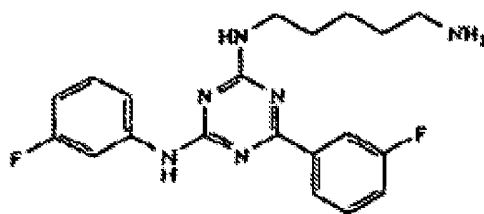
R é NH₂, OH, F ou Cl;

m é um número inteiro de 2 a 6; e

n é um número inteiro de 0 a 2

para o tratamento do cancro ou para o tratamento de uma doença autoimune num paciente humano com necessidade dele.

15. O composto da reivindicação 14, em que o referido composto é



Lisboa, 17 de Junho de 2013

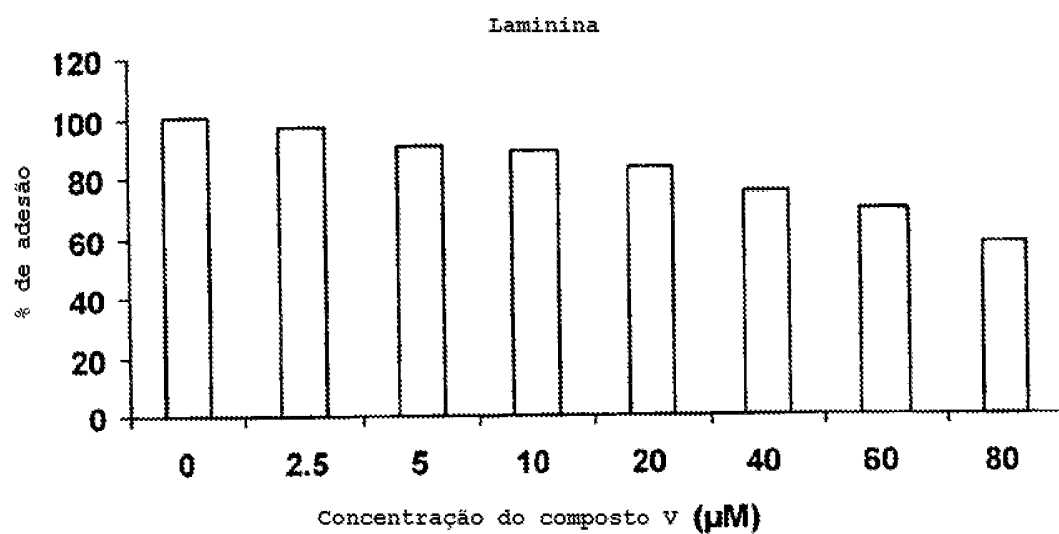


Figura 1A

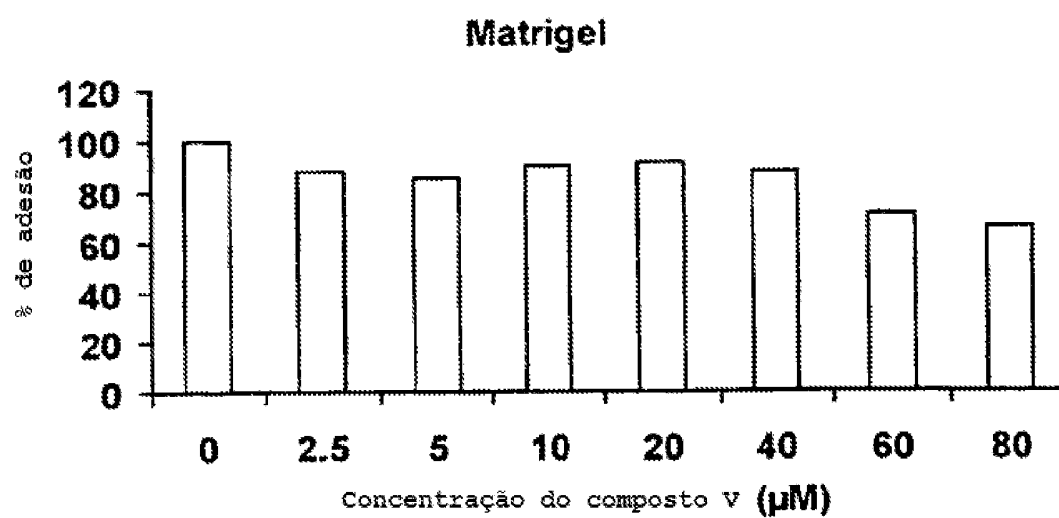


Figura 1B

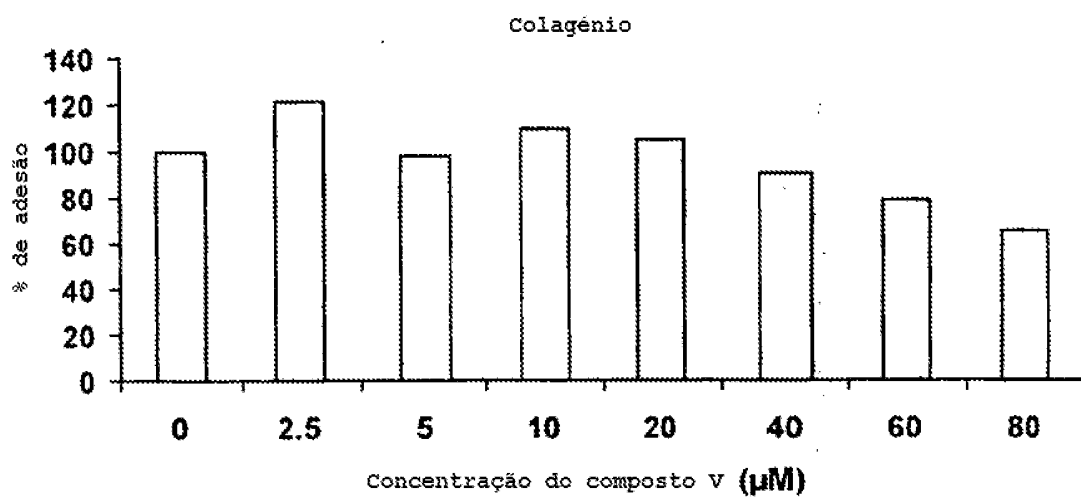


Figura 1C

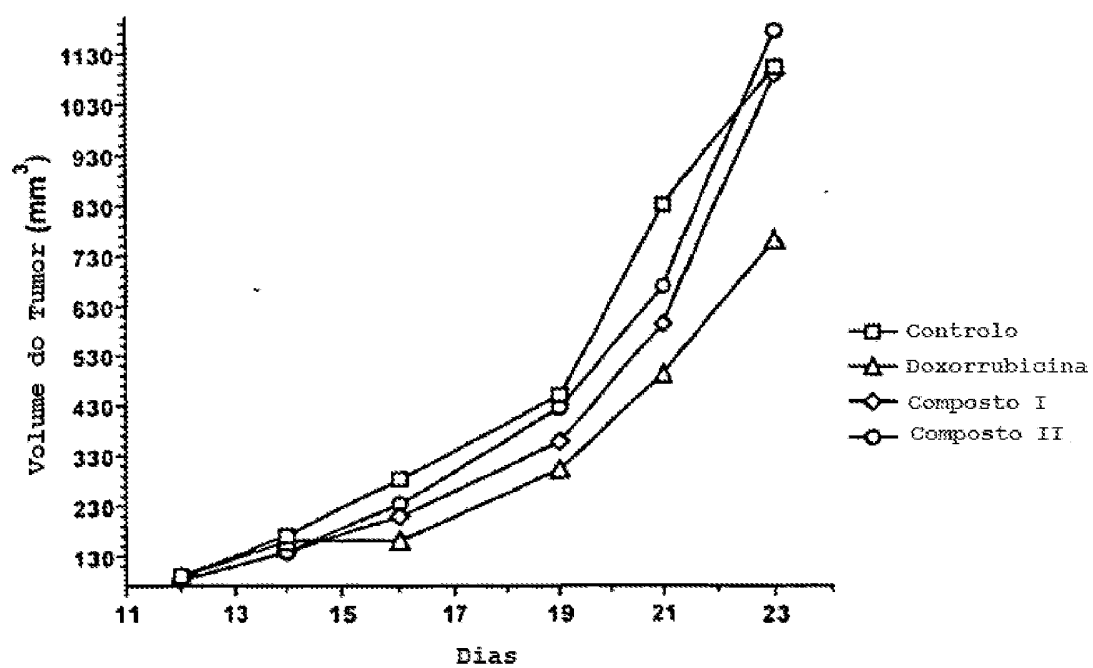


Figura 2A

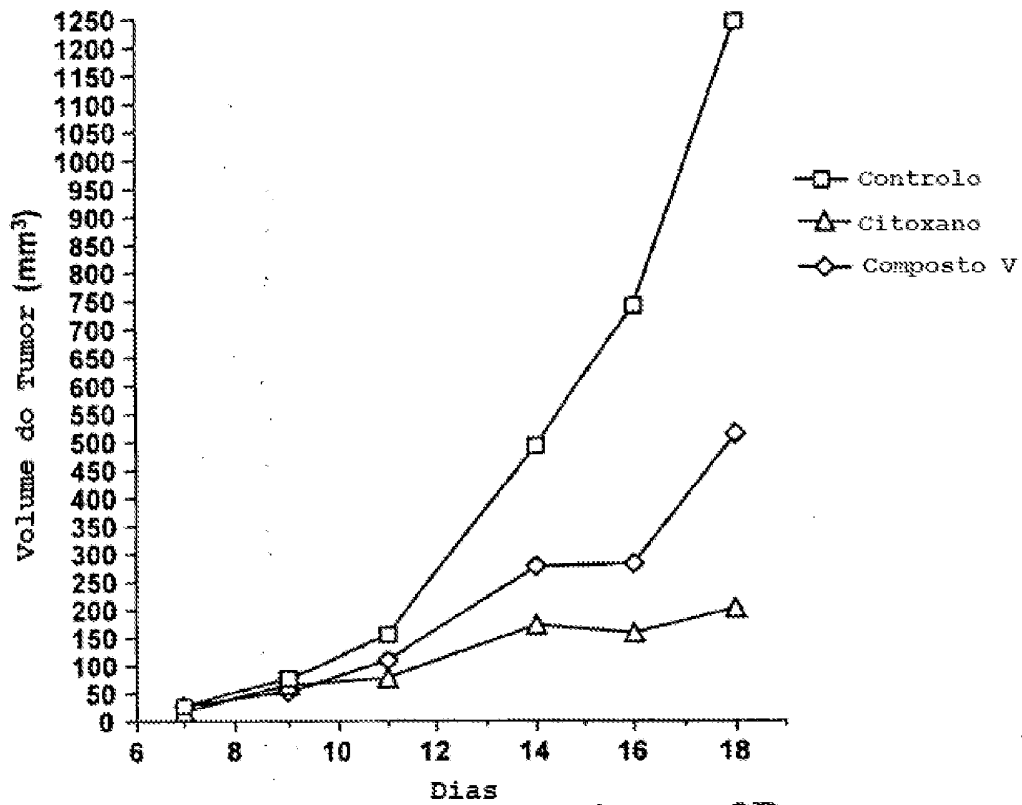


Figura 2B

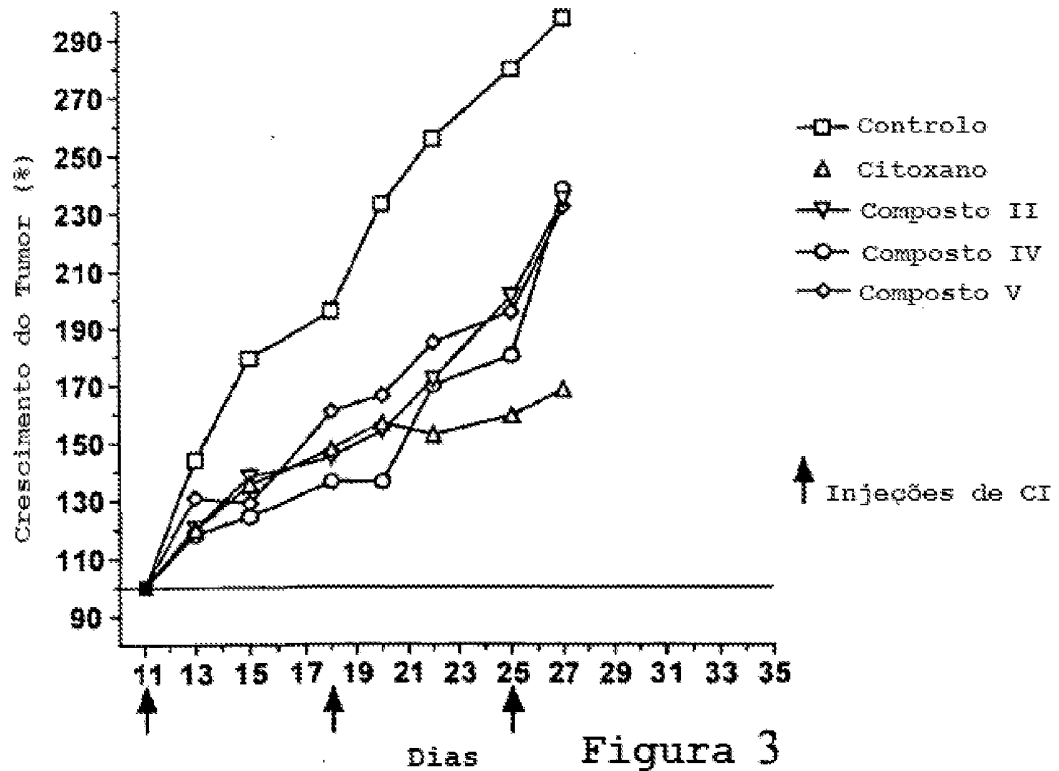


Figura 3

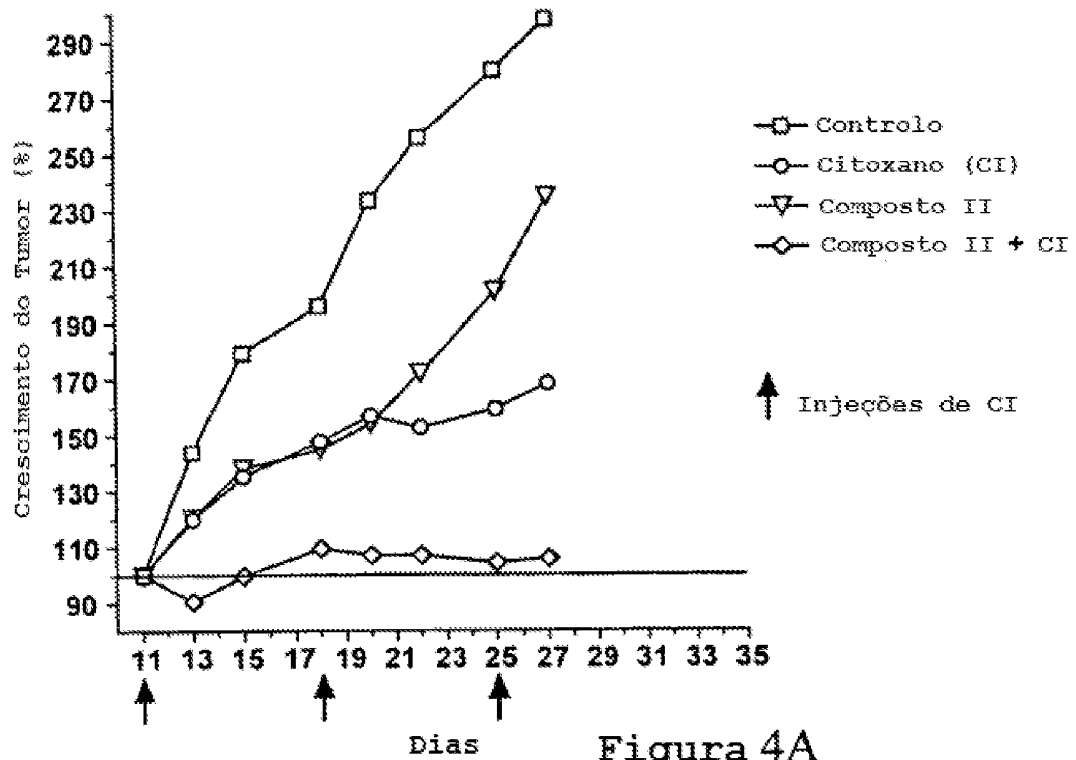


Figura 4A

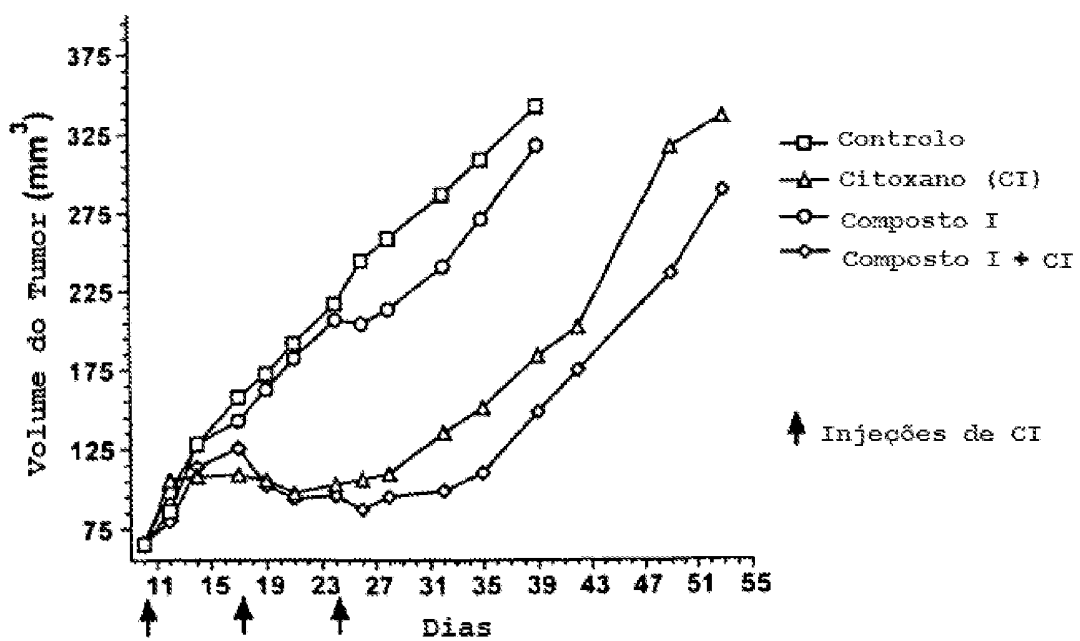


Figura 4B

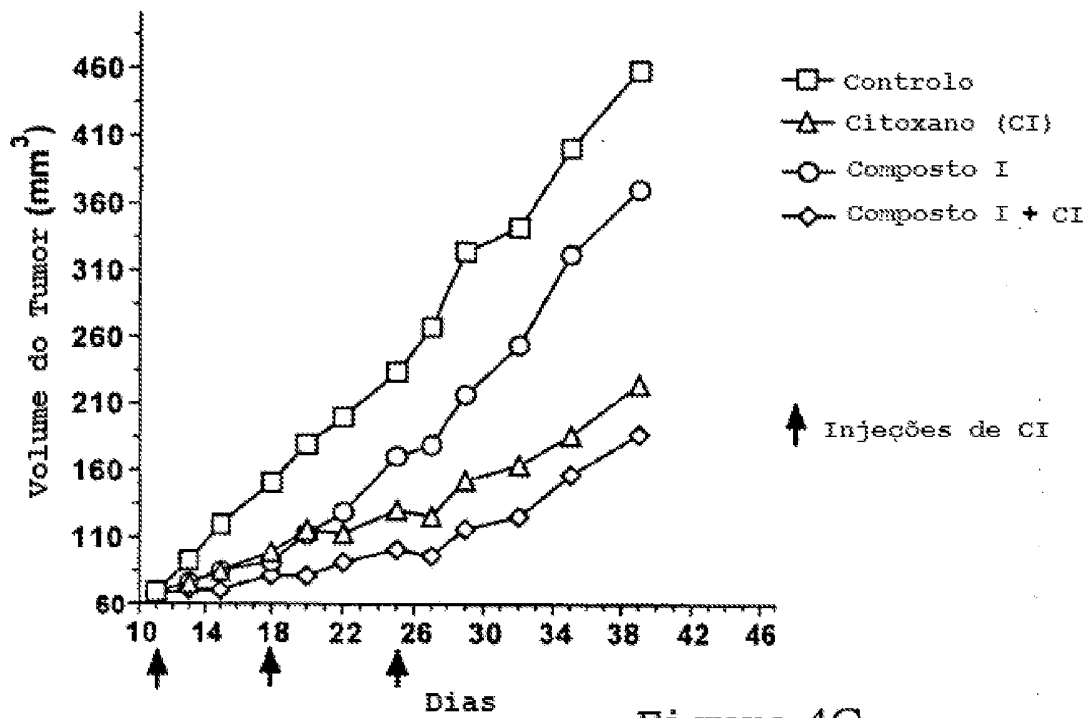


Figura 4C

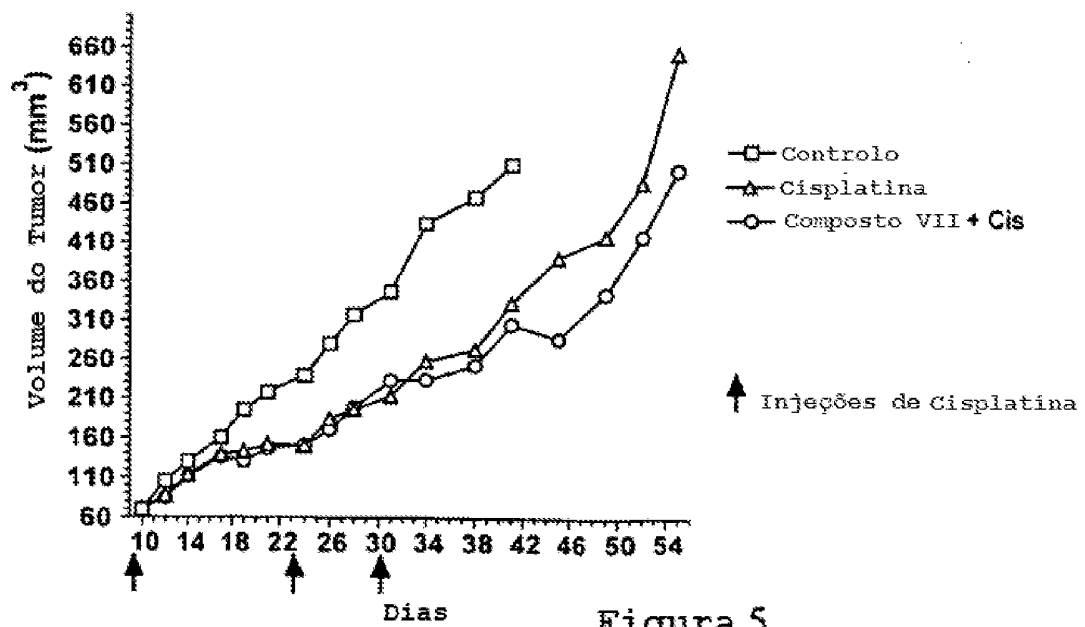


Figura 5

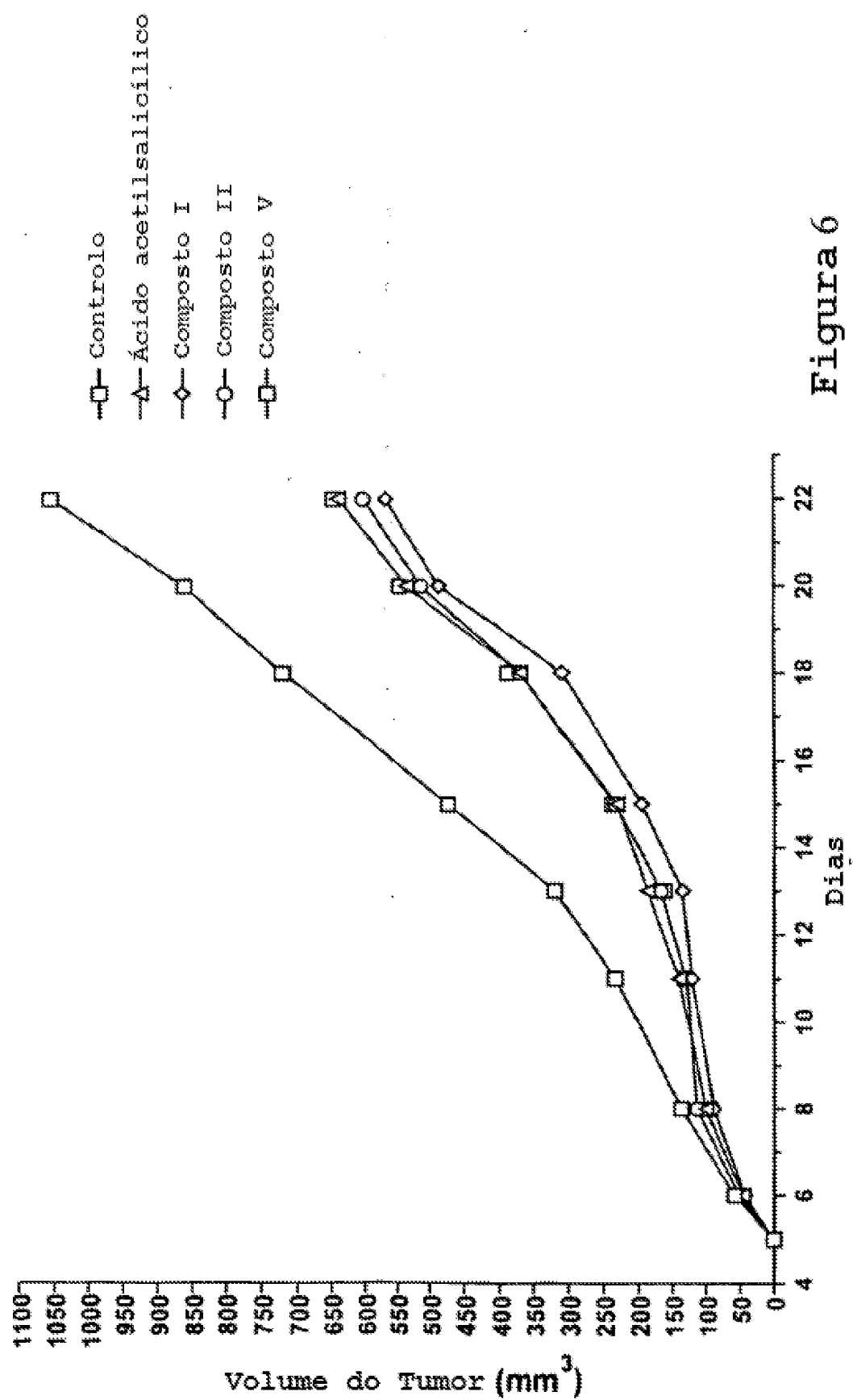


Figura 6

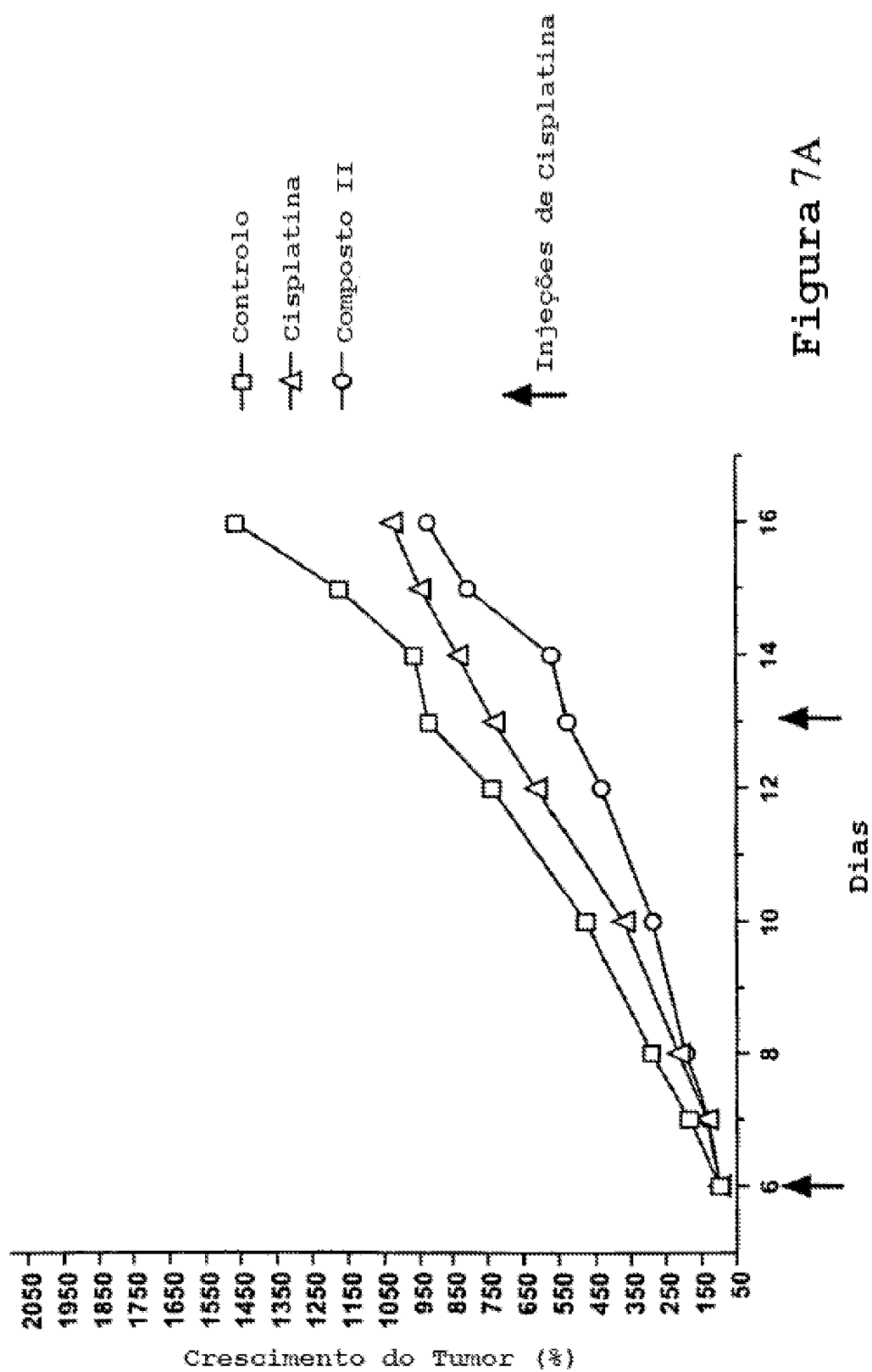


Figura 7A

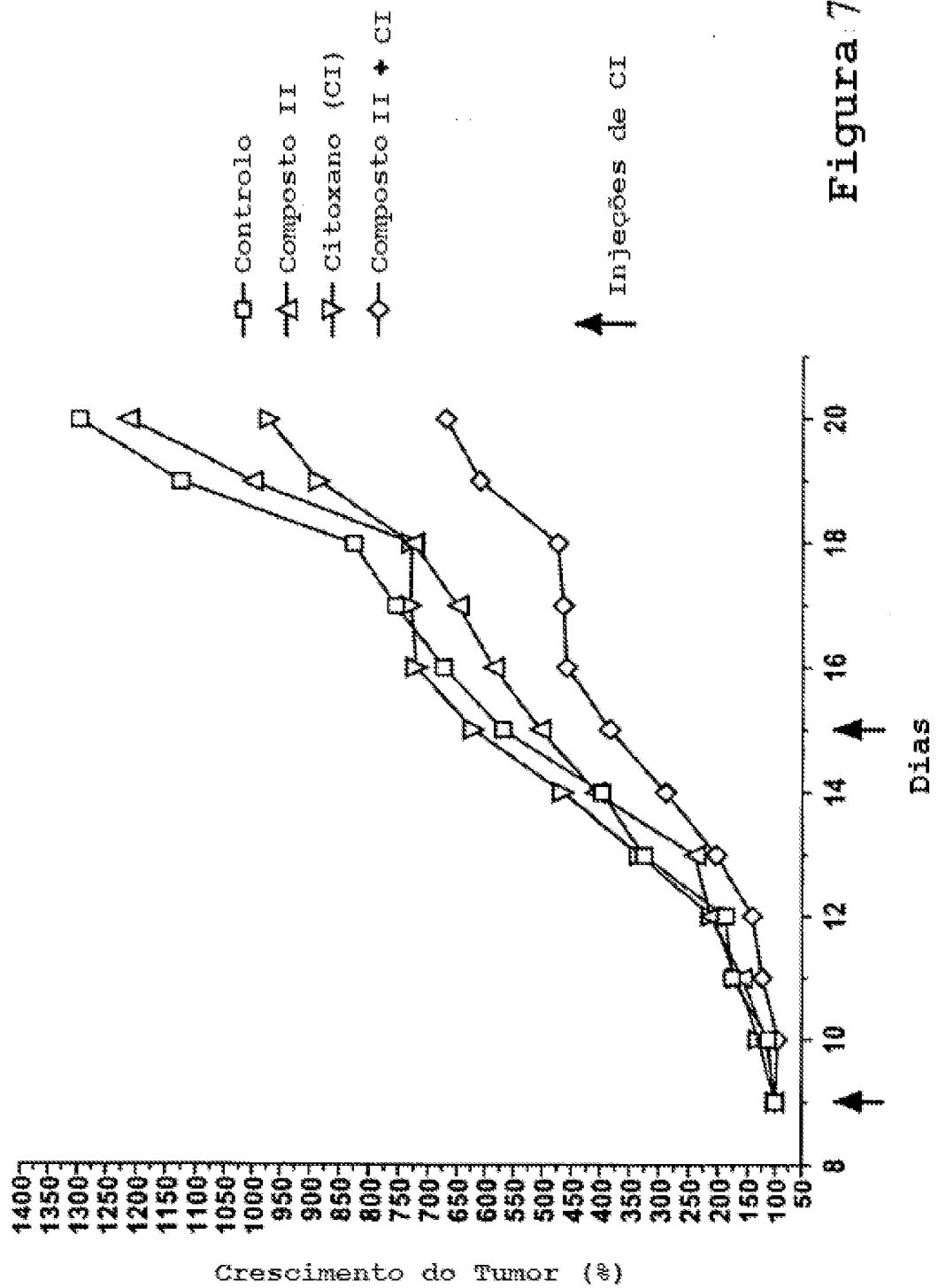


Figura 7B

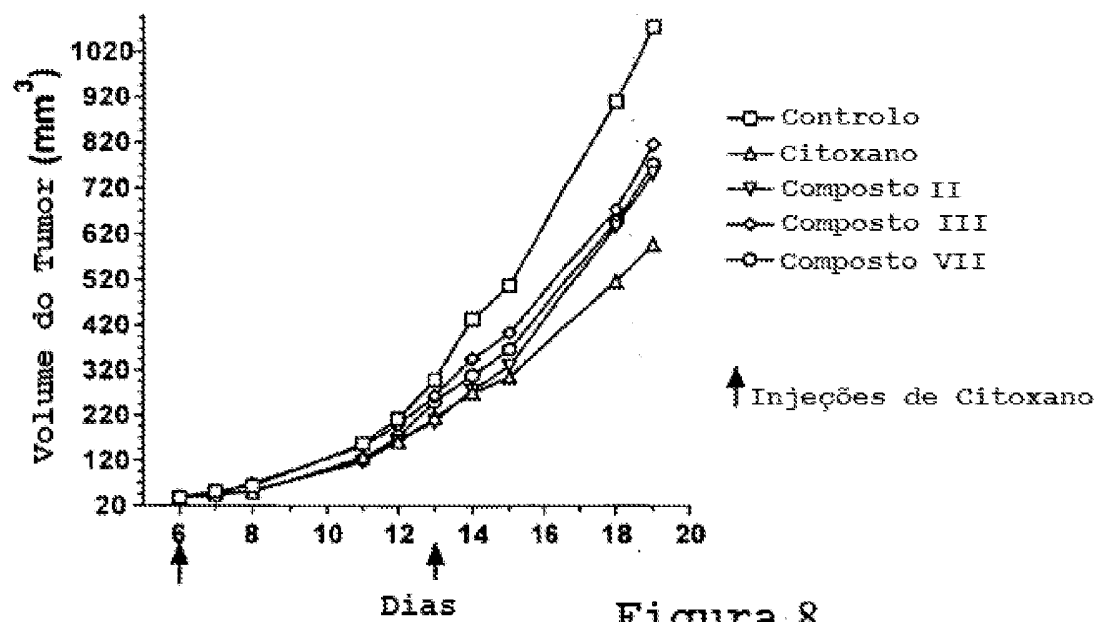


Figura 8

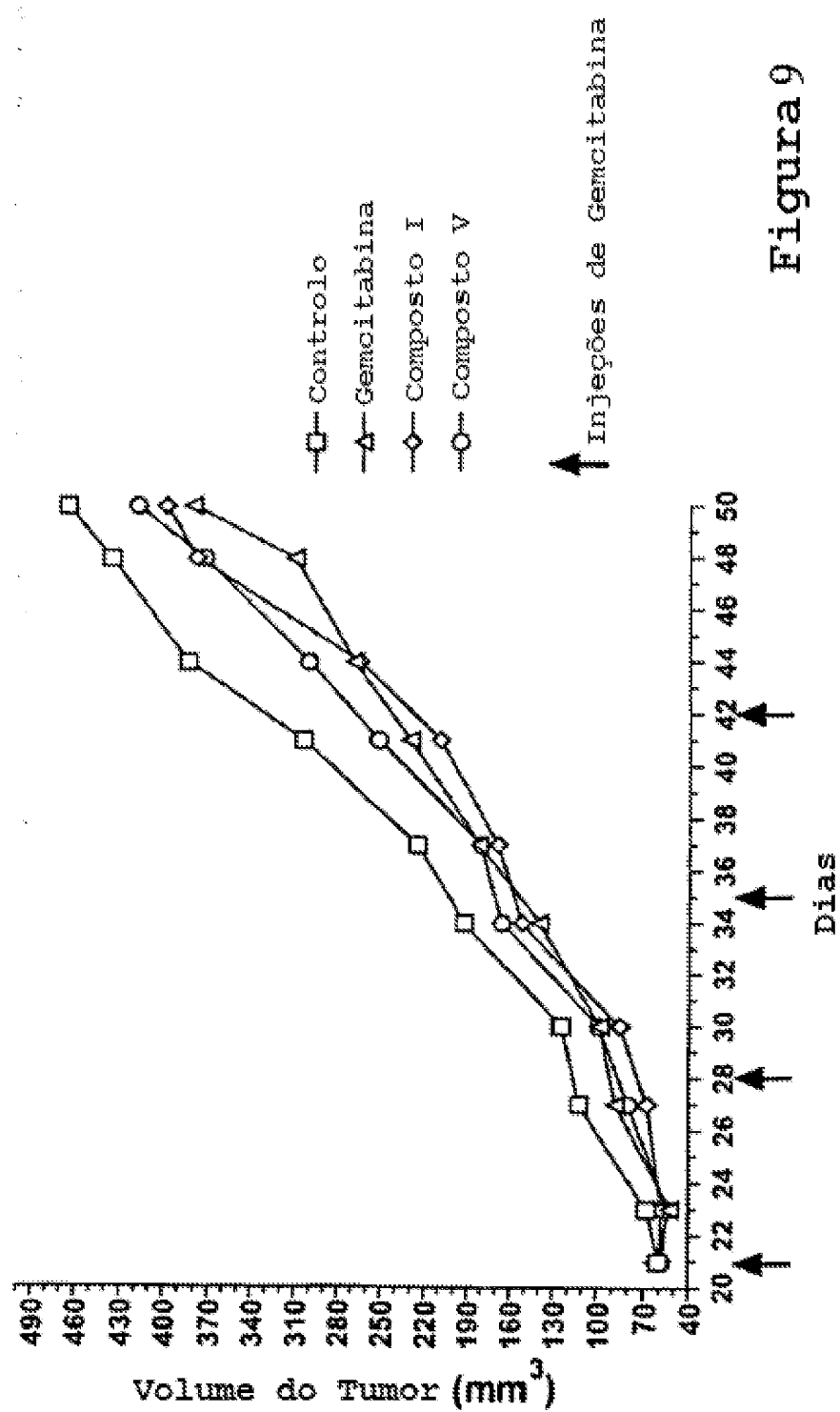


Figura 9

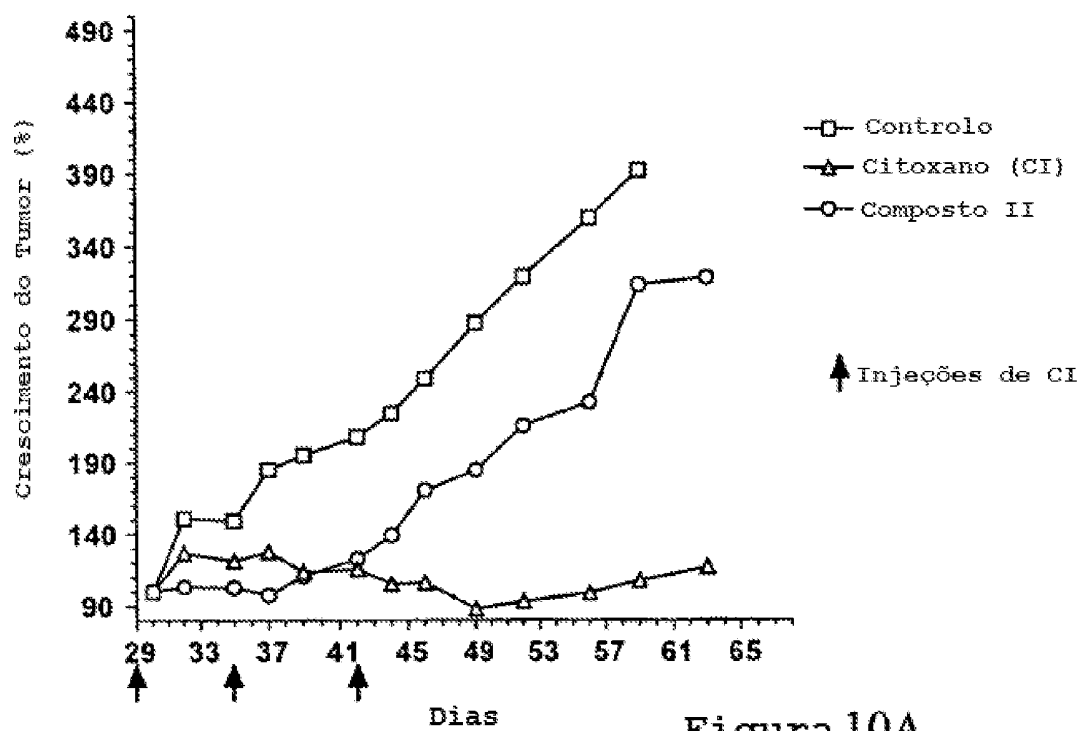


Figura 10A

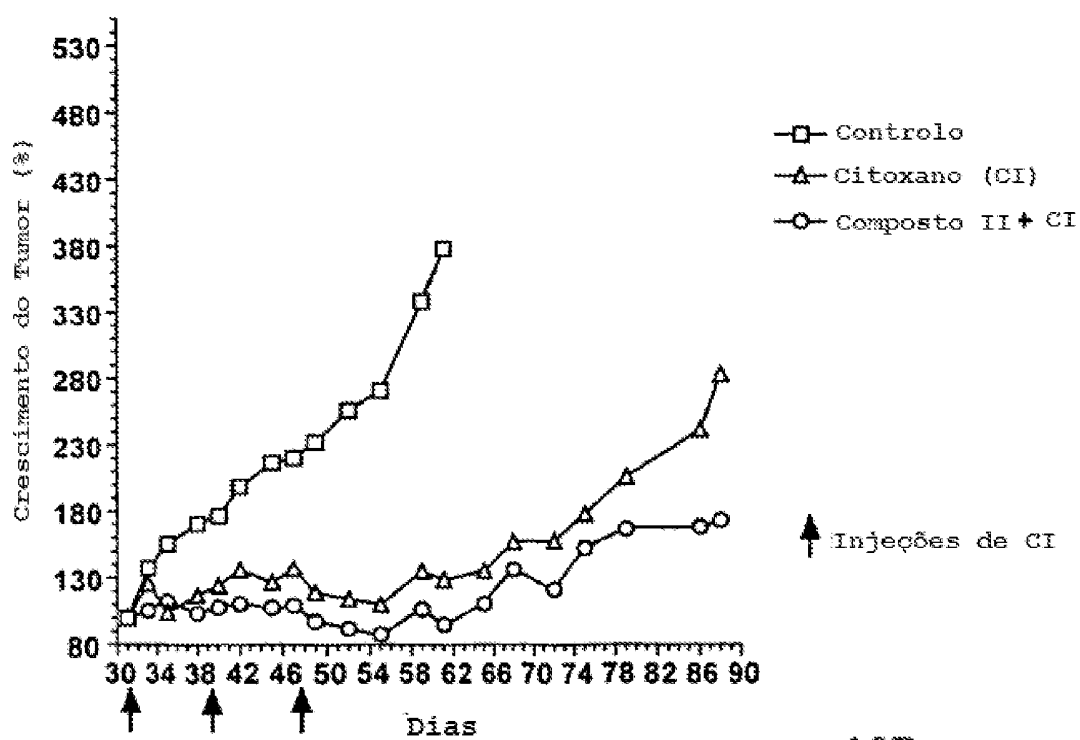


Figura 10B

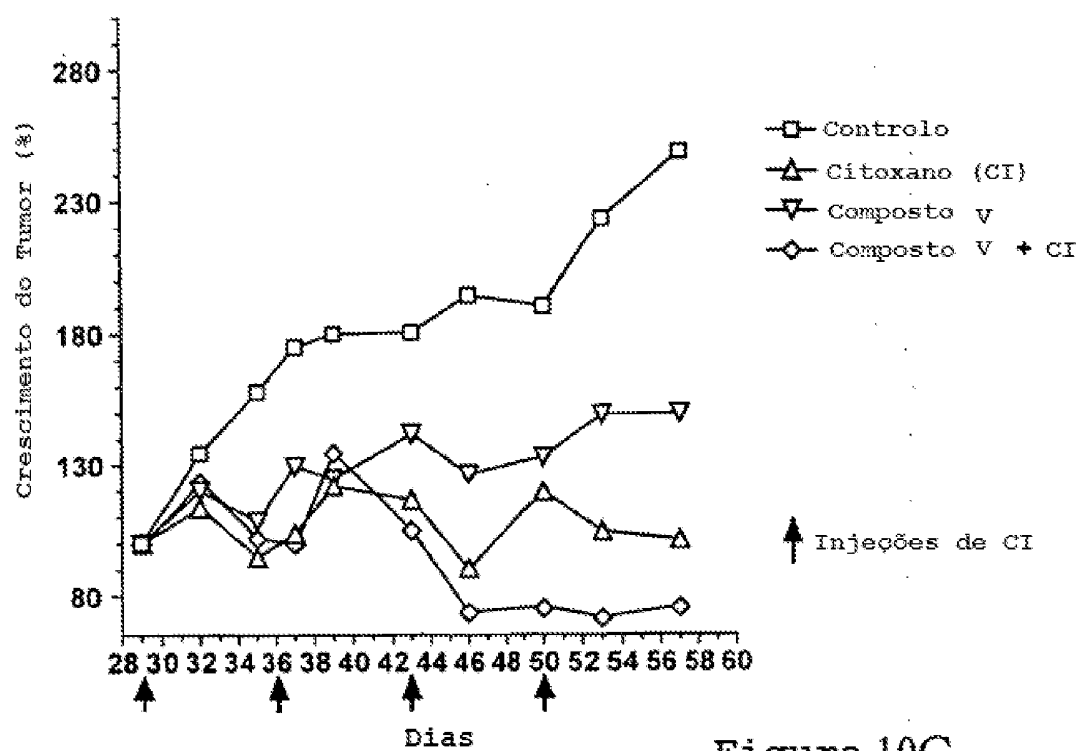


Figura 10C

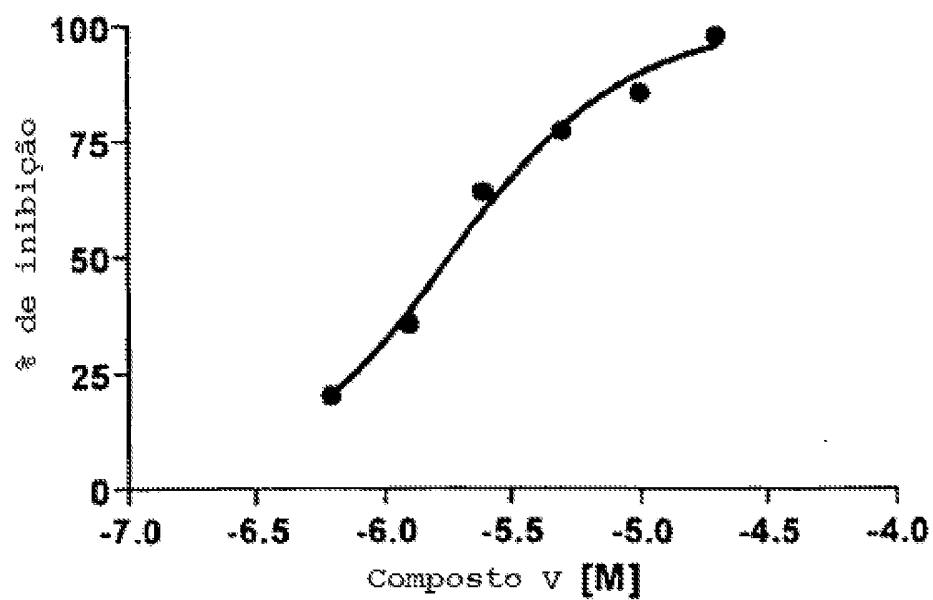
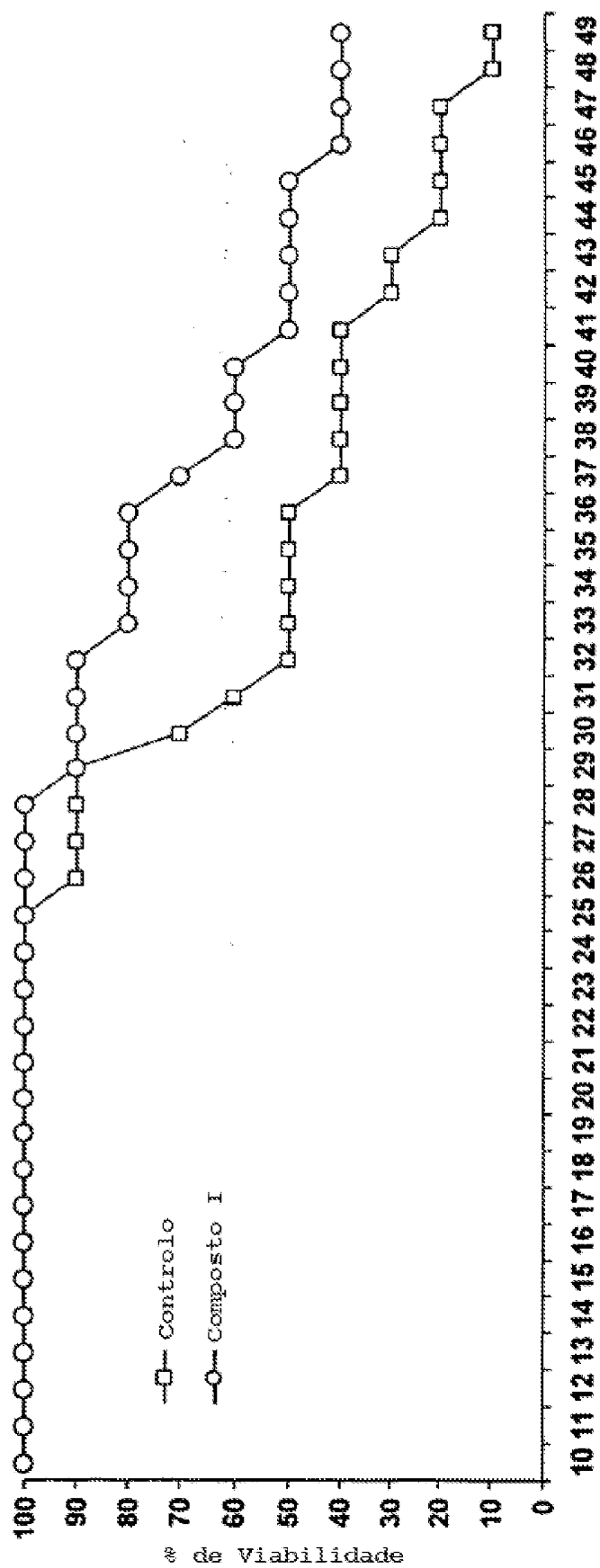


Figura 11



Semanas

Figura 12

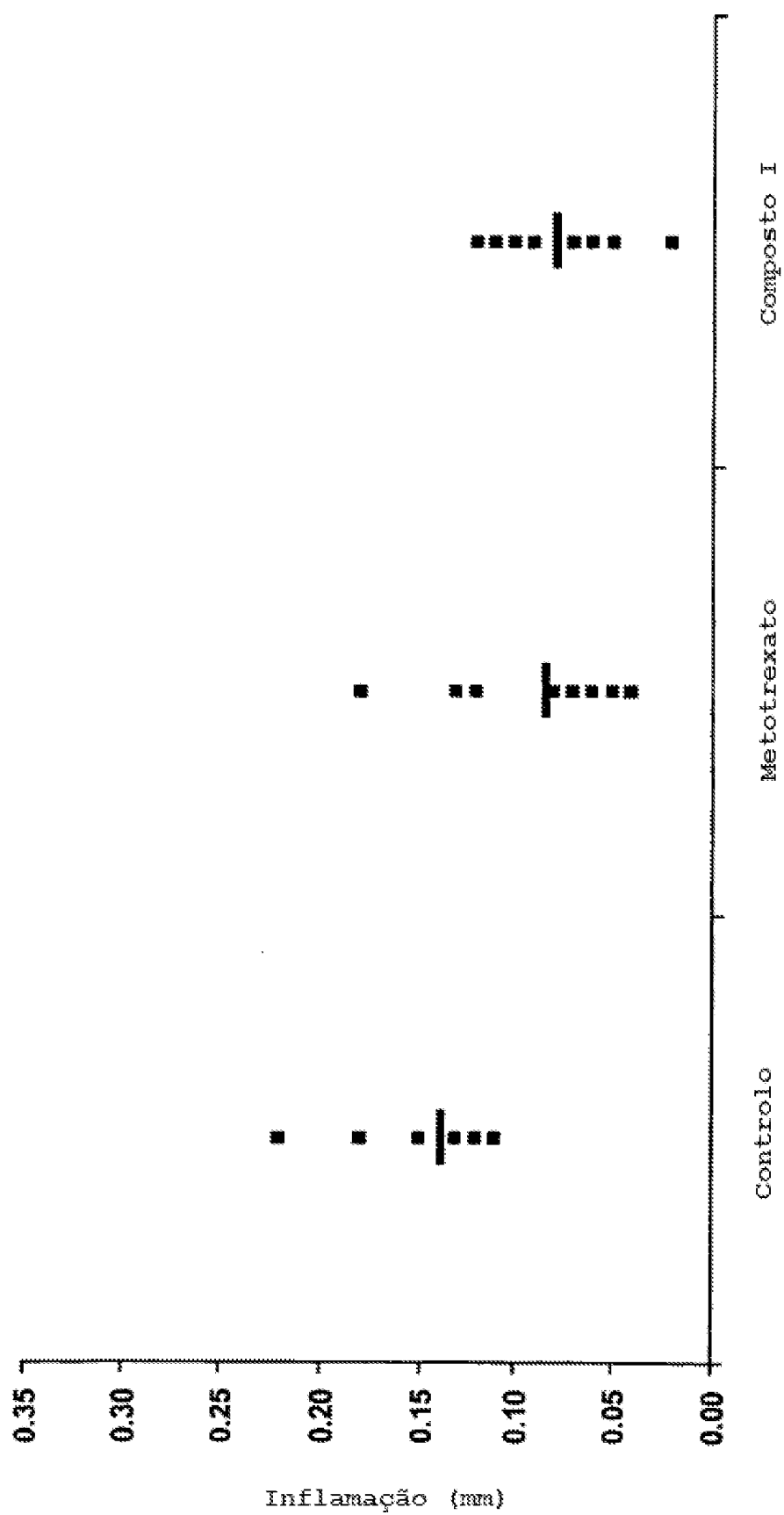


Figura 13A

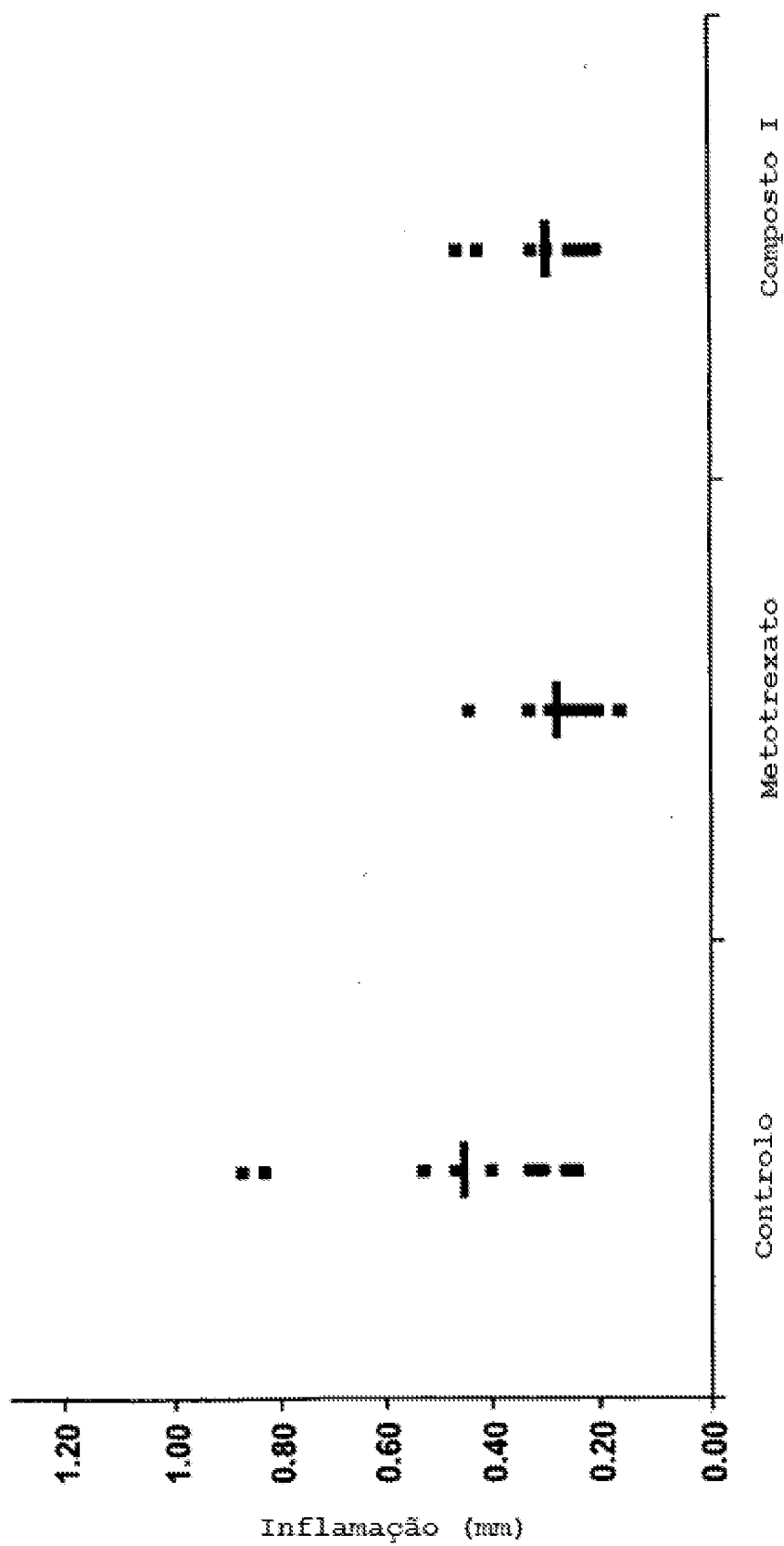


Figura 13B

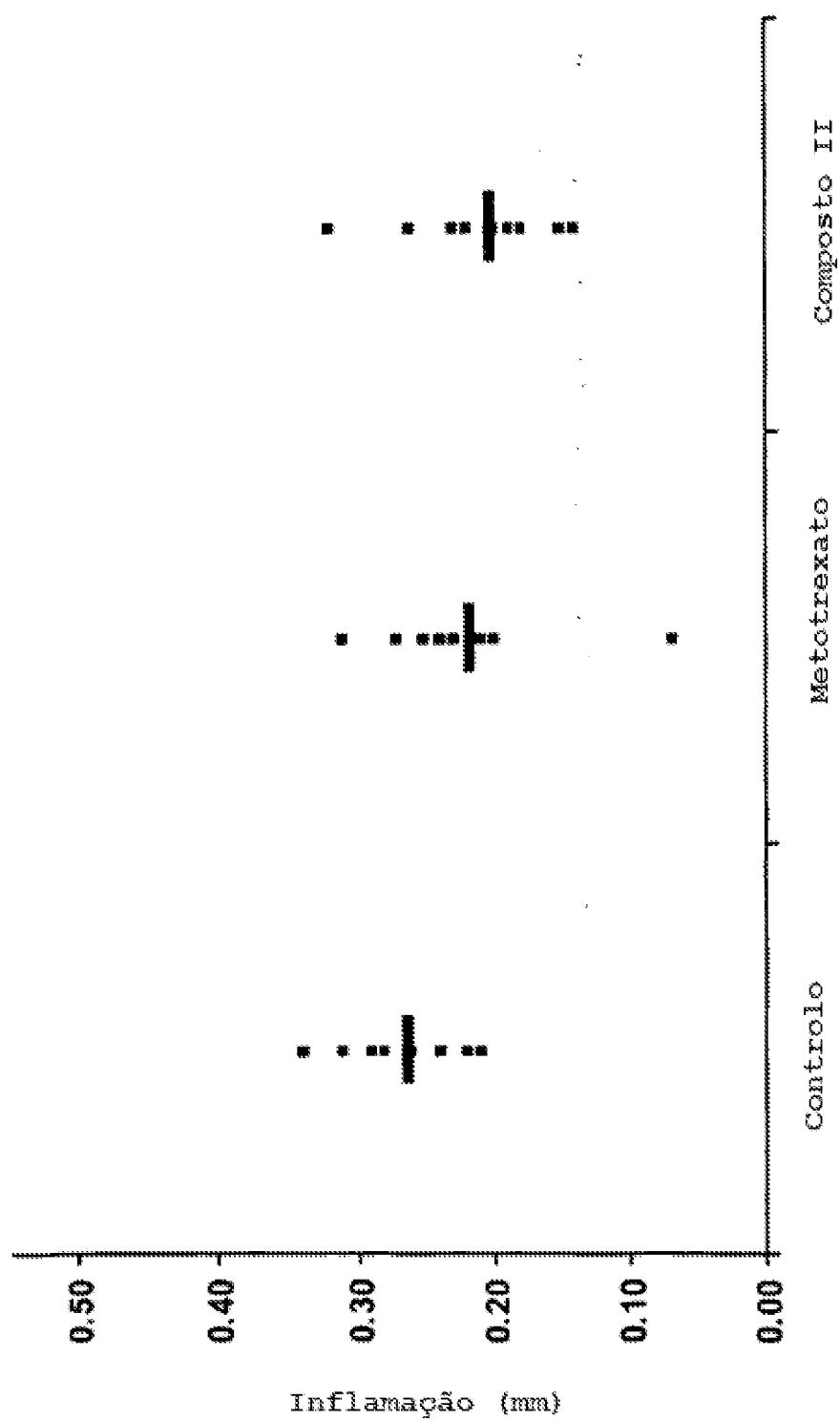


Figura 14A

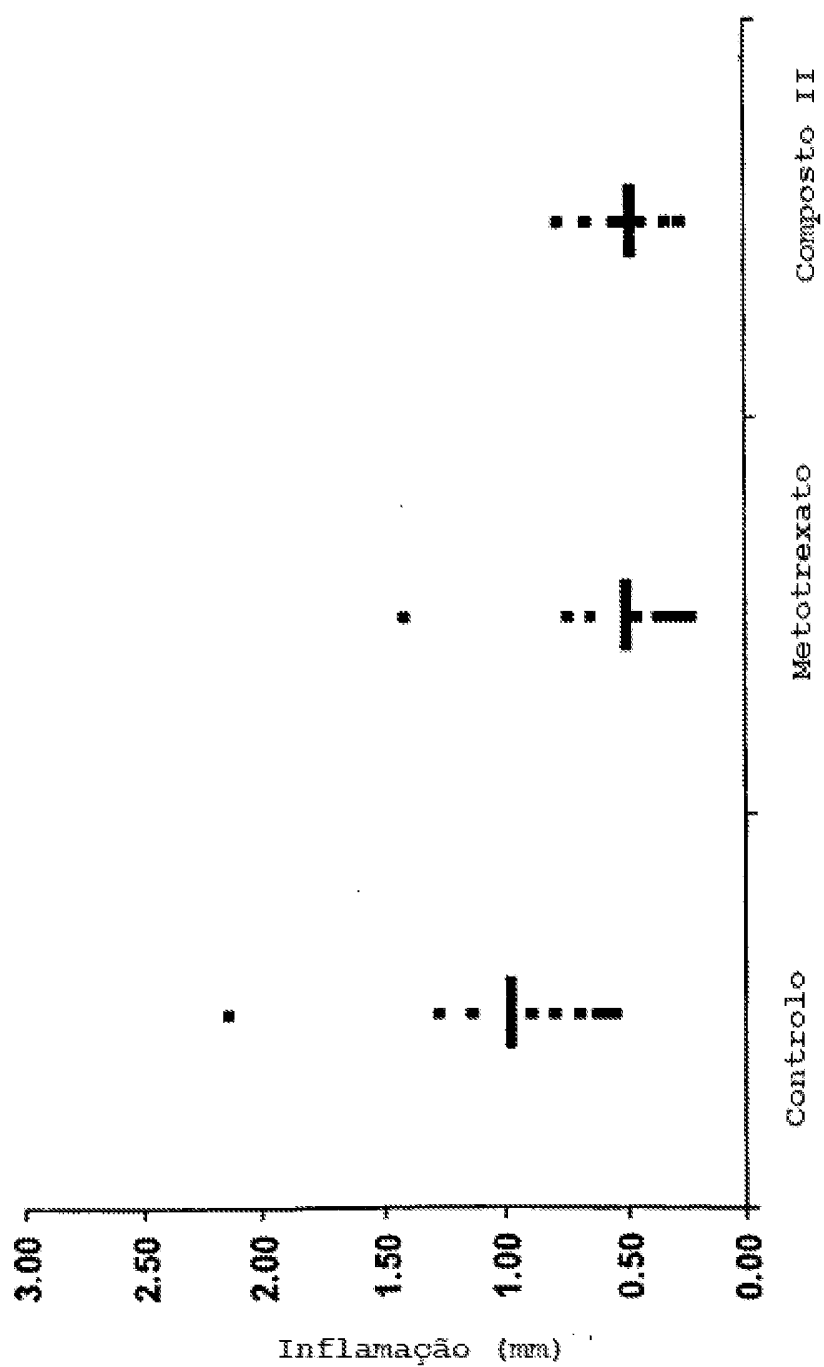


Figura 14B

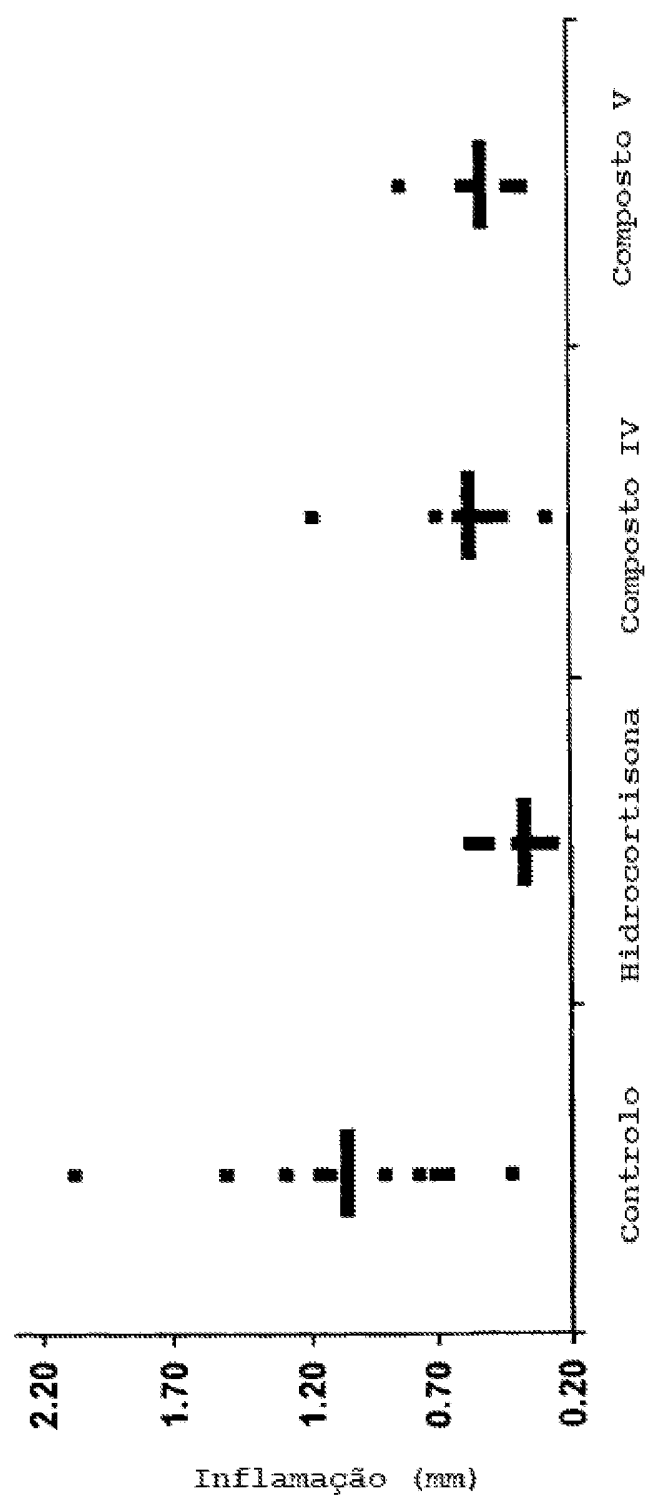


Figura 15

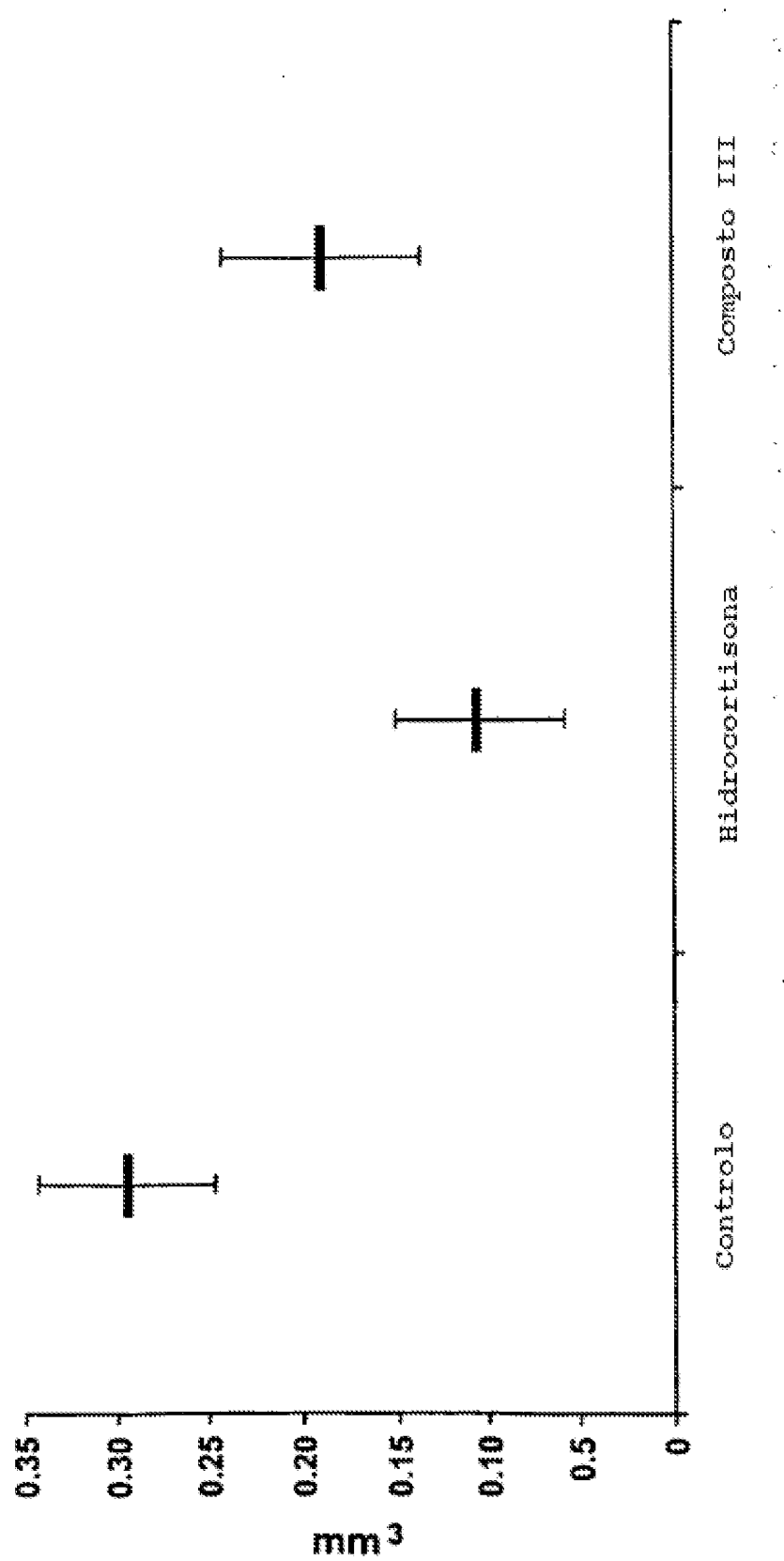


Figura 16A

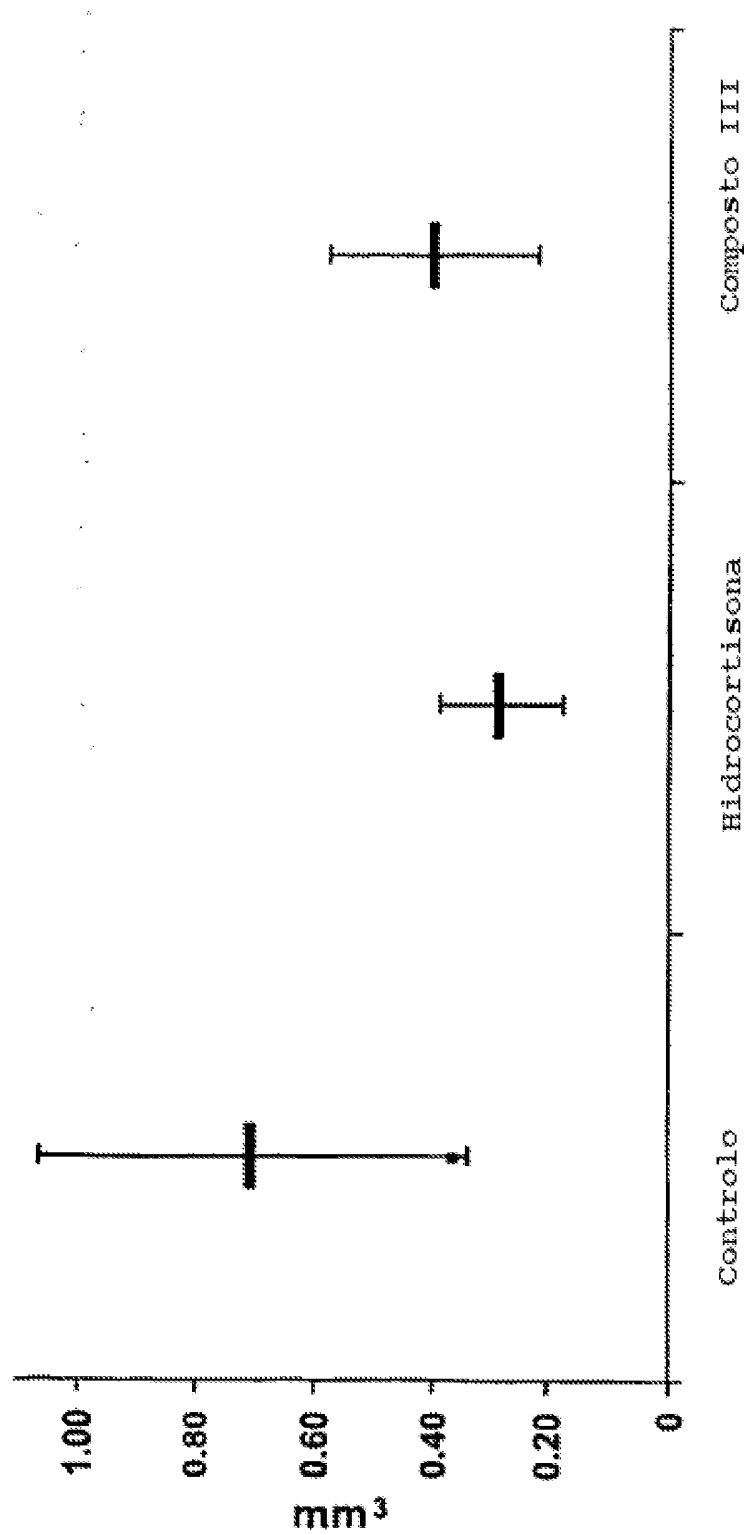


Figura 16B

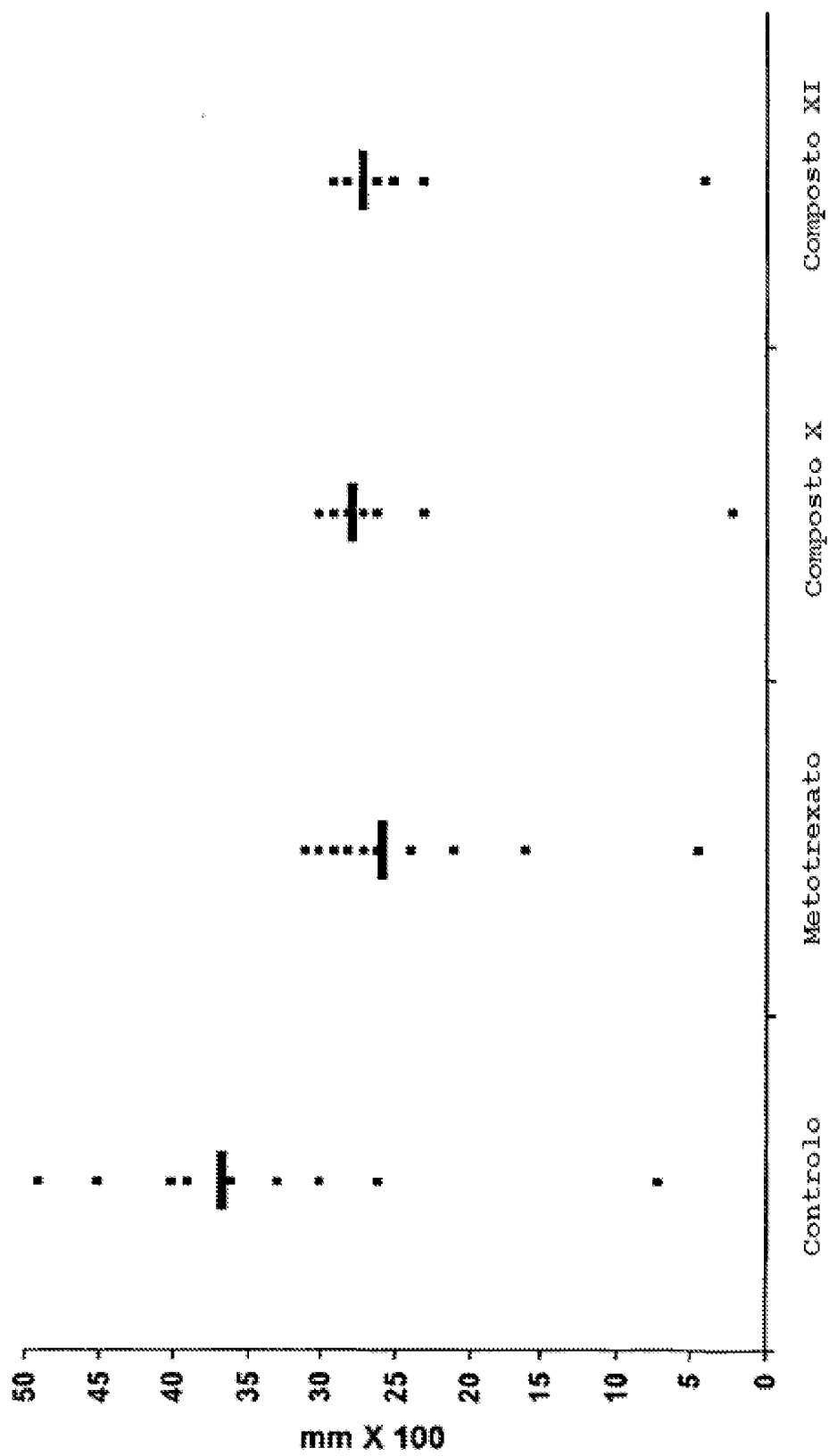


Figura 17

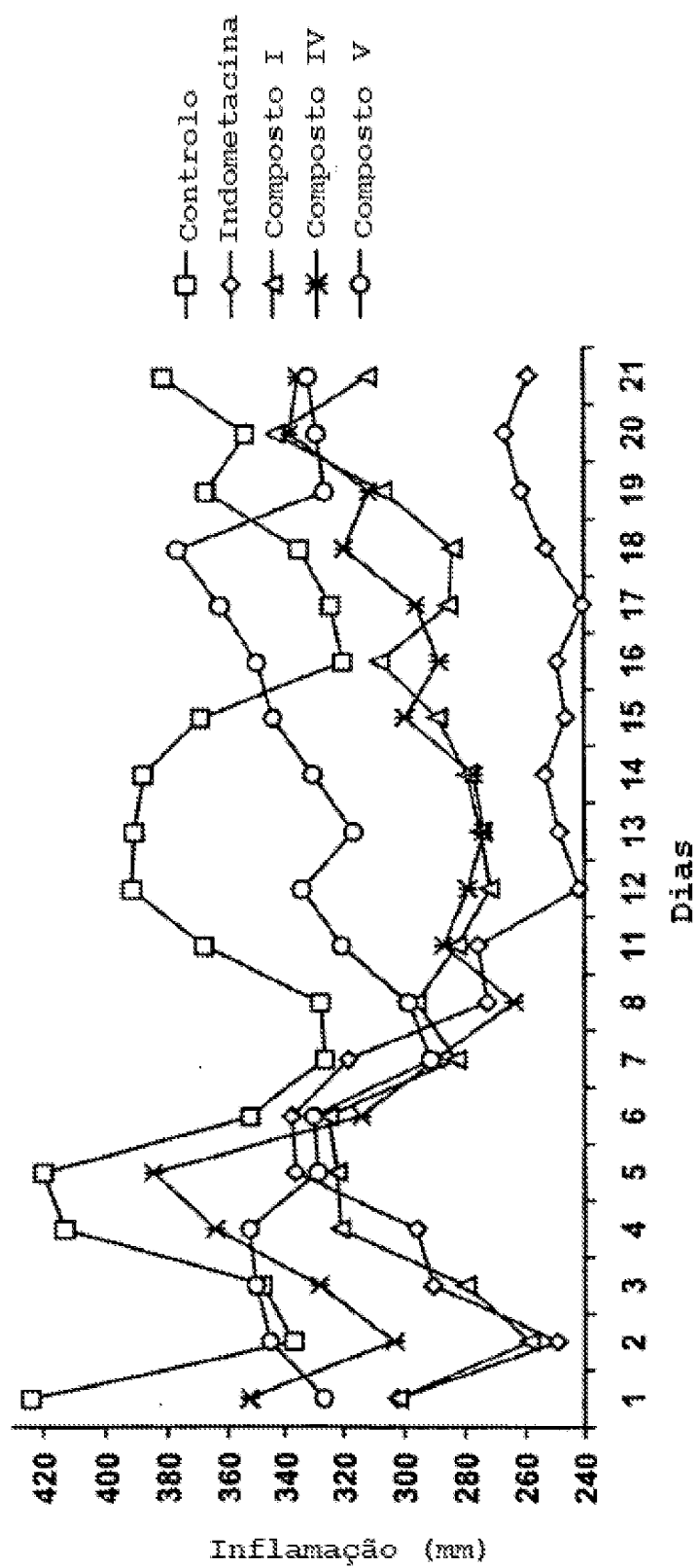


Figura 18

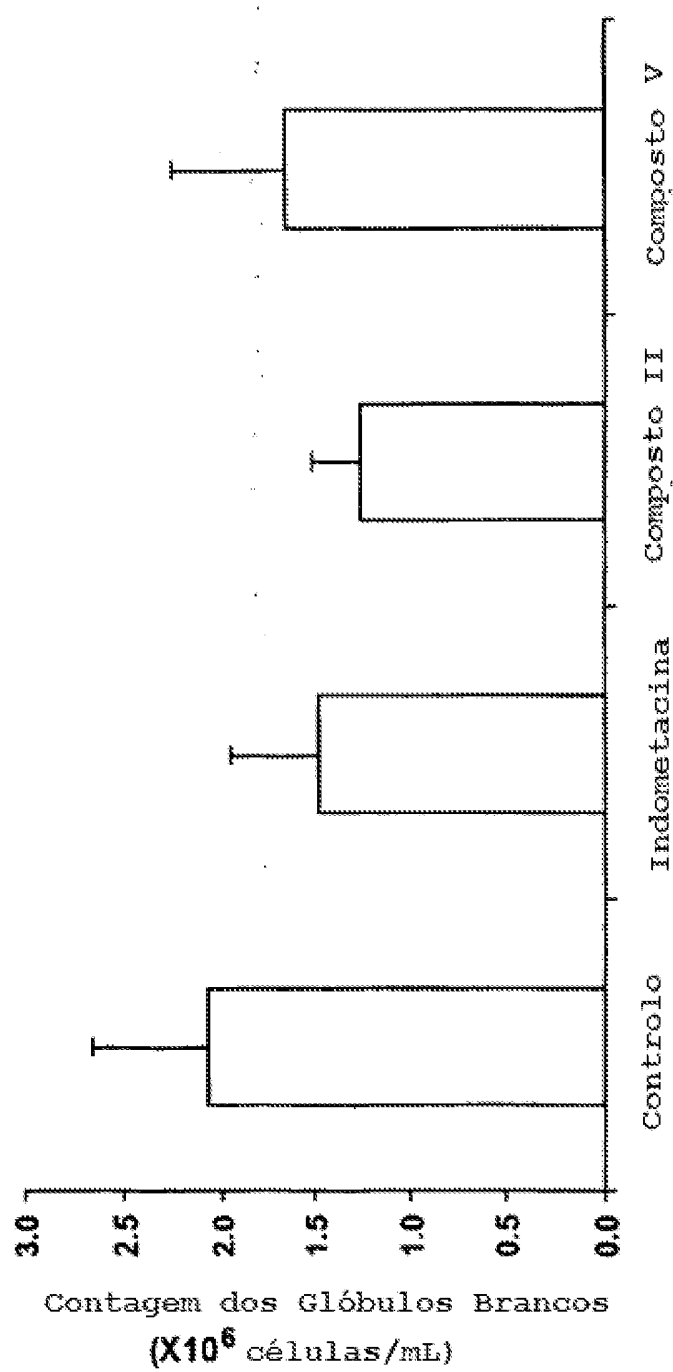


Figura 19

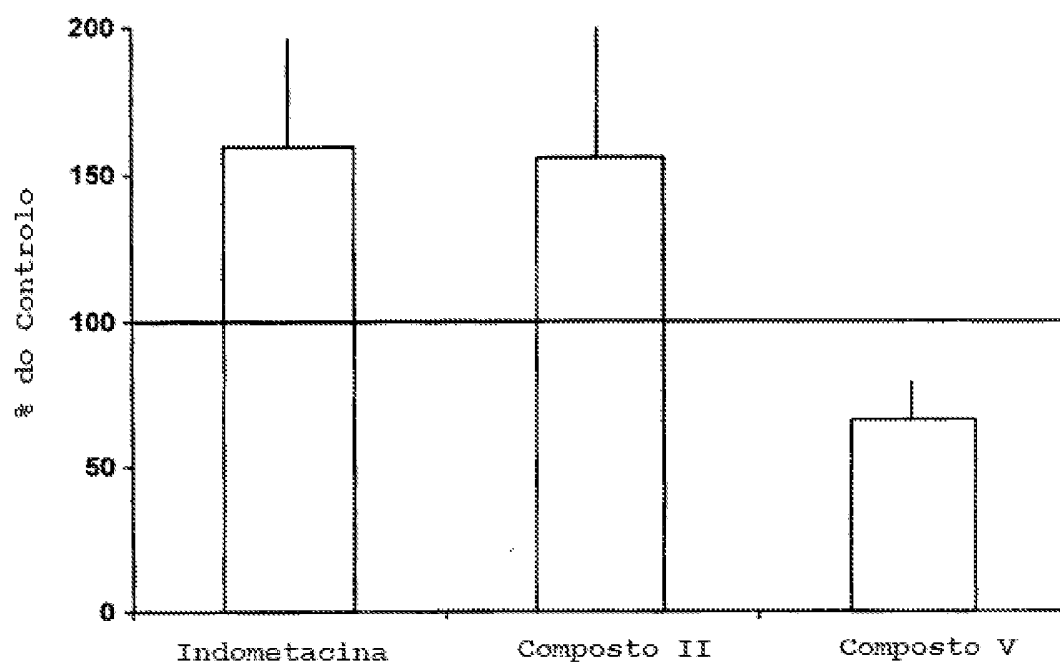


Figura 20A

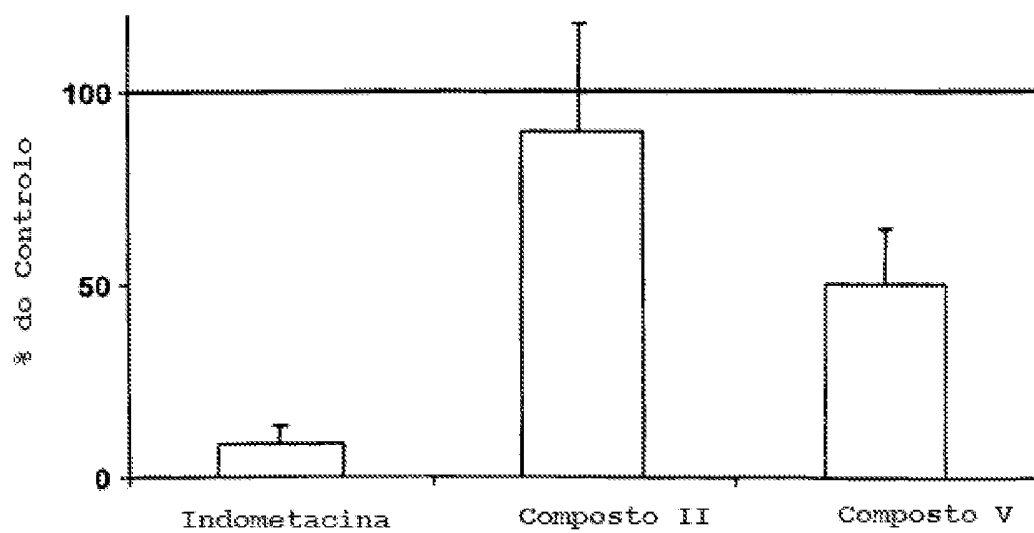


Figura 20B

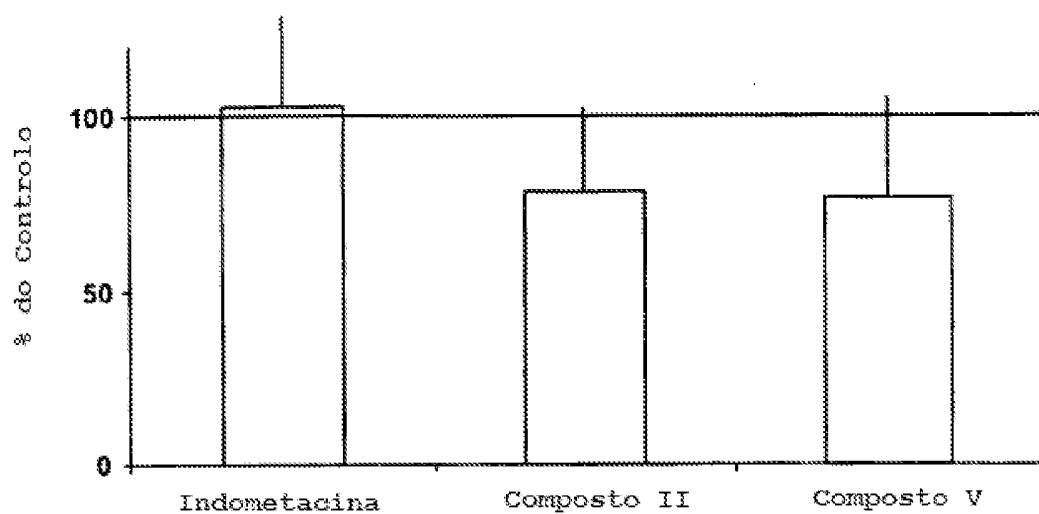


Figura 20C

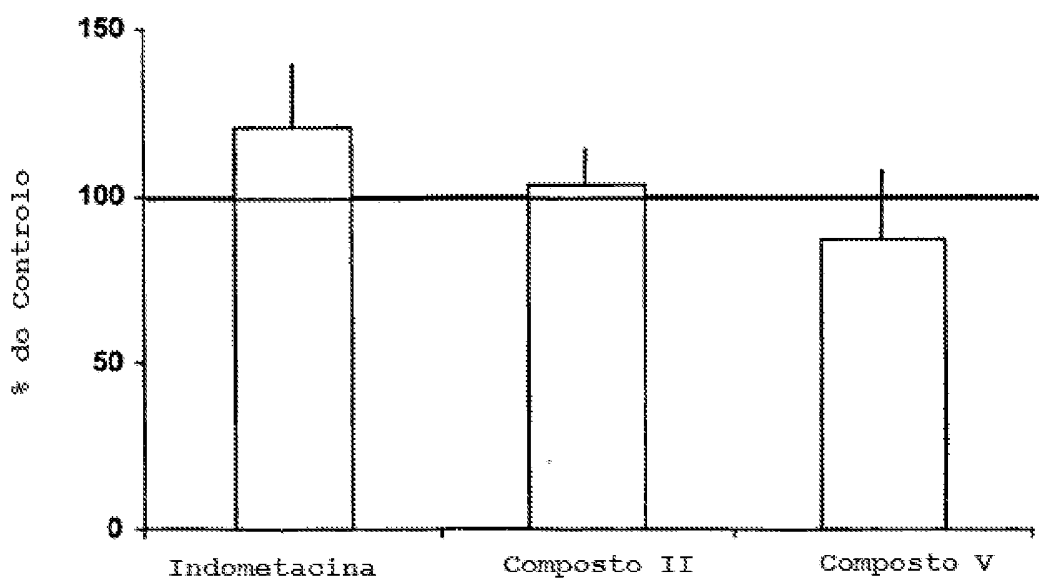


Figura 20D

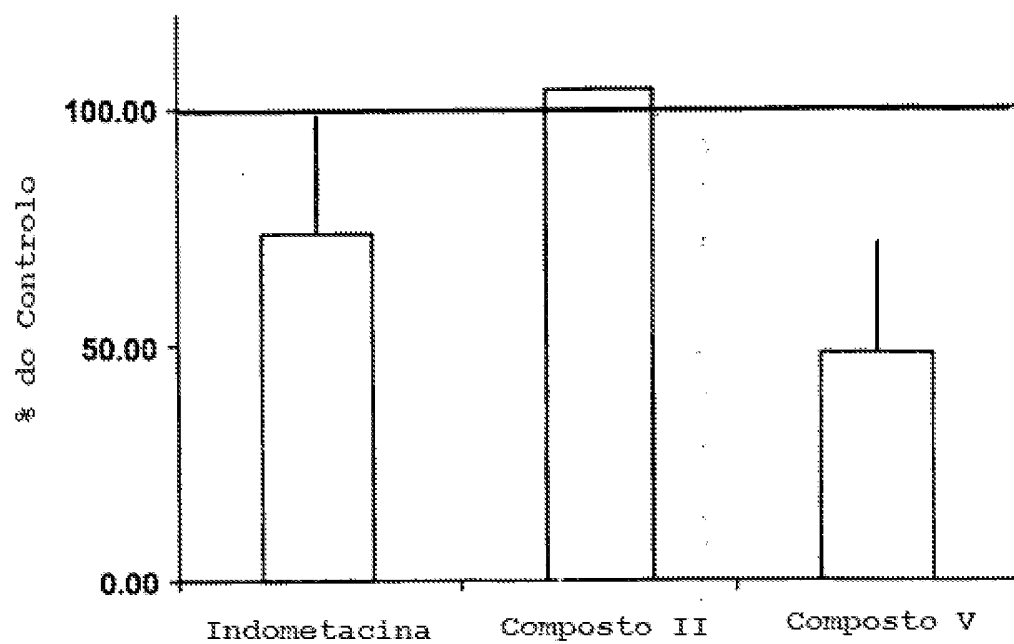


Figura 21A

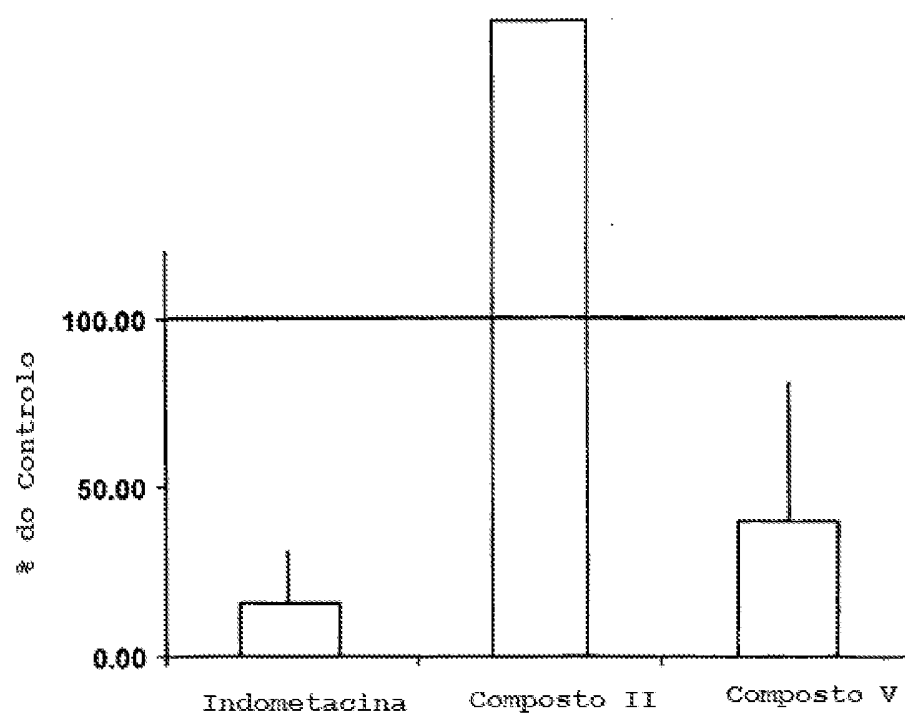


Figura 21B

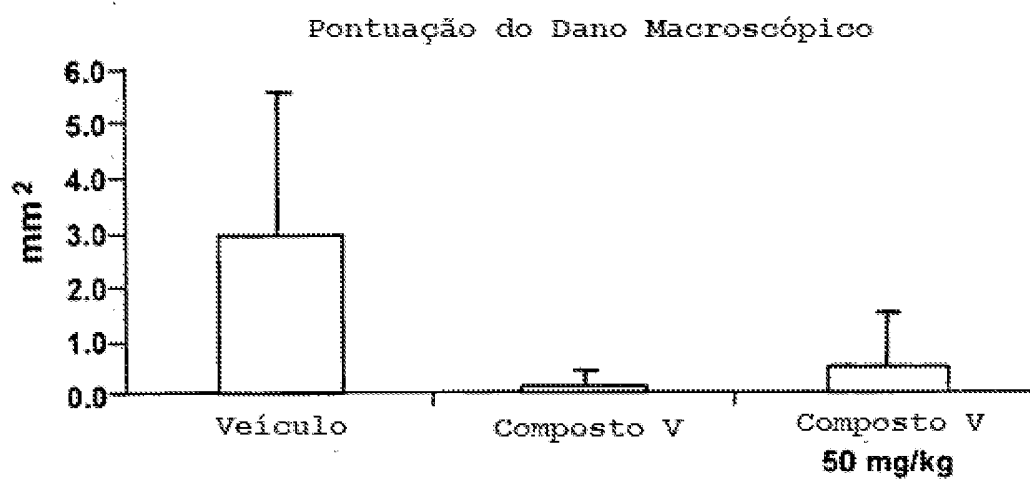


Figura 22

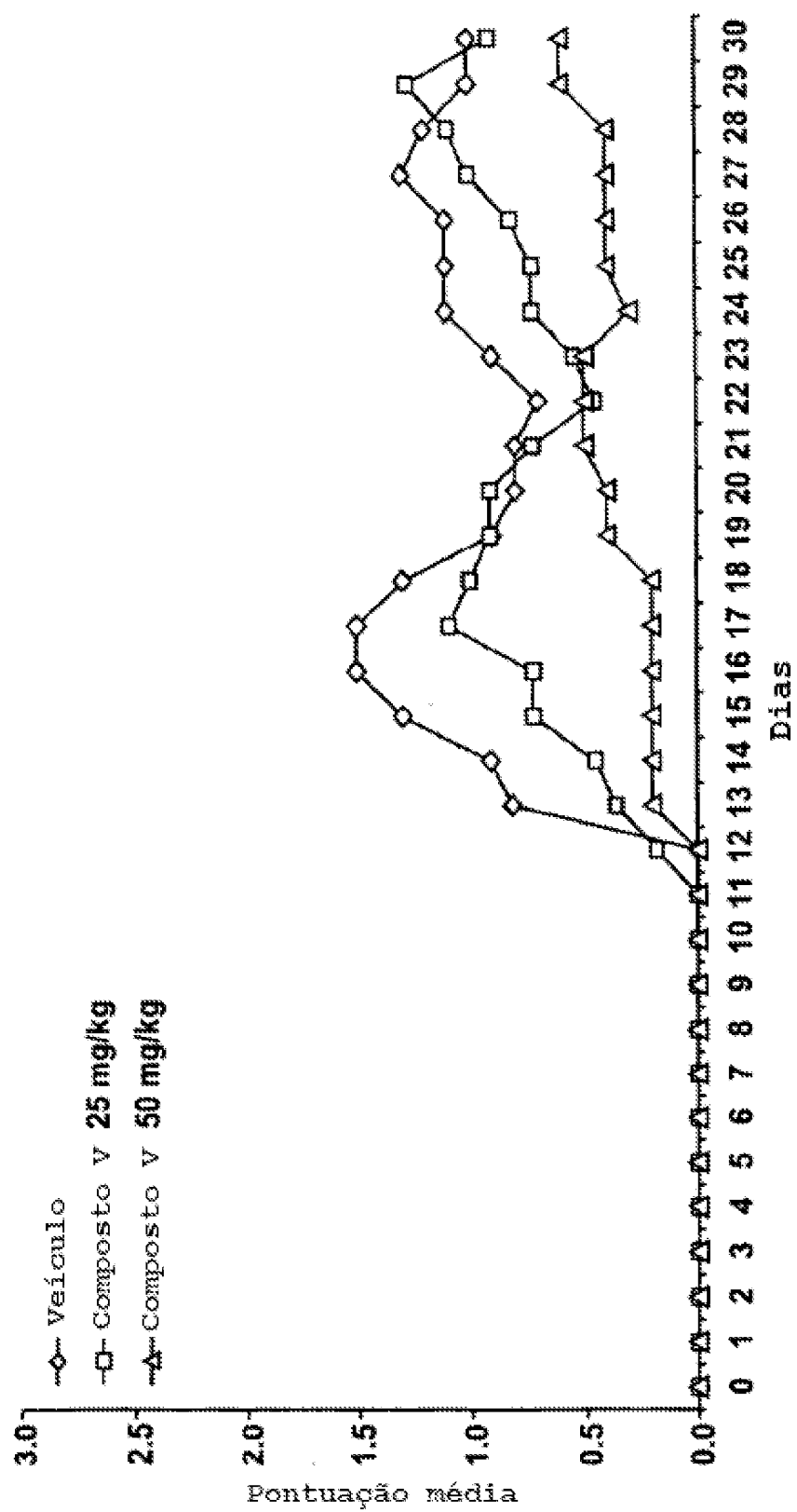


Figura 23