

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(51) Classificação Internacional:

C07C 62/32 (2009.01) **C07C 69/618** (2009.01)
C07C 59/54 (2009.01) **C07C 59/72** (2009.01)
C07D 317/50 (2009.01) **A61P 35/00** (2009.01)
A61P 35/02 (2009.01) **A61P 35/04** (2009.01)
A61K 31/195 (2009.01) **A61K 31/192** (2009.01)
A61K 31/222 (2009.01) **A61K 31/36** (2009.01)

(22) Data de pedido: **2002.07.18**

(30) Prioridade(s): **2001.07.31 IT RM20010464**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.04.28**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.12.22**
055/2011

(73) Titular(es):

SIGMA-TAU INDUSTRIEFARMACEUTICHE
RIUNITE S.P.A.
VIALE SHAKESPEARE, 47, I-00144 ROMA IT

(72) Inventor(es):

SERGIO PENCO IT
G. GIANNINI IT
C. PISANO IT
L. MERLINI IT
S. DALLAVALLE IT

(74) Mandatário:

MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA
AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **DERIVADOS RETINÓIDES COM ACTIVIDADES ANTI-ANGIOGÉNICA, ANTI-TUMORAL E PRÓ-APOPTÓICA**

(57) Resumo:

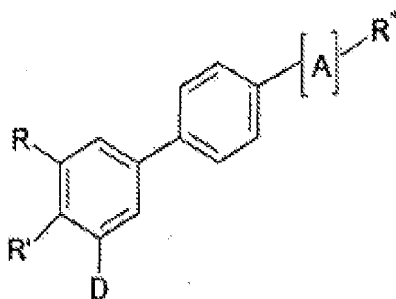
A INVENÇÃO DIZ RESPEITO A COMPOSTOS DE FÓRMULA ESTRUTURAL (I), EM QUE OS SÍMBOLOS R, R₁, R₂, A E D POSSUEM AS SIGNIFICAÇÕES DEFINIDAS NO TEXTO, COMO AGENTES ÚTEIS PARA A CURA DE PATOLOGIAS CARACTERIZADAS POR ANGIOGÉNESE ALTERADA E COMO AGENTES ANTI-TUMORAIS.

RESUMO**"DERIVADOS RETINÓIDES COM ACTIVIDADES ANTI-ANGIOGÉNICA,
ANTI-TUMORAL E PRÓ-APOPTÓTICA"**

A invenção diz respeito a compostos de fórmula estrutural (I), em que os símbolos R, R', R'', A e D possuem as significações definidas no texto, como agentes úteis para a cura de patologias caracterizadas por angiogénese alterada e como agentes anti-tumorais.

DESCRIÇÃO**"DERIVADOS RETINÓIDES COM ACTIVIDADES ANTI-ANGIOGÉNICA,
ANTI-TUMORAL E PRÓ-APOPTÓTICA"**

A presente invenção diz respeito a derivados retinóides, os quais possuem actividades antitumoral, anti-angiogénica, pró-apoptótica e anti-inflamatória, que satisfazem a fórmula estrutural (I)

**(I)**

em que:

o símbolo R representa cicloalquilo, adamantilo em que pelo menos um dos grupos CH pode ser substituído com C-halogéneo ou C-alquilo e um dos grupos CH₂ pode ser substituído por O, S, CH-halogéneo, CH-arilo, CH-heteroarilo, CH-arilalquilo, CH-heteroarilalquilo, CH-amino;

o símbolo R' representa OR''', OCOR''', COR^{IV};

o grupo R'-D representa O-(CH₂)_n-O; em que o símbolo n = 1-3;

o símbolo D representa H, OH, O-alquilo, (CH₂)_n-NH₂, (CH₂)_n-NH-alquilo, (CH₂)_n-OH, em que o símbolo n = 1-4;

o símbolo R'' representa tetrazol, SO₃H, NHSO₃H, CHO, COOH, COO-alquilo, CONHOH, CONH-arilo, CONH-C₆H₄OH, CH₂OR'''; PO₃H₂; CO(CH₂)_n-arilo, em que o símbolo n = 0-4;

o símbolo R''' representa H, alquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, SO_3H , D- ou L-glicosilo α ou β ;

o símbolo R^{IV} representa H, OH, OR''' ;

o símbolo [A] representa $[C(R^V, R^{VI})-C(R^{VII}, R^{VIII})]_n$, $[C(R^{IX})=C(R^X)]_n$, $[C=C]_n$, em que o símbolo $n = 0-3$;

os símbolos R^V , R^{VI} , R^{VII} e R^{VIII} representam H, alquilo, halogéneo, OH, OR''' , NO_2 , NH_2 , arilo, -O-, $-CH_2-$, CX_2- (em que o símbolo X representa halogéneo), $-CH(R''')-$;

os símbolos R^{IX} e R^X representam H, OH, halogéneo, alquilo, arilo, CN, NO_2 , $COOR'''$.

A vitamina A e os seus derivados biologicamente activos, retinal e ácido retinóico, desempenham um papel importante na visão, são necessários para o sistema reprodutor, actuam como agentes morfogénicos durante o crescimento embrionário e regulam o crescimento e a diferenciação de diversos tipos de células na base do crescimento de um organismo [M. Sporn, A. Roberts, D. Goodman, *The Retinoids*, Raven Press, New York 1994]. A acção biológica do ácido retinóico e dos seus derivados é mediada pela interacção com receptores nucleares que pertencem a duas famílias: a primeira designada por RAR (receptor de ácido retinóico) e a segunda designada por RXR (receptor X retinóide) [P. Chambon, *FASEB J.*, 1996, 10, 940-54]. Cada família está dividida em 3 subtipos (α , β , γ) codificados por três genes diferentes.

Todos os ácidos trans-retinóicos (ATAR) se ligam a RAR e RXR, ao passo que o 9-cis-RA apenas se liga a RXR.

Os retinóides, quer sejam análogos de vitamina A naturais quer sintéticos, exercem uma grande influência sobre a proliferação, diferenciação e apoptose celulares:

estas propriedades são bastante utilizadas no controlo de patologias tumorais e dermatológicas e em patologias associadas a uma angiogénese modificada.

A angiogénese num adulto está normalmente quiescente, mas representa uma função normal, por exemplo, na cicatrização de feridas ou na reconstrução do endométrio durante o ciclo reprodutivo feminino.

A resposta angiogénica é estimulada fisiologicamente quando as funções vasculares são reduzidas e quando a perfusão tecidual é inadequada.

De um modo geral, é possível reivindicar que, em condições fisiológicas, a angiogénese constitui uma resposta positiva para uma perfusão inadequada ou para um fornecimento reduzido de oxigénio e de nutrientes, tal como a que ocorre, por exemplo, no caso da oclusão de uma artéria, em situações de crescimento de massa de tecidos (por exemplo, a neovascularização associada à formação de tecido muscular) e no caso de um aumento da carga associado a uma necessidade suplementar de oxigénio e de nutrientes.

No decurso de isquemia local, devido a oclusão parcial ou total de uma artéria, é necessário o desenvolvimento de vasos colaterais para se manter a perfusão.

Sabe-se que o crescimento de um tumor primário é favorecido por uma boa vascularização do tecido tumoral. Um fornecimento adequado de oxigénio e de nutrientes promove o crescimento rápido do próprio tumor.

Foi já demonstrado que o grau de angiogénese pode constituir um factor extremamente negativo no prognóstico de neoplasmas (van Hinsbergh VW, Collen A, Koolwijk P; Ann. Oncol., 10 Suppl., 4: 60-3, 1999; Buolamwini JK; Curr., Opin., Chem., Biol., 3 (4): 500-9, Ago. de 1999).

Sabe-se também que um estado fundamental na biologia da célula tumoral é a aquisição de capacidade de metastização.

As células tumorais que metastizam são capazes de perderem a adesão às estruturas vizinhas, invadirem a corrente sanguínea e os vasos linfáticos e colonizarem outros tecidos à distância, onde podem continuar a reproduzir-se.

As metástases também constituem um evento crítico na história clínica da doença, sendo a causa principal de morte devido ao cancro. Estão bastante associadas e são facilitadas pela presença de tecido vascular no local do tumor ou em áreas adjacentes.

A migração de células tumorais ao longo das estruturas adjacentes permite às células atingirem os vasos sanguíneos intra-tumorais, quer sejam preexistentes quer sejam formados por neo-angiogénese, e assim alcançarem a corrente sanguínea (Ray JM., Stetler-Stevenson WG; Eur. Respir. J., 7 (11): 2062-72, 1994; Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE Jr; FASEBJ., 7 (15): 1434-41, Dez. de 1993).

A presença de comunicação entre os vasos linfáticos e sanguíneos na região vascular do tumor permite às células neoplásicas se moverem em ambos os sistemas vasculares.

Estudos recentes demonstraram uma relação directa entre a angiogénese e a doença artrítica (Koch AE; Arthritis and Rheumatism 41: 951-962,1998). Em particular, foi demonstrado que a neovascularização das cartilagens articulares desempenha um papel crucial na formação de pano e na progressão de artrite. Uma cartilagem normal não possui vasos sanguíneos, ao passo que o fluido sinovial de

pacientes artríticos contém um factor estimulador de angiogénese produzido pelas células endoteliais (EASF).

A presença deste factor está associada à vascularização e à degradação da cartilagem.

Há outras doenças que também estão associadas a angiogénese.

Concluiu-se que a neovascularização dos tecidos afectados é um factor facilitador em retinopatia diabética [Histol Histopathol, Out. de 1999; 14 (4): 1287-94], psoríase [Br. J. Dermatol., Dez. de 1999; 141 (6): 1054-60], inflamação e aterosclerose crónicas [Planta Med., Dez. de 1998; 64 (8): 686-95].

O controlo da neovascularização constitui assim um dos elementos básicos para o controlo e para a cura destas doenças.

São já conhecidos retinóides úteis para o tratamento de cancro ou que possuem actividade anti-angiogénica.

Um composto que pertence à última geração de retinóides, CD437 (Cancer Research, 2002; 62 (8), 2430-6; Blood, 2000; 95, 2672-82; Leukemia, 1999, 13, 739-49; Cancer Letters, 1999, 137, 217-2) é selectivo para RAR γ , inibe o crescimento de células e induz a apoptose em linhas celulares do carcinoma da mama, melanoma e carcinoma cervical, incluindo as resistentes a ATRA, com um mecanismo independente da ligação ao receptor (WO 9703682; J. Med. Chem. 1995, 38, 4993-5006). Tanto o CD437 como outros derivados, tais como o derivado cis de TTNPB (ac. Benzoato de tetrametil-tetra-hidro-naftalenil-propenilo), actuam condutores para o desenvolvimento de novos agentes para a indução de apoptose.

Em paralelo, alguns retinóides, obtidos através de síntese, tais como TAC-101 [Clin. Cancer Res. 1999, 5, 2304-10] ou seus derivados, tais como RE-80, AM-580 ou Am-80 [Eur. J. Pharmacol. 1993, 249, 113-6], demonstraram propriedades anti-angiogénicas.

Apesar do progresso dos últimos anos, a pesquisa farmacológica respeitante a novos fármacos para o tratamento de doenças tumorais e de doenças caracterizadas por angiogénese anormal, ainda é considerada por muitos especialistas na matéria de medicina como uma das áreas mais promissoras.

De facto, até à data, sabe-se que existe ainda uma necessidade de novos compostos capazes de bloquear ou de interferir com as doenças tumorais e com doenças provocadas por angiogénese anormal. Conforme referido antes, estas doenças incluem tumores, metástases tumorais, inflamação crónica, doenças artríticas, retinopatia diabética, psoríase, inflamação crónica e aterosclerose.

Concluiu-se agora surpreendentemente que os compostos que satisfazem a fórmula estrutural (I) possuem actividades anti-tumoral, pró-apoptótica e anti-angiogénica.

Os compostos de fórmula estrutural (I) de acordo com a presente invenção não foram ainda descritos.

Os compostos que satisfazem a fórmula estrutural (I) constituem assim o objecto da presente invenção.

Constitui um outro objecto da presente invenção, compostos que satisfazem a fórmula estrutural (I) e um processo para a sua preparação.

Constitui um outro objecto da presente invenção, uma composição farmacêutica que contém enquanto ingrediente

activo um composto de fórmula estrutural (I) e pelo menos um excipiente e/ou diluente farmacêuticamente aceitáveis.

Constitui um outro objecto da presente invenção, a utilização de um composto de fórmula estrutural (I) para a preparação de um medicamento para o tratamento de patologias associadas a angiogénese alterada, em que a patologia é seleccionada entre o conjunto constituído por patologia artrítica, tumores, metástases, retinopatia diabética, psoríase, doença inflamatória crónica e aterosclerose.

De acordo com um outro objecto, a invenção diz respeito à utilização de um composto de fórmula estrutural (I) para a preparação de um medicamento para o tratamento de tumores, em que a actividade anti-tumoral possui uma natureza citotóxica e/ou uma natureza apoptótica e/ou uma natureza anti-angiogénica; em que o tumor é seleccionado entre o conjunto constituído por sarcoma, carcinoma, carcinóide, tumor ósseo, tumor neuro-endócrino, leucemia linfóide, leucemia mielóide, leucemia monocítica, leucemia megacariocítica, leucemia promielocítica aguda ou doença de Hodgkin.

De acordo com um outro objecto, a invenção diz respeito à utilização de um composto de fórmula estrutural (I) para a preparação de um medicamento útil para a prevenção e para o tratamento de metástases tumorais.

Tal como referido antes, o crescimento de um tumor primário é facilitado por uma boa vascularização do tecido tumoral e da extensão de neo-angiogénese pode constituir um factor bastante adverso para o prognóstico de neoplasmas. Um fornecimento adequado de oxigénio e de nutrientes no

local do tumor facilita, de facto, o crescimento rápido do próprio tumor.

Sabe-se que muitos agentes anti-tumorais disponíveis para os médicos não são ainda capazes de prevenir a morte devido a estas doenças de muitos pacientes. Sabe-se também que a maior parte dos pacientes oncológicos não são tratados com um fármaco anti-cancro individual, mas sim com uma combinação de diversos agentes anti-cancro. A necessidade de se administrar fármacos anti-cancro em combinação é devido ao facto de se actuar em níveis metabólicos diferentes em alguns casos, tal favorece a remissão completa do tumor, ao passo que em outros casos aumenta a vida do paciente e/ou melhora a qualidade de vida dos pacientes tratados.

Até à data, mantém-se ainda a necessidade de novos compostos utilizáveis em combinação com compostos anti-tumor conhecidos.

Os compostos de acordo com a presente invenção podem ser utilizados em combinação com um ou vários fármacos anti-cancro.

Constitui um outro objecto da presente invenção, uma combinação de um ou vários compostos de fórmula estrutural (I) com um ou vários fármacos anti-cancro conhecidos, na qual o fármaco anti-cancro é seleccionado entre o conjunto constituído por agentes alquilantes, inibidores de topoisomerase, agentes antitubulina, compostos intercalantes, anti-metabolitos, produtos naturais, tais como alcalóides de vinca, epipodofilotoxinas, antibióticos, enzimas, taxanos, compostos cito-diferenciadores, inibidores de fosfotirosina-cinase, tais como Iressa ou Glivec, TRAIL (ligando indutor de apoptose associada ao factor de necrose

tumoral), agonistas dos receptores de DR4 ou de DR5 (locais de TRAIL), compostos para terapia anti-tumoral imunológica, vacinas anti-tumorais ou interferão α , β , γ .

Constitui um outro objecto da presente invenção, uma composição farmacológica que compreende a combinação de um ou vários compostos de fórmula estrutural (I) com um ou vários fármacos anti-cancro conhecidos, e um ou vários excipientes ou veículos farmaceuticamente aceitáveis.

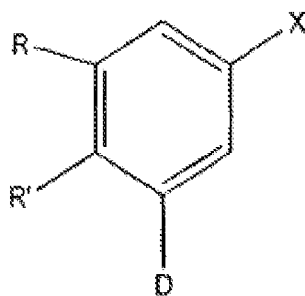
Constitui um outro objecto da presente invenção, a utilização de um ou vários compostos de fórmula estrutural (I) com um ou vários agentes anti-cancro conhecidos para a preparação de um medicamento para o tratamento de tumores.

Constitui um outro objecto da presente invenção, a utilização de um ou vários compostos de fórmula estrutural (I) com um ou vários agentes anti-cancro conhecidos para a preparação de um medicamento para o tratamento de tumores, caracterizada pelo facto de o composto de fórmula estrutural (I) estar presente como coadjuvante do fármaco anti-cancro.

Os exemplos seguintes ilustram a invenção.

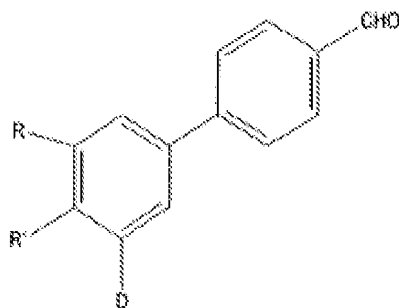
PROCEDIMENTO GERAL DE SÍNTESE

Os compostos de fórmula estrutural (I) foram preparados por meio da reacção de um composto de fórmula estrutural (II)



(II)

em que os símbolos R, R' e D possuem as significações definidas na fórmula estrutural (I), e o símbolo X representa halogéneo, com ácido 4-formilborónico, numa reacção de Miyaura-Suzuki (Chem. Rev., 1995, 95, 2457-83), para se obter um aldeído de fórmula estrutural (III).

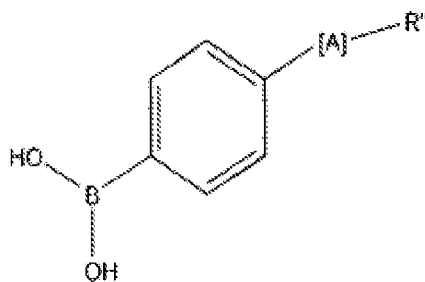


(III)

Os compostos de fórmula estrutural (III), em que os símbolos R, R' e D possuem as significações definidas antes, reagem de acordo com métodos bem conhecidos, os quais se encontram descritos na literatura [v.g., reacção de Wittig (Org. Reactions, Vol. 14), Wadsworth-Horner-Emmons (Org. Reactions, Vol. 25), Knoevenagel (Org. Reactions, Vol. 15), Henry (Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Vol. 10/1, pág. 250), Darzens (Org. Reactions, Vol. 5), etc.] para se obter os compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo [A] representa $C(R^V, R^{VI})=C(R^{VII}, R^{VIII})$, e os símbolos R^V , R^{VI} , R^{VII} e R^{VIII}

representam H, alquilo, halogéneo, OH, OR''', NO₂, NH₂, arilo, -O-, ou em que o símbolo [A] representa C≡C.

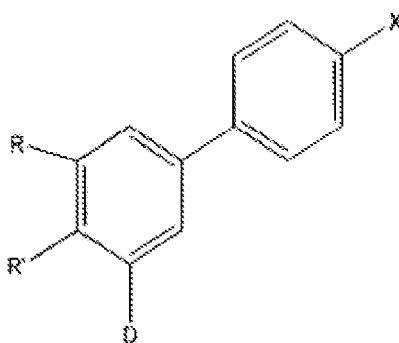
Em alternativa, os compostos de fórmula estrutural (I) podem ser preparados a partir de compostos de fórmula estrutural (II) por meio da reacção de Miyaura-Suzuki (Chem. Rev., 1995,95, 2457-83) com um ácido borónico de fórmula estrutural (IV)



(IV)

em que os símbolos A e R'' possuem as significações definidas antes.

Em alternativa, os compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo [A] representa C(R^V, R^{VI})=C(R^{VII}, R^{VIII}) ou C≡C, podem ser preparados a partir de compostos de fórmula estrutural (V)



(V)

em que os símbolos R, R' e D possuem as significações definidas antes, o símbolo X representa halogéneo, por meio de métodos conhecidos, por exemplo, através das reacções

descritas por Heck (Org. Reactions, Vol. 27) com alcenos ou alcinos substituídos na presença de catalisadores metálicos ou organo-metálicos.

Em alternativa, os compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo [A] representa $C(R^V, R^{VI})=C(R^{VII}, R^{VIII})$ ou $C\equiv C$, podem ser preparados a partir de compostos de fórmula estrutural (I), em que os símbolos R e D representa H e o símbolo R' possui as significações definidas antes, por meio de reacções de alquilação com álcoois, v.g., adamantano-1-ol, 1-metil-1-ciclo-hexanol, terc-butanol, etc., na presença de ácido sulfúrico ou de outros ácidos como catalisadores, v.g., conforme descrito por Charpentier *et al.* (J. Med. Chem., 1995, 38, 4993-5006). É possível preparar os compostos de fórmula estrutural (I) utilizando reacções análogos e os álcoois adequados, partindo dos compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo D representa H e os símbolos R e R' possuem as significações definidas antes.

Os compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo [A] representa $C(R^V, H)-C(H, R^{VI})$ e os símbolos R^V e R^{VI} representam $-CH_2-$, podem ser preparados a partir de compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo [A] representa $C(R^V, R^{VI})=C(R^{VII}, R^{VIII})$, por meio de reacções de ciclopropanação conhecidas na literatura, v.g., por meio da reacção descrita por Simmons-Smith e análogas, conforme descrito, por exemplo, nas obras J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 4256 ou J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 5813, ou a partir de compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo A representa $CH=CH_2$ e o símbolo R'' representa H, por meio da reacção com diazoacetato de etilo. Os compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo [A] representa $C(R^V, H)-$

$C(H, R^{VIII})$ e os símbolos R^V e R^{VIII} representam $-O$, podem ser preparados a partir de compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo [A] representa $C(R^V, R^{VI})=C(R^{VII}, R^{VIII})$, por reacções de epoxidação conhecidas na literatura, por exemplo, com dioxirano ou análogos, conforme descrito por Yang e associados na obra J. Org. Chem., 1995, 60, 3887-9.

Os compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo [A] representa $C-C$, podem ser preparados a partir de compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo [A] representa $C(R^V, R^{VI})=C(R^{VII}, R^{VIII})$ ou $C\equiv C$, através de reacções de redução conhecidas para ligações duplas e triplas, por exemplo, hidrogenação catalítica.

Os compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo R'' representa $CONHOH$, podem ser preparados a partir de compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo R'' representa $COOH$, por meio de reacções conhecidas na literatura para a síntese de ácidos hidroxâmicos, por exemplo, através de reacção com O-benzil-hidroxilamina e agentes de condensação, [De Luca et al. J. Org. Chem., 2001, 66, 2534] seguida de hidrogenação catalítica, ou por reacção com O-trimetilsili-hidroxilamina seguida de dessililação.

Os compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo R'' representa $CONH$ -arilo, podem ser preparados a partir de compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo R'' representa $COOH$, por meio de procedimentos conhecidos na literatura para a síntese de amidas, v.g., conforme descrito por Sangmam, et al. (Synth. Commun., 1998, 28, 2945-58) para amidas de ácido retinóico.

Os compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo R'' representa CH_2OH , podem ser preparados a partir

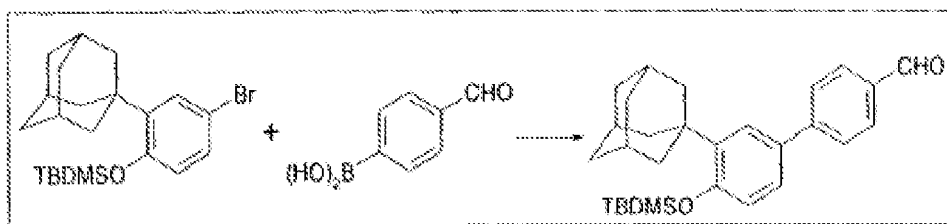
de compostos de fórmula estrutural (I), em que o símbolo R'' representa COOH ou a partir dos seus ésteres ou derivados, através de procedimentos conhecidos na literatura para a síntese de álcoois, por exemplo, por redução com LiAlH_4 .

EXEMPLO 1

Preparação de 4-(3-(1-adamantil)-4-terc-butildimetilsililoxifenil)-benzaldeído

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o diagrama 1 de síntese, a seguir descrito.

Diagrama 1 de síntese



Dissolveu-se 1,56 g (3,70 mmol) de 4-terc-butildimetilsililoxi-3-(1-adamantil)-bromobenzeno [Charpentier et al. J. Med. Chem., 1995, 38, 4993-5006], em 7,5 mL de tolueno. Adicionou-se 3,7 mL de uma solução aquosa de Na_2CO_3 2 M, 0,128 g (0,11 mmol) de tetraquistrifenilfosfina-paládio e uma solução de 610 mg (4,07 mmol) de ácido 4-formilbenzenoborónico em 1,73 mL de etanol. Manteve-se a solução assim obtida em refluxo durante 2 horas, sob uma corrente de azoto. Arrefeceu-se então a solução, retomou-se em acetato de etilo e lavou-se com uma solução saturada de NaCl.

Separou-se as fases, filtrou-se a fase orgânica, secou-se sobre Na_2SO_4 , filtrou-se novamente, evaporou-se o solvente e submeteu-se o resíduo a cromatografia flash através de gel de sílica (Merck), utilizando como eluente hexano:acetato de etilo a 3:1.

Obteve-se 1,09 g do composto em epígrafe.

P.f. 158°C .

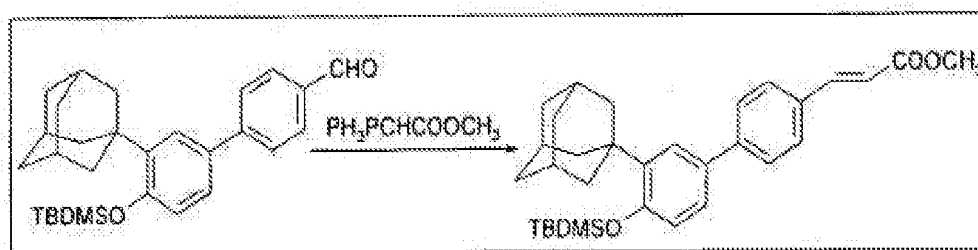
^1H NMR (CDCl_3) δ : 0,37 (6H, s, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); 1,05 (9H, s, $-\text{t-Bu}$); 1,78 (6H, s, 6Ad.); 2,09 (3H, s, 3Ad.); 2,15 (6H, s, 6Ad.); 6,88 (1H, d, 1Ar, $J = 8,54$ Hz); 7,35 (1H, dd, 1Ar, $J = 2,24$ Hz, $J = 8,54$ Hz); 7,51 (1H, d, 1Ar, $J = 2,24$ Hz); 7,70 (2H, d, 2Ar, $J = 8,14$ Hz); 7,90 (2H, d, 2Ar, $J = 8,14$ Hz); 10,01 (1H, s, $-\text{CHO}$).

EXEMPLO 2

Preparação de E-4-(3-(1-adamantil)-4-terc-butildimetilsililoxifenil)-cinamato de metilo

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 2 de síntese 2.

Diagrama 2 de síntese



Dissolveu-se 386 mg (0,864 mmol) de 4-(1-terc-butildimetilsililoxi-2-(1-adamantil)-fenil))-benzaldeído em 4,5 mL de clorofórmio, adicionou-se 298 mg (0,864 mmol) de trifenilfosforanilidenoacetato de metilo e manteve-se em

refluxo a solução assim obtida durante três horas. Arrefeceu-se a solução, evaporou-se o solvente e depois submeteu-se a cromatografia flash através de gel de sílica (Merck), utilizando como eluente hexano:CH₂Cl₂ a 1:1. Obteve-se 350 mg do composto em epígrafe.

P.f. 148°C.

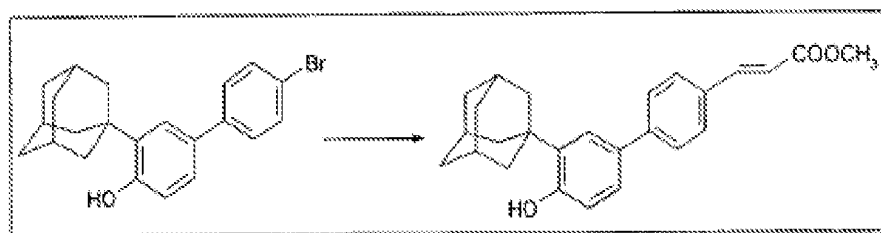
¹HNMR (CDCl₃) δ: 0,36 (6H, s, -Si(CH₃)₂); 1,05 (9H, s, -t-Bu); 1,77 (6H, s, 6Ad.); 2,08 (3H, s, 3Ad.); 2,15 (6H, s, 6Ad.); 3,80 (3H, s, -OCH₃); 6,44 (1H, d, -CH=, J = 16,07 Hz); 6,86 (1H, d, 1Ar, J = 8,54 Hz); 7,30 (1H, dd, 1Ar, J = 2,24 Hz, J = 8,54 Hz); 7,47 (1H, d, 1Ar, J = 2,24 Hz); 7,50-7,70 (4H, m, 4Ar); 7,71 (1H, d, CH=, J = 16,07 Hz).

EXEMPLO 3

Preparação de E-4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil)-cinamato de metilo

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 3 de síntese 3.

Esquema 3 de síntese



Preparou-se uma mistura de 1 g (2,6 mmol) de 2-(1-adamantil)-4-(4-bromofenil)-fenol, 358 mg (4,16 mmol) de acrilato de metilo, 5,8 mg (0,02 mmol) de acetato de paládio e 30 mg (0,1 mmol) de tri-(otolil)-fosfina em 1,2 mL de trietilamina e manteve-se em refluxo durante 4 horas.

Evaporou-se a trietilamina, retomou-se com HCl 2 N e acetato de etilo, separou-se as fases orgânicas, lavou-se com água, secou-se sobre Na₂SO₄ e evaporou-se o solvente. Obteve-se 640 mg de produto. P.f. > 240°C.

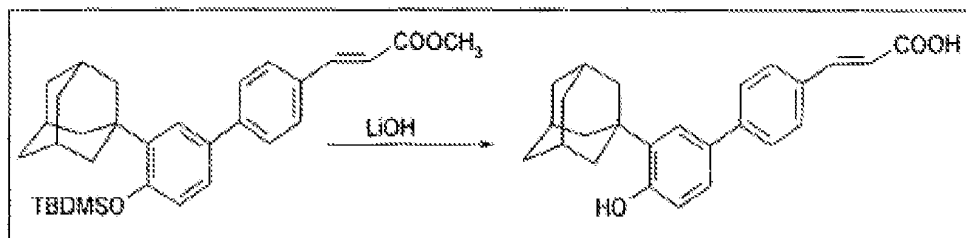
¹H-NMR (DMSO-d₆) δ : 1,75 (6H), 2,1 (9H), 3,72 (s, 3H, OCH₃), 6,63 (d, 1H, J = 16 Hz), 6,85 (dd, 1H, J = 8,8, 1,8 Hz), 7,3-7,4 (2H, arom.), 7,55-7,85 (5H), 9,55 (s, 1H, OH).

EXEMPLO 4

Preparação de ácido E-4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil)-cinâmico (ST 1926)

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 4 de síntese 4.

Esquema 4 de síntese



Dissolveu-se 42 mg (1 mmol) de LiOH.H₂O em 8,2 mL de THF (tetra-hidrofurano):H₂O a 1:1, adicionou-se 100 mg (0,2 mmol) de E-4-(3-(1-adamantil)-4-terc-butildimetilsililoxifenil)-cinamato de metilo e manteve-se a solução assim obtida, sob agitação à temperatura ambiente durante 3 horas. Evaporou-se o THF, acidificou-se com HCl 2 N, extraiu-se com acetato de etilo e secou-se sobre Na₂SO₄. Filtrou-se, evaporou-se e depois submeteu-se a cromatografia flash através de gel de sílica (Merck), utilizando como

eluente hexano:acetato de etilo a 2:3 e depois a 1:1. Obteve-se 55 mg de produto.

P.f. > 240°C. $F_r = 0,50$ (gel de sílica Merck, 60F₂₅₄, EtOAc).

¹HNMR (DMSO-d₆) δ : 1,74 (6H, s, 6Ad.); 2,04 (3H, s, 3Ad.); 2,12 (6H, s, 6Ad.); 6,51 (1H, d, -CH=, J = 16, 18 Hz); 6,85 (1H, d, 1Ar, J = 8,82 Hz); 7,30-7,40 (2H, m, 2Ar); 7,55-7,63 (3H, m, 2Ar + CH=); 7,70 (2H, d, 2Ar, J = 8,09 Hz); 9,54 (1H, s, -OH); 12,34 (1H, s lr, -COOH).

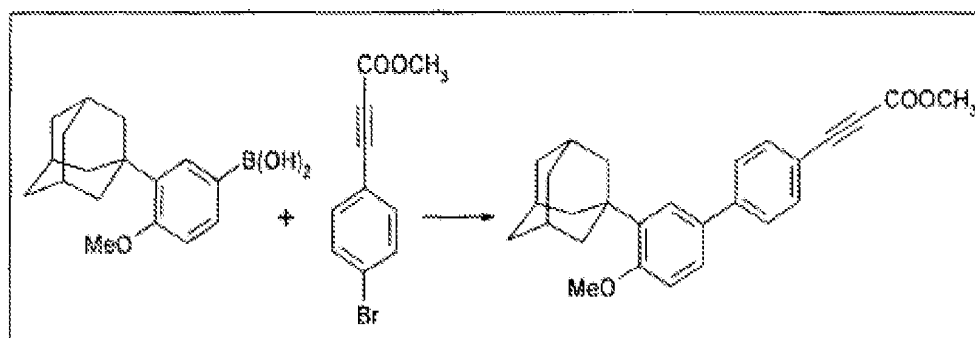
MS (m/z): 374 (M⁺, 100).

EXEMPLO 5

Preparação de 4-(3-(1-adamantil)-4-metoxifenil)-propiolato de metilo

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 5 de síntese.

Esquema 5 de síntese



Dissolveu-se 301 mg (1,26 mmol) de 4-bromofenil-propiolato de metilo em 2,5 mL de tolueno, adicionou-se 1,34 mL de uma solução aquosa de Na₂CO₃ 2 M, 43,7 mg de Pd-tetraquistrifenilfosfina e 398 mg (1,39 mmol) de ácido 3-(1-adamantil)-4-metoxifenilborónico, e manteve-se a mistura

em refluxo durante 3 horas. Retomou-se o produto impuro em éter etílico, lavou-se a fase orgânica com uma solução saturada de NaCl, secou-se sobre Na₂SO₄ e evaporou-se até à secura para se obter 570 mg de produto impuro. Submeteu-se a cromatografia flash através de gel de sílica (Merck), utilizando como eluente hexano:acetato de etilo a 2:1, para se obter 15 mg de produto puro.

P.f. 175°C.

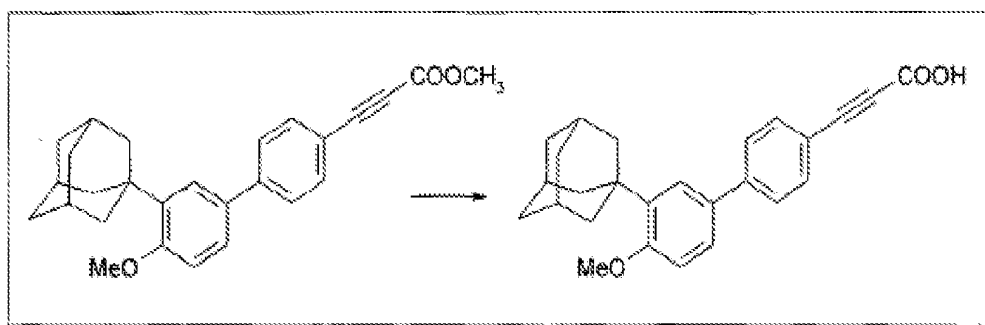
¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3,86 (s, 3H, OCH₃), 3,90 (s, 3H, OCH₃), 6,96 (d, 1H, J = 8,5), 7,43 (dd, 1H, J = 2,2, 8,5), 7,47 (d, 1H, J = 2,2), 7,55-7,70 (4H, arom.).

EXEMPLO 6

Preparação do ácido 4-(3-(1-adamantil)-4-metoxifenil)-propiólico (ST 1879)

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 6 de síntese.

Esquema 6 de síntese



Dissolveu-se 15 mg (0,0374 mmol) de E-4-(3-(1-adamantil)-4-metoxifenil)-propiolato de metilo em 2,14 mL de NaOH 0,7 N em metanol e manteve-se a mistura em refluxo durante 1 hora. Evaporou-se o metanol, retomou-se em água,

acidificou-se com HCl 6 N e extraiu-se com éter etílico. Depois de se secar sobre Na_2SO_4 e de se evaporar o solvente, lavou-se o resíduo com hexano e obteve-se, após filtração, 10 mg de produto.

P.f. 156°C . $F_r = 0,41$ (gel de sílica Merck, 60F₂₅₄, EtOAc/MeOH a 2/1).

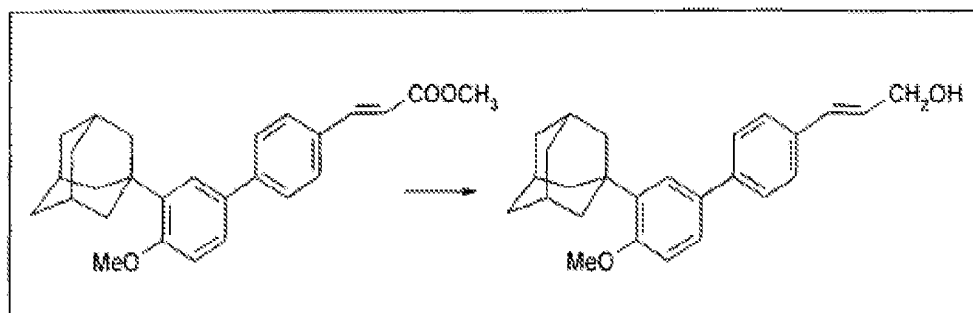
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 1,70 (s, 6H), 2,10 (s, 9H), 3,85 (s, 3H, OCH_3), 7,05 (d, 1H, $J = 8,4$, H-6'), 7,40 (d, 1H, $J = 2$, H-2'), 7,45-7,60 (3H, arom.), 7,65 (2H, arom.).

EXEMPLO 7

Preparação de álcool E-4-(3-(1-adamantil)-4-metoxifenil)-cinamílico

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 7 de síntese.

Esquema 7 de síntese



Adicionou-se 375 μL de uma solução 1 M de LiAlH_4 em tetra-hidrofurano (0,365 mmol) a 5 mL de tetra-hidrofurano anidro. Arrefeceu-se num banho de gelo, adicionou-se 151 mg (0,375 mmol) de E-4-(3-(1-adamantil)-4-metoxifenil)-cinamato de metilo (veja-se o exemplo 19), agitou-se durante 1 hora sob arrefecimento e depois de um dia para o outro à temperatura ambiente. Arrefeceu-se num banho de

gelo, adicionou-se 5 mL de uma solução aquosa a 10% de NH_4Cl , evaporou-se o tetra-hidrofurano e retomou-se com acetato de etilo. Separou-se a fase orgânica e secou-se sobre Na_2SO_4 . Evaporou-se o solvente para se obter 126 mg do produto impuro, o qual se submeteu a cromatografia através de gel de sílica (Merck), utilizando como eluente cloreto de metileno:hexano a 3:1 e depois novamente com hexano:acetato de etilo a 28:72, para se obter 11 mg do produto.

P.f. 148°C .

^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1,75 (s, 6H), 2,15 (9H), 3,90 (s, 3H, OCH_3), 4,38 (dd, 2H, $J = 6, 1,6$), 6,41 (dt, 1H, $J = 6,16$, $=\text{CHCH}_2\text{OH}$), 6,67 (dd, 1H, $J = 1, 6, 16$, Aril- $\text{CH}=\text{}$), 6,96 (d, 1H, $J = 8,3$, H-6'), 7,42 (dd, 1H, $J = 2,2, 8,3$, H-5'), 7,45 (m, 2H, H-2 e H-6), 7,48 (d, 1H, $J = 2,2$, H-3'), 7,55 (m, 2H, H-3 e H-5).

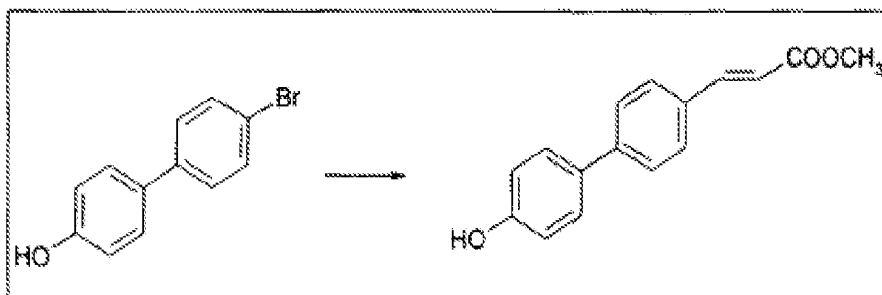
MS m/z 374 (M^+).

EXEMPLO 8

Preparação de E-4-(4-hidroxifenil)-cinamato de metilo

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 8 de síntese.

Esquema 8 de síntese



Preparou-se uma mistura de 2 g (8,03 mmol) de 4-(4-bromofenil)-fenol, 1,1 g (12,8 mmol) de acrilato de metilo, 18 mg (0,08 mmol) de acetato de paládio e 94 mg (0,31 mmol) de tri-(o-tolil)-fosfina em 3,7 mL de trietilamina e manteve-se em refluxo durante 6 horas. Adicionou-se mais 6 mg de acetato de paládio e 30 mg de tri-(o-tolil)-fosfina, aqueceu-se durante uma hora, depois adicionou-se mais 30 mg de acetato de paládio e 94 mg de tri-(o-tolil)-fosfina e aqueceu-se durante 3,5 horas. Acidificou-se a mistura de reacção com HCl 6 M, adicionou-se acetato de etilo, agitou-se durante um período de tempo para se dissolver o precipitado, separou-se as fases, secou-se a fase orgânica sobre Na₂SO₄ e evaporou-se o solvente. Purificou-se o produto (934 mg) retomando-o em hexano/éter etílico e removendo por filtração para se obter 1,7 g do produto em epígrafe.

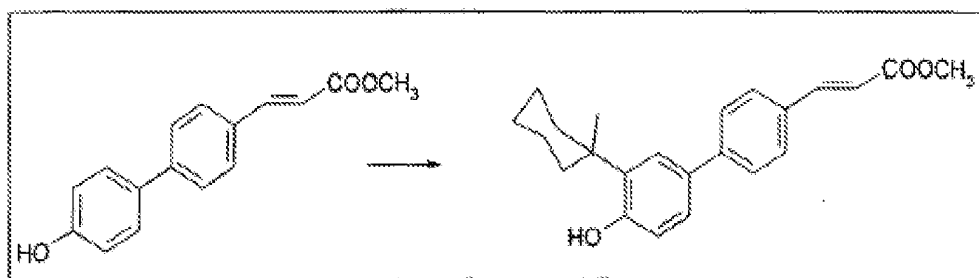
P.f. 233°C-235°C.

¹HNMR (CDCl₃) δ: 3,70 (s, 3H, OCH₃), 6,13 (d, 1H, CH=, J = 16), 6,82 (d, 2H, H-3' e H-5'), 7,48 (d, 2H, H-2' e H-6'), 7,6-7,75 (5H).

EXEMPLO 9

Preparação de E-4-(3-(1-metilciclo-hexil)-4-hidroxifenil)-cinamato de metilo

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 9 de síntese.

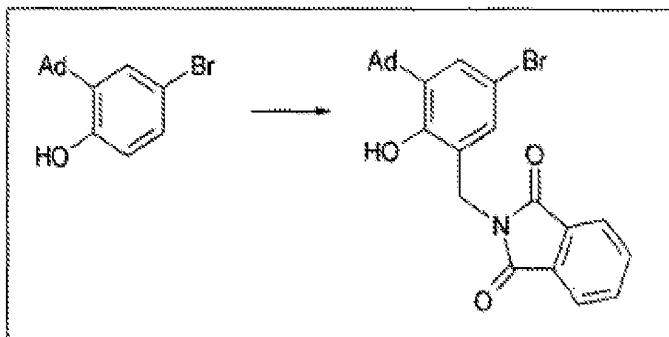
Esquema 9 de síntese

Dissolveu-se 150 mg (0,6 mmol) de E-4-(4-hidroxifenil)-cinamato de metilo e 68,5 mg de 1-metil-1-ciclo-hexanol em 1,2 mL de CH_2Cl_2 , tratou-se com 0,032 mL de H_2SO_4 concentrado e manteve-se a mistura em refluxo durante um dia. Adicionou-se água e neutralizou-se a mistura com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. Extraíu-se a fase aquosa diversas vezes com acetato de etilo, secou-se sobre Na_2SO_4 , filtrou-se e evaporou-se. Submeteu-se o produto impuro resultante a cromatografia flash através de gel de sílica (Merck), utilizando como eluente hexano:acetato de etilo a 9:1. Obteve-se 20 mg de produto.

^1H NMR (acetona- d_6) δ : 1,43 (3H, s, $-\text{CH}_3$); 1,4-1,9 (8H, m, ciclo-hex.); 2,3-2,45 (2H, m, ciclo-hex.); 3,80 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); 6,60 (1H, d, $\text{CH}=\text{$, $J = 16,18$ Hz); 7,0 (1H, d, 1Ar, $J = 8,2$ Hz); 7,44 (1H, dd, 1Ar, $J = 8,2$ Hz, 2,2 Hz); 7,65 (1H, d, 1Ar, $J = 2, 2$ Hz); 7,7-7,85 (5H, m, 4Ar + $\text{CH}=\text{$); 8,65 (1H, s, $-\text{OH}$).

EXEMPLO 10**Preparação de 2-(1-adamantil)-4-bromo-6-(N-ftalimidometil)-fenol**

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 10 de síntese.

Esquema 10 de síntese

A uma solução de 500 mg (1,63 mmol) de 2-adamantil-4-bromofenol em 7 ml de diclorometano adicionou-se 289 mg (1,63 mmol) de N-hidroximetilftalimida e duas gotas de H_2SO_4 concentrado. Manteve-se a mistura em refluxo durante 3 horas, diluiu-se com água e extraiu-se com diclorometano. Evaporou-se o solvente e submeteu-se a cromatografia através de gel de sílica, utilizando como eluente hexano:acetato de etilo a 80:20, para se obter 348 mg (46%) de produto.

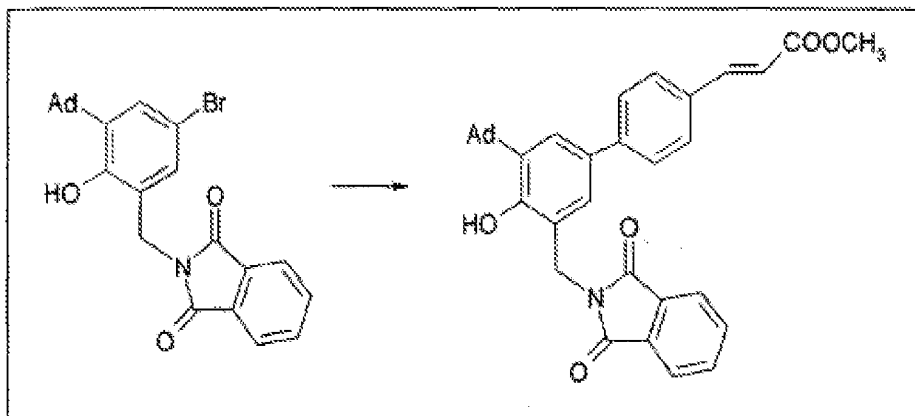
P.f. 253°C.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 1,78 (6H, s, 6Ad.); 2,09 (3H, s, 3Ad.); 2,12 (6H, s, 6Ad.); 4,76 (2H, s, $-\text{CH}_2-$); 7,28 (1H, d, 1Ar, $J = 2,94$ Hz), 7,45 (1H, d, 1Ar, $J = 2,94$ Hz); 7,76 (2H, dd, 2Ar, $J = 2,94$ Hz, $J = 5,52$ Hz); 7,88 (2H, dd, 2Ar, $J = 2,94$ Hz, $J = 5,52$ Hz); 8,13 (1H, s, $-\text{OH}$).

EXEMPLO 11

Preparação de E-4-(3-(1-adamantil)-5-(N-ftalimidometil)-4-hidroxifenil)-cinamato de metilo

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 11 de síntese.

Esquema 11 de síntese

Colocou-se em suspensão 100 mg de 2-(1-adamantil)-4-bromo-6-(N-ftalimidometil)-fenol em 1,6 ml de dioxano e sob uma corrente de azoto; adicionou-se 59,7 mg de (bispinacolato) de boro, 63 mg de acetato de potássio anidro, 5 mg de dicloro-(difenílfosfinaferroceno)-paládio e 103 mg de 4-bromocinamato de metilo. Manteve-se a mistura em refluxo durante 2 horas, colocou-se novamente em suspensão em acetato de etilo, acidificou-se com 1 mL de HCl 2 M, lavou-se a fase orgânica com uma solução saturada de NaCl, secou-se sobre Na₂SO₄, evaporou-se o solvente e submeteu-se a cromatografia através de gel de sílica, utilizando como eluente hexano:acetato de etilo a 65:35, para se obter 32 mg (27%) de produto.

P.f. 216°C.

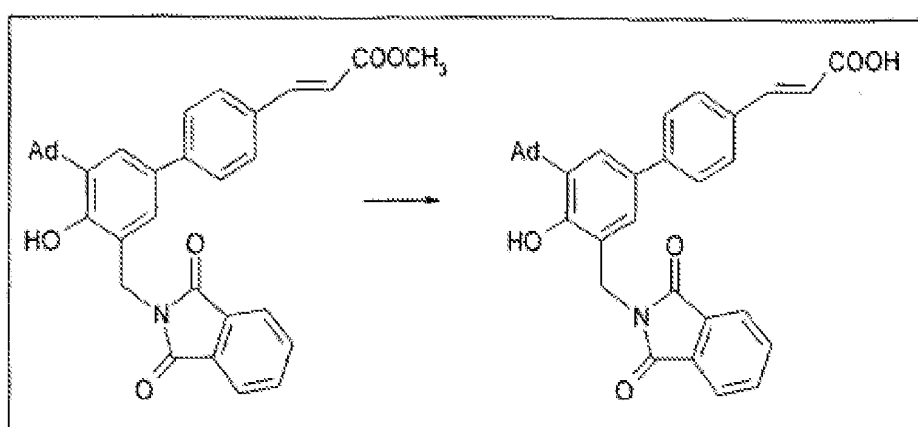
¹HNMR (CDCl₃) δ: 1,78 (6H, s, 6Ad.); 2,09 (3H, s, 3Ad.); 2,12 (6H, s, 6Ad.); 3,83 (3H, s, -OCH₃); 4,90 (2H, s, -CH₂-); 6,44 (1H, d, CH=, J = 16,18 Hz); 7,45-7,90 (11H, m, 10 Ar + CH=); 8,22 (1H, s, OH).

MS (m/z): 547 (M⁺, 100); 400 (30); 160 (30).

EXEMPLO 12

Preparação de ácido E-4-(3-(1-adamantil)-5-(N-ftalimidometil)-4-hidroxifenil)-cinâmico

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 12 de síntese.

Esquema 12 de síntese

Adicionou-se 30 mg de E-4-(3-(1-adamantil)-5-(N-ftalimidometil)-4-hidroxifenil)-cinamato de metilo a 1 mL de uma mistura a 3:1 de ácido acético e ácido clorídrico a 37% e manteve-se a mistura em refluxo durante 30 horas. Evaporou-se o ácido acético, depois retomou-se com água, filtrou-se o resíduo sólido e lavou-se com água. Obteve-se 24 mg de produto.

P.f. 216°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 1,73 (6H, s, 6Ad.); 2,04 (3H, s, 3Ad.); 2,12 (6H, s, 6Ad.); 4,81 (2H, s, $-\text{CH}_2-$); 6,45 (1H, d, $-\text{CH}=\text{}$, $J = 16,18$ Hz); 7,07 (1H, d, 1Ar, $J = 1,84$ Hz); 7,30 (1H, d, 1Ar, $J = 1,84$ Hz); 7,46 (2H, dd, 2Ar, $J = 8,82$ Hz, $J = 1,84$ Hz); 7,53 (1H, d, $-\text{CH}=\text{}$, $J = 16,18$ Hz); 7,64 (2H, dd, 2Ar, $J = 8,82$ Hz, $J = 1,84$ Hz); 7,78-7,94 (4H, m, 4Ar); 8,60 (1H, s, $-\text{OH}$); 12,5 (1H, s br, COOH).

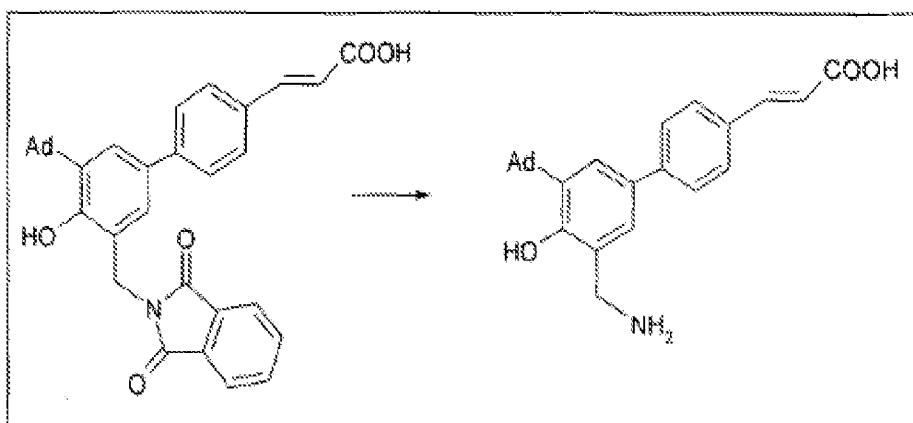
MS (m/z): 533 (M^+ , 100); 386 (40); 160 (60) 130 (50).

EXEMPLO 13

Preparação de ácido E-4-(3-(1-adamantil)-5-(aminometil)-4-hidroxifenil)-cinâmico

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 13 de síntese.

Esquema 13 de síntese 13



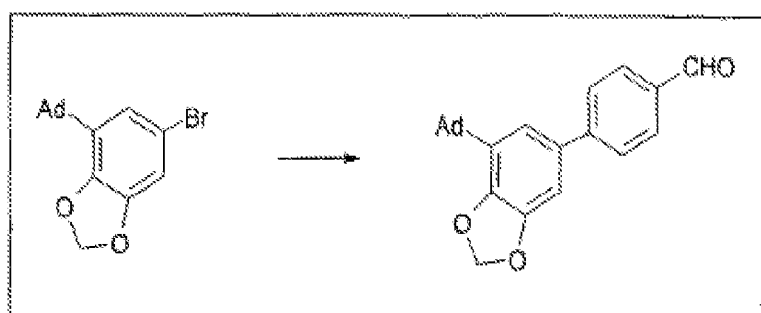
Colocou-se em suspensão 20 mg de ácido E-4-(3-(1-adamantil)-5-(N-ftalimidometil)-4-hidroxifenil)-cinâmico em 0,15 mL de metanol, adicionou-se 0,013 mL de hidrato de hidrazina e aqueceu-se a mistura durante 5 horas a 50°C. Evaporou-se o solvente, colocou-se novamente em suspensão em água, acidificou-se com HCl 2 M e filtrou-se o precipitado sob uma pressão hipobárica. Secou-se o produto impuro. Tratou-se com tetra-hidrofurano para se dissolver a ftalil-hidrazida e filtrou-se.

P.f. 195°C.

$^1\text{HNMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1,73 (6H, s, 6Ad.); 2,04 (3H, s, 3Ad.); 2,12 (6H, s, 6Ad.); 4,00 (2H, s, $-\text{CH}_2-$); 6,45 (1H, d, $-\text{CH}=$, $J = 16,18$ Hz); 7,07-8,00 (5H, m, 5Ar).

EXEMPLO 14Preparação de 4-(7-adamantan-1-il-benzo(1,3)-dioxol-5-il)-benzaldeído

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 14 de síntese.

Esquema 14 de síntese

Dissolveu-se 0,875 g (2,61 mmol) de 4-adamantan-1-il-6-bromo-benzo(1,3)-dioxol em 5,2 ml de tolueno e adicionou-se 2,6 mL de uma solução aquosa 2 M de Na_2CO_3 , 0,090 g (0,08 mmol) de tetraquis-trifenilfosfina-paládio e uma solução de 0,430 g (2,87 mmol) de ácido 4-formilbenzeno-borônico em 1,2 mL de etanol. Manteve-se esta mistura em refluxo durante 7 horas, sob uma corrente de azoto. Arrefeceu-se, retomou-se em acetato de etilo e lavou-se com uma solução saturada de NaCl . Secou-se a fase orgânica sobre Na_2SO_4 , filtrou-se e evaporou-se o solvente. Após cromatografia flash através de gel de sílica (Merck), utilizando como eluente hexano:acetato de etilo a 9:1, obteve-se 0,66 g de produto (70%).

^1H NMR (CDCl_3) δ : 1,80 (6H, s, 6Ad.); 2,09 (3H, s, 3Ad.); 2,12 (6H, s, 6Ad.); 6,02 (2H, s, $-\text{CH}_2-$); 7,01 (1H, d, 1Ar, $J = 1,86$ Hz); 7,04 (1H, d, 1Ar, $J = 1,86$ Hz); 7,68

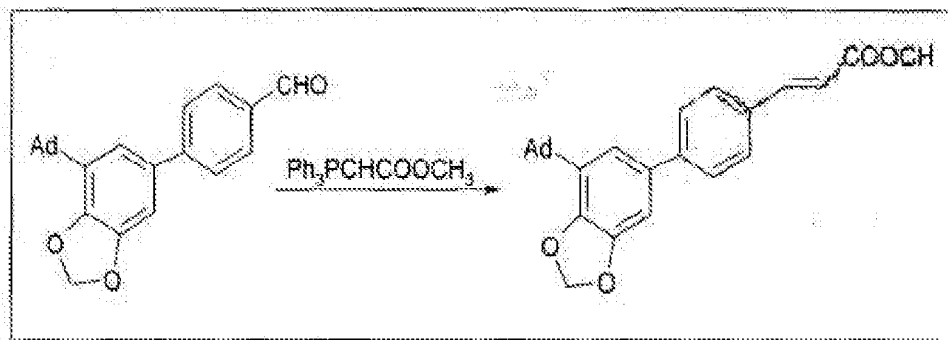
(2H, d, 2Ar, $J = 8,19$ Hz); 7,92 (2H, d, 2Ar, $J = 8,19$ Hz); 10,02 (1H, s, -CHO).

EXEMPLO 15

Preparação de E-4-(7-adamantan-1-il-benzo(1,3)-dioxol-5-il)-cinamato de metilo

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 15 de síntese.

Esquema 15 de síntese



Tratou-se, sob uma atmosfera de azoto, uma solução de 300 mg de 4-(7-adamantan-1-il-benzo(1,3)-dioxil-5-il)-benzaldeído em 4,5 mL de CHCl_3 com 278 mg de trifenil-fosforanilidenoacetato de metilo e manteve-se em refluxo durante 5 horas, com uma adição suplementar de ilida (20%) decorridas 3 horas. No final deste período, evaporou-se o solvente e submeteu-se o resíduo a cromatografia através de gel de sílica, utilizando como eluente hexano:diclorometano a 45:55. Obteve-se 298 mg de produto.

P.f. 205°C.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 1,72 (6H, s, 6Ad.); 2,06 (3H, s, 3Ad.); 2,12 (6H, s, 6Ad.); 3,80 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); 5,97 (2H, s, $-\text{CH}_2-$); 6,44 (1H, d, $\text{CH}=\text{$, $J = 16$ Hz); 6,95 (1H, d, 1Ar,

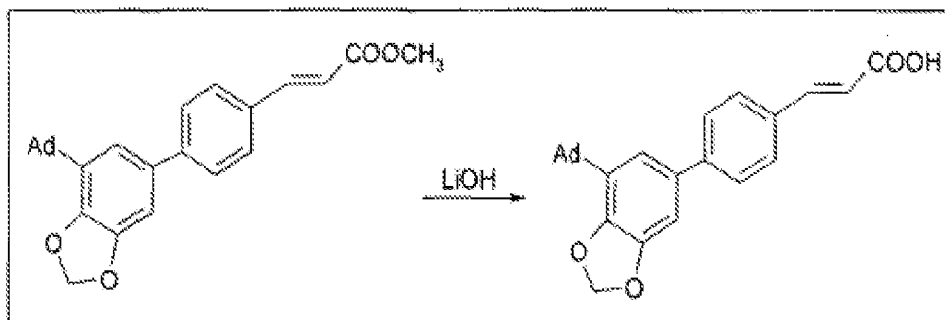
$J = 1,86 \text{ Hz}$); 6,98 (1H, d, 1Ar, $J = 1,86 \text{ Hz}$); 7,52-7,58 (4H, m, 4Ar); 7,71 (1H, d, $-\text{CH}=$, $J = 16 \text{ Hz}$).

EXEMPLO 16

Preparação de ácido E-4-(7-adamantan-1-il-benzo(1,3)-dioxol-5-il)-cinâmico

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 16 de síntese.

Esquema 16 de síntese



Colocou-se em suspensão 200 mg (0,48) de E-4-(7-adamantan-1-il-benzo(1,3)-dioxol-5-il)-cinamato de metilo numa solução de LiOH.H₂O em 25 mL de THF/H₂O a 3:2 e manteve-se sob agitação de um dia para o outro à temperatura ambiente. Evaporou-se o THF, lavou-se a suspensão de carboxilato com hexano, depois acidificou-se com HCl 2 N e arrefeceu-se num banho de gelo. Após filtração, obteve-se 150 mg (78%) de produto.

P.f. > 300°C. $F_r = 0,59$ (gel de sílica Merck, 60F₂₅₄, EtOAc/hexano a 9/1).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1,72 (6H, s, 6Ad.); 2,01 (3H, s, 3Ad.); 2,12 (6H, s, 6Ad.); 6,01 (2H, s, $-\text{CH}_2-$); 6,52 (1H, d, $-\text{CH}=$, $J = 16,18 \text{ Hz}$); 6,99 (1H, d, 1Ar, $J = 1,84 \text{ Hz}$);

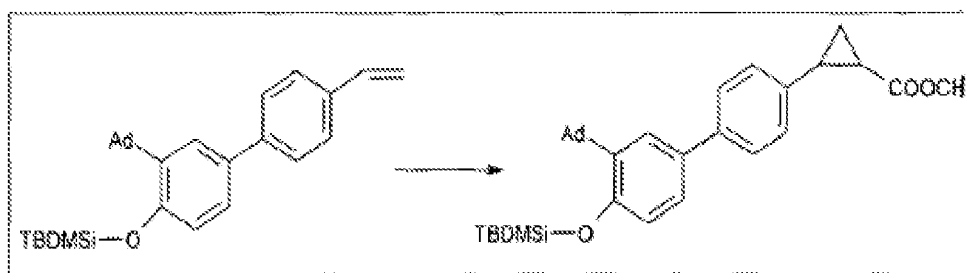
7,14 (1H, d, 1Ar, $J = 1,84$ Hz); 7,60 (1H, d, $-\text{CH}=$, $J = 16,18$ Hz); 7,62 (2H, dd, 2Ar, $J = 8,46$ Hz, $1,84$ Hz); 7,68 (2H, dd, 2Ar, $J = 8,46$ Hz, $1,84$ Hz).

EXEMPLO 17

Preparação de 2-[4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil)]-ciclopropanocarboxilato de metilo

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 17 de síntese.

Esquema 17 de síntese



Adicionou-se 0,5 mg de bi-hidrato de tetraacetato de ródio e 36 μL de diazoacetato de etilo a uma solução de 150 mg de (3-adamantan-1-il-4'-vinilbifenil-4-oxi)-terc-butil-dimetilsilano, preparada a partir do correspondente aldeído através de uma reacção de Wittig, em 2 mL de diclorometano. Manteve-se a mistura de reacção em repouso durante 5 dias à temperatura ambiente, com a adição de um total de 5 mg de catalisador e 10 μL de diazoacetato de etilo. Filtrou-se o catalisador através de celite, secou-se sobre sulfato de sódio, evaporou-se, submeteu-se a cromatografia através de gel de sílica, utilizando como eluente uma mistura a 65:35 de hexano:acetato de etilo.

Obteve-se 43 mg de uma mistura dos dois diastereoisômeros cis e trans.

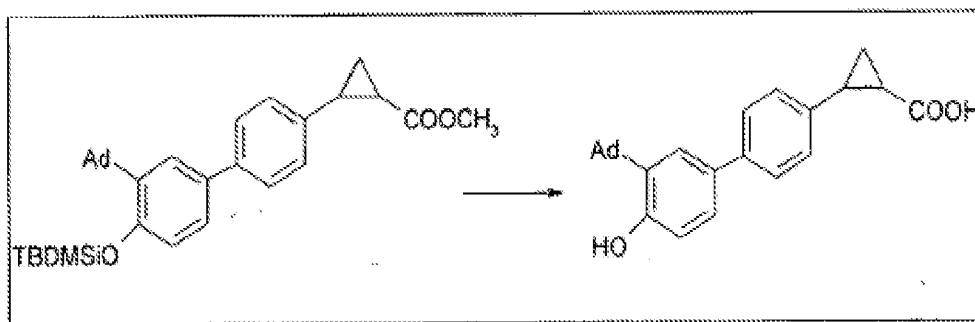
^1H NMR (CDCl_3) δ ; 0,45 (6H, s, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$); 0,95 (3H, t, $-\text{CH}_3$, $J = 7$ Hz); 1,1 (9H, s, tBu); 1,25 (3H, t, $-\text{CH}_3$, $J = 7$ Hz); 1,35-1,55 (1H, m, 1 $-\text{CH}_2$); 1,55-1,74 (1H, m, 1 $-\text{CH}_2$); 1,79 (6H, s, 6Ad.); 1,95 (1H, m, $-\text{CH}-\text{COOEt}$); 2,07 (3H, s, 3Ad.); 2,12 (6H, s, 6Ad.); 2,48-2,65 (1H, m, $-\text{CH}-\text{Ar}$); 3,85 (2H, q, $-\text{OCH}_2$, $J = 7$ Hz); 4,18 (2H, q, $-\text{OCH}_2$, $J = 7$ Hz); 6,82 (1H, dd, 1Ar, $J = 1,84$ Hz, 8,46 Hz); 7,15 (1H, d, 1Ar, $J = 8,46$ Hz); 7,25 (2H, dd, 2Ar, $J = 8,0$ Hz, 1,84 Hz); 7,45-7,50 (3H, m, 3Ar).

EXEMPLO 18

Preparação dos ácidos 2-(4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil)-ciclopropanocarboxílicos cis e trans

Os compostos em epígrafe foram preparados de acordo com o seguinte esquema 18 de síntese.

Esquema 18 de síntese



Adicionou-se 113 mg de KF sobre Al_2O_3 finamente esmagado (40%) a uma solução de 2-[4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil)-ciclopropanocarboxilato de metilo (110 mg) em 4,4 mL de dimetoxietano e agitou-se à temperatura ambiente durante 2 dias. Após filtração, evaporou-se o solvente e

adicionou-se o produto impuro a uma solução de 63 mg de LiOH.H₂O em 12,4 mL de tetra-hidrofurano a 50% em água. Agitou-se esta mistura à temperatura ambiente durante 3 dias, evaporou-se o solvente, extraiu-se com éter etílico, acidificou-se com HCl 2 M HCl e extraiu-se com acetato de etilo. Após evaporação, submeteu-se o produto (58 mg) a cromatografia através de gel de sílica, utilizando como eluente hexano:acetato de etilo a 40:60. Obteve-se 6 mg do ácido trans-2-4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil)]-ciclopropanocarboxílico, p.f. 190°C, 10 mg de uma mistura dos dois diastereoisómeros e 20 mg do ácido cis-2-[4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil)-ciclopropanocarboxílico].

P.f. 204°C, F_r = 0,23 cis; 0,44 trans (gel de sílica Merck, 60F₂₅₄, EtOAc/hexano a 6/4).

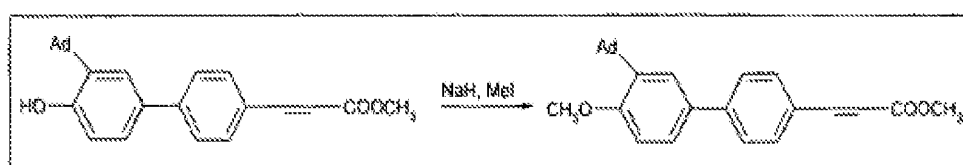
¹H NMR (MeOD) δ trans: 1,45-1,50 (1H, m, 1-CH₂); 1,60-1,65 (1H, m, 1-CH₂); 1,95-2,0 (7H, m, -CH-COOEt + 6Ad); 2,2 (3H, s, 3Ad.); 2,35 (6H, s, 6Ad.); 2,50-2,58 (1H, m, -CH-Ar); 6,84 (1H, d, 1Ar, J = 8,46 Hz); 7,24 (2H, dd, 2Ar, J = 7,35 Hz, J = 1,84 Hz); 7,31 (1H, dd, 1Ar, J = 8,46 Hz, 2,57 Hz); 7,42 (1H, d, 1Ar, J = 2,57 Hz); 7,52 (2H, dd, 2Ar, J = 7,35 Hz, J = 1,84 Hz).

¹H NMR (MeOD) δ cis: 1,40-1,50 (1H, m, 1-CH₂); 1,70-1,75 (1H, m, 1-CH₂); 1,95-2,0 (6H, s, 6Ad); 2,10-2,15 (4H, m, 3Ad + -CH-COOH); 2,30 (6H, s, 6Ad.); 2,70-2,78 (1H, m, -CH-Ar); 6,83 (1H, d, 1Ar, J = 8,46 Hz); 7,30 (1H, dd, 1Ar, J = 8,46 Hz, 2,57 Hz); 7,38 (2H, dd, 2Ar, J = 7,30 Hz, J = 1,84 Hz); 7,42 (1H, d, 1Ar, J = 2,57 Hz); 7,49 (2H, dd, 2Ar, J = 7,30 Hz, J = 1,84 Hz).

MS (m/z): 388 (M⁺, 100); 135 (50).

EXEMPLO 19Preparação de E-4-(3-(1-adamantil)-4-metoxifenil)-cinamato de metilo

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 19 de síntese.

Esquema 19 de síntese

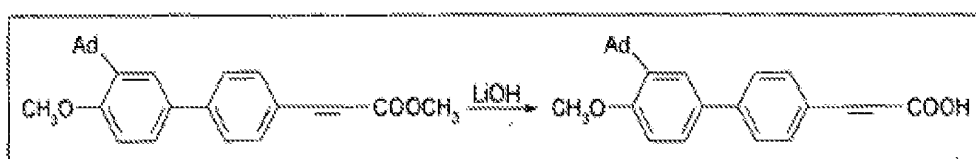
A uma suspensão de NaH (60% em óleo mineral, 66 mg, 2,74 mmol) em 3,3 mL de DMF, sob uma atmosfera de N₂, adicionou-se 969 mg (2,49 mmol) de E-4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxi)-cinamato de metilo. Agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante 1 hora e depois adicionou-se, gota a gota, 186 µL (2,99 mmol) de CH₃I.

Manteve-se a mistura de reacção em repouso de um dia para o outro à temperatura ambiente; depois adicionou-se 80 mL de água fria e extraiu-se a fase aquosa com CH₂Cl₂ (4 x 60 mL). Lavou-se as camadas orgânicas com água, secou-se sobre Na₂SO₄ e evaporou-se o solvente. Obteve-se 972 mg de produto (97%).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,75 (6H), 2,1 (9H), 3,75 (s, 3H, OCH₃), 3,80 (s, 3H, -COOCH₃); 6,40 (d, 1H, CH=, J = 16 Hz), 6,90 (d, 1H, 1 Ar, J = 8,8 Hz), 7,35 (dd, 1H, 1Ar, J = 8,8, 1,8 Hz); 7,42 (d, 1H, 1 Ar, J = 1,8 Hz); 7,48-7,53 (m, 4H, 4 Ar); 7,65 (d, 1H, CH=, J = 16 Hz).

EXEMPLO 20Preparação de ácido E-4-(3-(1-adamantil)-4-metoxifenil)-cinâmico (ST 1898)

O composto em epígrafe foi preparado de acordo com o seguinte esquema 20 de síntese.

Esquema 20 de síntese

Dissolveu-se 455 mg (10,8 mmol) de LiOH.H₂O em 90 mL de THF:H₂O a 1:1; adicionou-se 873 mg (2,17 mmol) de E-4-(3-(1-adamantil)-4-metoxifenil)-cinamato de metilo e manteve-se a solução obtida sob agitação à temperatura ambiente durante 2 dias. Evaporou-se o THF, acidificou-se com HCl 2 N e filtrou-se o precipitado branco. Lavou-se o sólido com AcOEt e com Et₂O para se obter 792 mg (94%) do composto em epígrafe.

$F_r = 0,28$ (gel de sílica Merck, 60F₂₅₄, EtOAc/hexano a 9/1).

¹HNMNR (DMSO-d₆) δ : 1,74 (6H, s, 6Ad.); 2,04 (3H, s, 3Ad.); 2,12 (6H, s, 6Ad.); 3,75 (3H, s, -OCH₃); 6,50 (1H, d, -CH=, J = 16 Hz); 6,98 (1H, d, 1Ar, J = 8,8 Hz); 7,40-7,70 (7H, m, 6Ar + CH=); 12,3 (1H, s lr, -COOH).

Citotoxicidade de ST 1926 para linhas celulares tumorais

Para se realizar os ensaios de citotoxicidade, foram utilizadas duas linhas celulares de leucemia promielocítica aguda (APL).

1. Linha celular NB4, que possui a translocação cromossômica t(15;17), que gera a proteína de fusão PML/RAR α . Esta linha celular é extremamente sensível à acção de diferenciação de doses farmacêuticas de ATRA (10^{-7} - 10^{-6} M).

2. Linha celular HL60, que responde a ATRA de um modo menos sensível em relação à linha celular NB4. Esta linha celular não possui a translocação cromossômica referida antes.

Manteve-se estas linhas celulares em meio RPMI 1640 que continha 10% de soro fetal de vitelo (FCS) e 1% de glutamina.

Também foram utilizadas linhas celulares diferentes provenientes de tumores sólidos.

1. Carcinoma da próstata humano PC3 e DU145. Manteve-se estas linhas celulares em meio RPMI 1640 que continha 10% de FCS, 1% de piruvato de sódio e 1% de glutamina.

2. Adenocarcinoma do cólon humano LoVo. Manteve-se esta linha celular em meio de HAM F-12 que continha 10% de FCS e 1% de glutamina.

3. Carcinoma do ovário humano, tal como A2780 e A2780/Dx, sensível e resistente a fármacos, respectivamente (doxorubicina, taxol, etopósido, vincristina); IGROV-1 e IGROV-1/Pt, sensível e resistente a quimioterapia à base de platina, respectivamente, e manteve-se em meio RPMI 1640 que continha 10% de FCS, 1% de piruvato de sódio e 1% de glutamina.

4. Melanoma humano MeWo e mês 2.21, glioblastoma GBM, carcinomas do pulmão de células não pequenas A431, NCI-H460, osteossarcomas SAOS e U2OS, e manteve-se em meio RPMI que continha 10% de FCS, 1% de piruvato de sódio e 1% de glutamina.

Os ensaios de citotoxicidade foram efectuados utilizando células de NB4 ou de HL-60 em suspensão (10000/cavidade). As células foram preparadas num volume de 250 µL em placas com 96 cavidades e mantidas a incubar durante 24 horas a 37°C. No dia seguinte, adicionou-se o composto de ensaio ST 1296, [ácido (2E)-3- [3'-(1-adamantil)-4'-hidroxi[1,1'-bifenil]-4-il]-2-propenoatético] a concentrações crescentes, e manteve-se as células a incubar durante mais 24 horas a 37°C sob uma atmosfera humidificada que continha 5% de CO₂. No terceiro dia, removeu-se o meio por centrifugação da placa a 1600 x g durante 10 minutos e decantou-se o sobrenadante. Adicionou-se 250 µL de PBS; depois centrifugou-se novamente as placas a 1600 x g durante 10 minutos e decantou-se o sobrenadante. Adicionou-se 200 µL/cavidade de meio RPMI 1640 que continha 10% de FCS e manteve-se as placas a incubar a 37°C durante mais 48 horas. No quinto dia, centrifugou-se novamente as placas a 1600 x g durante 10 minutos, removeu-se o meio por efusão e adicionou-se 200 µL de PBS e 50 µL de TCA frio a 80%. Manteve-se então as placas a incubar em gelo durante pelo menos 1 hora. Removeu-se o TCA por efusão; lavou-se as placas três vezes por imersão em água destilada e secou-se primeiro num papel e depois com uma corrente de ar quente. Adicionou-se a todas as cavidades 200 µL de sulforodamina B a 0,4% em ácido acético a 1%. Manteve-se as placas a incubar à temperatura ambiente durante mais 30 minutos. Removeu-se a sulforodamina B por efusão, lavou-se as placas três vezes por imersão em ácido acético a 1%, depois secou-se em primeiro lugar com papel absorvente e depois com uma corrente de ar quente. Adicionou-se 200 µL de base Tris 10 mM a cada cavidade e agitou-se as placas durante pelo menos

20 minutos. Determinou-se a densidade óptica utilizando um espectrofotómetro Multiskan a 540 nm.

Para as células aderentes, o procedimento adoptado foi o mesmo, embora a lavagem das placas ao terceiro dia tenha sido efectuada por efusão seguida da adição por três vezes de PBS e não por centrifugação a 1600 x g. De igual modo, também ao 5º dia, o sobrenadante foi removido por efusão.

Determinou-se a sobrevivência das células por incubação com ST 1926 durante 24 horas, decorridas 48 horas da remoção do composto. A incubação com o produto durante 24 horas foi capaz de inibir a proliferação de células de um modo dependente da concentração. O quadro 1 mostra os valores CI50 (concentração de produto que inibe a sobrevivência de células em 50%), calculados para cada linha celular de tumores estudada. O ST 1926 demonstrou uma citotoxicidade superior a cerca de 10 vezes para a linha de células do tumor de leucemia promielocítica humana NB4 (CI50 = 0,022 µM) em relação à calculada para outras linhagens tumorais.

Quadro 1

<u>Citotoxicidade celular de ST1926</u>	
Linha celular	IC50 (µM)
Leucemia promielocítica	
NB4	0,02
HL-60	0,2
Carcinoma da próstata	
PC3	0,21
DU145	0,10
Carcinoma do cólon	

Citotoxicidade celular de ST1926	
Linha celular	IC50 (μM)
LoVo	0,24
Carcinoma do ovário	
A2780	0,10
A2780/Dx	0,20
IGROV-1	0,23
IGROV-1/Pt	0,33
Melanoma	
MeWo	0,23
MeS 2,21	0,23
Glioblastoma	
GBM	0,18
Carcinoma do pulmão	
A431	0,25
NCI-H460	0,19
Osteossarcoma	
SAOS	0,25
U2OS	0,26

EXEMPLO 9

Avaliação do efeito de ST 1926 no ciclo celular tumoral

Para se avaliar o efeito do composto de acordo com a invenção sobre as diversas fases do ciclo celular, foram realizadas análises citofluorométricas do ciclo celular.

Preparou-se células HL60 e NB4 em placas a uma densidade de 150000 células/mL em meio RPMI 1640 que continha 10% de FCS, adicionou-se o composto de ensaio (ST

1926), solubilizado em 0,1% de DMSO com concentrações compreendidas entre 0,01 μM e 0,1 μM , na presença ou na ausência de doses sub-ótimas de ATRA (5 a 10 nM para NB4 e 0,5 μM para HL60) no escuro e colocou-se numa incubadora durante 3 dias sem se modificar o meio de cultura.

No terceiro dia de tratamento, retirou-se 500000 células para amostras, centrifugou-se a 180 x g durante 150 minutos e lavou-se duas vezes com PBS isento de cálcio e magnésio. Fixou-se as células ($1 \times 10^6/\text{mL}$ de fixador) pelo menos durante 1 hora numa mistura de fixação constituída por acetona/metanol a 1:4 v/v, manteve-se a -20°C e em PBS a 50% isento de cálcio e magnésio; depois centrifugou-se as células, lavou-se com PBS isento de cálcio e magnésio, centrifugou-se novamente e lavou-se. Manteve-se o precipitado celular a incubar durante 30 minutos no escuro e à temperatura ambiente com 200 μL de iodato de propídio (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 200 μL de ARNase (150 KU/mg).

Filtrou-se as amostras através de filtros de nylon (diâmetro de 60 μm a 80 μm) e analisou-se utilizando um cito-fluorímetro 'FACScan' (Becton Dickinson), adquirindo 20000 eventos/amostra, a um comprimento de onda de excitação de 488 e um comprimento de onda de emissão de 620 nm. As análises das percentagens das fases do ciclo celular foram realizadas utilizando um conjunto de programas informáticos dedicado, designado por 'Modfit' v. 2.0 (Becton Dickinson).

Para a análise do ciclo celular de células PC3 do carcinoma da próstata, preparou-se as células em placas a uma densidade de 500000 células/mL em meio de RPMI. Após o tratamento com o composto ST 1926 durante 24 horas, analisou-se as células conforme descrito antes.

EXEMPLO 9/1Avaliação do efeito de ST 1926 no ciclo celular de células NB4 de leucemia promielocítica humana

A análise do efeito do tratamento com ST 1926 (durante 3 dias) sobre o ciclo celular de NB4 demonstrou que o composto de acordo com a presente invenção, para concentrações compreendidas entre 0,08 μM e 0,1 μM , induz a interrupção do crescimento na fase S de duplicação do ciclo e apoptose. Os resultados obtidos encontram-se agrupados no quadro 2.

Quadro 2

<u>Efeito de ST1926 no ciclo celular de NB4</u>				
TRATAMENTO	G0/G1	S	G2+M	APOPTOSE
CONTROLO	53,4	35,5	11,1	26,6
ST1926 0,01 μM	48,4	38,8	12,8	19,9
ST1926 0,02 μM	48,2	39,4	12,4	28,4
ST1926 0,04 μM	51,3	35,7	13,0	33,9
ST1926 0,08 μM	41,4	53,6	5,0	45,0
ST1926 0,1 μM	50,6	46,1	3,3	53,6

EXEMPLO 9/2Avaliação do efeito de ST 1926 sobre o ciclo celular de células HL60 de leucemia promielocítica humana

A análise do efeito do tratamento com ST 1926 sobre o ciclo celular de células HL-60 durante 3 dias de tratamento, revela que para uma concentração compreendida entre 0,5 μM e 1,0 μM , não é possível determinar o ciclo

celular, no entanto, o composto demonstrou um efeito pró-apoptótico forte.

Os resultados obtidos encontram-se agrupados no quadro 3.

Quadro 3

<u>Efeito de ST1926 sobre o ciclo celular de células HL-60 de leucemia promielocítica humana</u>				
TRATAMENTO	G0/G1	S	G2+M	APOPTOSE
CONTROLO	57,9	30,9	11,2	10,5
ST1926 0,0025 µM	54,9	33,4	11,7	8
ST1926 0,005 µM	53,4	34,4	12,2	14,0
ST1926 0,01 µM	52,0	35,4	12,6	12,5
ST1926 0,05 µM	45,0	42,0	13,0	13,0
ST1926 0,1 µM	39,9	46,8	13,3	27,5
ST1926 0,5 µM	n.e.	n.e.	n.e.	82
ST1926 1 µM	n.e.	n.e.	n.e.	86,5

EXEMPLO 9/3

Efeito de ST 1926 no ciclo celular de células PC3 do carcinoma da próstata

A análise do efeito do tratamento durante 24 horas com ST 1926 sobre o ciclo celular de células PC3 revelou que imediatamente após a conclusão do tratamento, os compostos testados induziram a apoptose para a concentração mais elevada examinada (0,4 µM); decorridas 24 horas de recuperação celular, as células tinham sido acumuladas na fase S, e para uma concentração de 0,4 µM, induziu-se a apoptose celular.

Os resultados obtidos encontram-se agrupados no quadro 4.

Quadro 4

<u>Efeito de ST1926 sobre o ciclo celular de células PC3 de carcinoma da próstata humano</u>				
TRATAMENTO	G0/G1	S	G2+M	APOPTOSE
24 horas de tratamento e 0 horas de recuperação				
CONTROLO	54,8	24,6	20,6	8
ST1926 0,02 µM	54,0	24,2	21,8	9
ST1926 0,05 µM	55,8	23,6	20,6	11
ST1926 0,1 µM	52,0	35,4	28,0	10
ST1926 0,2 µM	n.v.	n.v.	n.v.	13,5
ST1926 0,4 µM	n.v.	n.v.	n.v.	25
24 horas de tratamento e 24 horas de recuperação				
CONTROLO	49,9	31,8	22,3	10,5
ST1926 0,02 µM	44,6	30,4	25,0	13
ST1926 0,05 µM	44,9	29,5	25,6	15
ST1926 0,1 µM	45,8	25,8	28,4	10
ST1926 0,2 µM	31,8	43,2	25,0	13
ST1926 0,4 µM	n.e.	n.e.	n.e.	26

Actividade citotóxica *in vitro* de ST 1926 em combinação com TRAIL (ligando indutor de apoptose associada ao factor de necrose tumoral)

Os linfócitos em conjunto com células naturais assassinas são responsáveis pela produção de TRAIL (ligando

indutor de apoptose associada ao factor de necrose tumoral), que é um membro da família das TNF-citoquinas (factor de necrose tumoral). Esta proteína membranar induz a apoptose em diversas células transformadas e ao contrário de outros membros desta família não aparenta ser citotóxica para células normais *in vitro*. A TRAIL induz a apoptose por meio da interacção com dois receptores de morte que contêm o domínio de morte, DR4 e DR5. Assim, a TRAIL é considerada como uma citoquina que induz a apoptose, selectiva de tumores, e um novo candidato potencial para a prevenção e para o tratamento do cancro (Neoplasia, 6: 535-546, 2001).

Foi realizado um estudo de citotoxicidade de ST 1926 em combinação com TRAIL em dias linhas celulares tumorais, tais como de carcinoma de pulmão M109 de murino e de carcinoma do vário humano resistente a multifármacos A278/DX. Manteve-se as células em meio RPMI 1640 que continha 10% de FCS, 1% de piruvato de sódio e 1% de glutamina.

Preparou-se as células num volume de 250 µL em placas com 96 cavidades e manteve-se a incubar durante 24 horas a 37°C. No dia seguinte, adicionou-se o composto de teste ST 1926 [(2E)-3-[3'-(1-adamantil)-4'-hidroxi-[1,1i-bifenil]-4-il]-2-propenoato/iónico ácido] ou TRAIL a concentrações crescentes e manteve-se as células a incubar durante mais 72 horas a 37°C sob uma atmosfera humedecida que continha 5% de CO₂. Ao 5º dia, removeu-se o sobrenadante por efusão. Adicionou-se 200 µL de PBS e 50 µL de TCA frio a 80%. Manteve-se as placas a incubar em gelo pelo menos durante 1 hora. Removeu-se o TCA por efusão; lavou-se as placas três vezes por imersão em água destilada e secou-se em primeiro lugar sobre papel e depois com uma corrente de ar quente.

Adicionou-se a todas as cavidades 200 µL de sulforodiamina B a 0,4% em ácido acético a 1%. Manteve-se as placas a incubar à temperatura ambiente durante mais 30 minutos. Removeu-se a sulforodiamina por efusão, lavou-se as placas três vezes por imersão em ácido acético a 1% e depois secou-se em primeiro lugar em papel absorvente e depois com uma corrente de ar quente. Adicionou-se a todas as cavidades 200 µL de base Tris 10 mM e agitou-se as placas pelo menos durante 20 minutos. Determinou-se a densidade óptica utilizando um espectrofotómetro 'Multiskan' a 540 nm.

Determinou-se a interacção entre ST1926 e TRAIL utilizando a análise descrita por Drewinko *et al.* (Cancer Biochem. Biophys. 1: 187-195, 1976).

A análise foi efectuada do modo seguinte:

$(S_{Fa} \times S_{Fb}) / (S_{Fa} + S_{Fb}) / 100$, em que o termo S_{Fa} representa a fracção de sobrevivência de ST1926 e o termo S_{Fb} representa a fracção de sobrevivência de TRAIL.

Os valores representam os seguintes efeitos:

Um valor > 1 - sinergismo, < 1 - antagonismo, $= 1$ sem efeito.

Em ambas as linhas celulares, o ST 1926 apresentou um efeito sinérgico com TRAIL (figuras 1 e 2).

Actividade anti-tumoral de ST 1926 nos modelos de carcinoma pulmonar em murinos M109 e 3LL

Manteve-se células Madison 109 (M109) de adenocarcinoma pulmonar de murino por passagem s.c. de fragmentos de tumor. No dia de inoculação, injectou-se i.m. a suspensão de células no membro posterior esquerdo de murganhos, BALB/c machos com 20 g, com uma densidade de 3×10^5 células/murganho. Manteve-se de um modo rotineiro

carcinoma de Lewis do pulmão de murino, 3LL, por passagens i.m. (a cada 10 a 14 dias) de 1×10^5 células/murganho, em murganhos C57BL/6J. Para as experiências da actividade anti-tumoral, excisou-se os tumores a partir dos murganhos dadores e, após desagregação mecânica e digestão enzimática, testou-se a viabilidade de células tumorais pelo teste de exclusão com pigmento azul de tripano. Depois, injectou-se i.m. 1×10^5 células/100 μ L/murganho no músculo da perna membro posterior direita de murganhos C57BL/6J.

Efectuou-se as medições das dimensões do tumor utilizando um calibrador digital (Vernier Caliper) a partir do dia em que a massa se tornou mensurável, duas vezes por semana. Testou-se a massa tumoral quanto ao tamanho das duas dimensões principais (comprimento e largura), expressas em mm, aplicando a fórmula $(\text{comprimento} \times \text{largura}^2)/2$, isto é, o volume do tumor em mm^3 . Para cada grupo experimental, calculou-se a percentagem de inibição do volume tumoral (%IVT) em relação ao do controlo, isto é, $(100 - (T/C\%))$. Avaliou-se a IVT 2 dias após a administração final de ST 1926.

Também se determinou o tempo de sobrevivência médio (TSM) e o aumento do tempo de vida médio, expresso como %ATV (aumento do tempo de vida), calculado como $(\text{ATV}_T/\text{ATV}_C) \times 100 - 100$.

A comparação entre os valores de IVT e do tempo de sobrevivência, obtidos para cada grupo, foi realizada por meio do teste de Mann Whitney não paramétrico para dados não emparelhados, utilizando o programa informático 'InStat' da GraphPad inc..

Preparou-se a solução de ST 1926 imediatamente antes da utilização, solubilizou-se numa mistura a 1:1 de cremofor:etanol e depois diluiu-se 1:4 com uma solução de soluto salino tamponada. Os tratamentos dos animais foram efectuados com um volume de 10 mL/kg. O esquema de tratamento para o ST 1926 com doses diferentes foi de 5 dias consecutivos (qdx5), com início 1 dias após a inoculação com as células tumorais, e foi repetido após 3 ciclos.

Em primeiro lugar, os murganhos (8 por cada grupo) foram pesados antes de cada tratamento, para se poder administrar a quantidade correcta da substância, com base nas eventuais variações do peso, observadas ao longo do período de administração do fármaco, e também para se poder registar a perda máxima de peso ao longo do tratamento (%PPB máx.).

Os resultados encontram-se agrupados no quadro 5 seguinte. O ST 1926 demonstrou um aumento na sobrevivência dos animais com tumores pulmonares de murino M109 para doses de 10 mg/kg, p.o., e de 15 mg/kg, i.p., de acordo com o protocolo de tratamento qdx5x3w e uma inibição da massa tumoral.

Além do mais, o ST 1926 aumentou o tempo de vida de murganhos com tumores 3LL para uma dose de 10 mg/kg, p.o., e uma diminuição do volume tumoral de 65%.

Quadro 5

Actividade anti-tumoral de ST1926 (qdx5x3w) para tumores do pulmão murino M 109					
Tratamento	Dose (mg/kg)	%PPB máx.	MST (intervalo de dias)	%ATV	%IVT
M109					
Controlo	/	9	22 (13-34)	/	/
ST1926	10, i.p.	9	*28 (25-35)	27	18
ST1926	15, i.p.	10	**36 (30-42)	64	*46
ST1926	10, p.o.	10	**35 (27-42)	59	*49
3LL					
Controlo	/	3	21 (15-33)	/	/
ST1926	10, po	7	*32 (24-42)	52	***65
*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs. controlo (Mann-Whitney).					

Actividade anti-tumoral de ST 1926 nos modelos de carcinoma do ovário humano, A2780 e A2780/Dx, e carcinoma de células não pequenas do pulmão humano, NCI-H460

Manteve-se as células do carcinoma do ovário humano, A2780, A2780/Dx e NCI-H460, em meio RPMI 1640 que continha 10% de FCS, glutamina 2 mM e 50 µg/mL de gentamicina, a 37°C sob uma atmosfera humedecida que continha 5% de CO₂. Efectuou-se a tripsinação das células, recolheu-se em meio completo, centrifugou-se a aproximadamente 1100 r.p.m. durante 10 minutos e colocou-se em suspensão novamente o precipitado resultante em meio 199 de Hank; efectuou-se esta operação duas vezes. Colocou-se em suspensão novamente em meio 199 de Hank a uma densidade de 20 x 10⁶/mL e injectou-se s.c. 0,1 mL (igual a 2 x 10⁶ células/murganho)

no flanco direito de murganhos fêmeas CD1 nu/nu, com 6 semanas de idade.

Preparou-se a solução de ST 1926 imediatamente antes da utilização, solubilizou-se numa mistura a 1:1 de cremofor:etanol e depois diluiu-se a 1:4 com solução de soluto salino tamponada. Os tratamentos dos animais foram administrados num volume de 10 mg/kg. O protocolo de tratamento para ST 1926 a doses diferentes foi de 5 dias consecutivos (qdx5), com início um dia após a inoculação de células tumorais e repetido durante 3 ciclos.

Foram efectuadas medições das dimensões do tumor utilizando um calibrador digital (Vernier Caliper) duas vezes por semana, a partir do momento em que a massa era mensurável. Avaliou-se a massa tumoral quanto ao tamanho das duas dimensões principais (comprimento e largura), expressas em mm, aplicando a fórmula $(\text{comprimento} \times \text{largura}^2)/2$, isto é, o volume tumoral em mm^3 . Para cada grupo experimental, calculou-se a percentagem de inibição do volume tumoral (%IVT) em relação ao controlo, nomeadamente $(100 - (T/C\%))$. Avaliou-se a IVT 2 dias após a administração final de ST 1926.

Mediu-se os murganhos até os tumores do grupo de controlo atingirem um peso de 2 g, e depois sacrificou-se os murganhos por deslocamento cervical.

Foi efectuada uma comparação entre os valores de IVT obtidos para cada grupo utilizando o teste de Mann Whitney não paramétrico para dados não emparelhados, utilizando o programa informático 'Instat' de GraphPad inc..

Os murganhos foram pesados antes de cada tratamento, em primeiro lugar para permitir a administração da quantidade correcta de substância, com base nas possíveis

alterações de peso observadas ao longo da administração do fármaco, e também para registar a perda de peso máxima ao longo do tratamento (%PPB máx.).

Os resultados encontram-se agrupados no quadro 6. Também para este caso, o ST 1926 inibiu a massa tumoral em murghanos com adenocarcinoma do ovário humano A2780 e A2780/Dx resistente a multi-fármacos e com carcinoma de células não pequenas do pulmão NCI-H460 para doses compreendidas entre 15 mg/kg e 5 mg/kg, p.o., de acordo com o protocolo de tratamento qdx5x3w.

Quadro 6

<u>Actividade anti-tumoral de ST1926 (qdx5x3w) para o carcinoma do ovário humano A2780, A2780/Dx e do carcinoma das células não pequenas do pulmão NCI-H460</u>				
Tratamento	Dose (mg/kg)	%PPB máx.	Mortalidade	%IVT±EP
A2780				
Controlo	/	0	0/8	/
ST1926	5, p.o.	3	0/8	*34±8
ST1926	10, p.o.	5	0/8	*39±5
A2780/Dx				
Controlo	/	0	0/8	/
ST1926	10, po	0	0/8	*34±3
ST1926	15, po	6	0/8	*54±9
NCI-H460				
Controlo	/			
ST1926	15, pro	4	0/8	*40±2
*P<0,05 vs. controlo.				

O ST 1926 demonstrou ser eficaz para uma dose de 15 mg/kg, p.o., de acordo com o regime qdx4x3w na presença e na ausência de taxol (15 mg/kg, i.p., de acordo com o regime q7dx3) para o carcinoma de células não pequenas do pulmão NCI-H460 (quadro 7).

Quadro 7

<u>Actividade anti-tumoral de ST1926 (qdx4x3w) para carcinoma de células não pequenas do pulmão NCI-H460 com e sem Taxol (q7dx3)</u>				
Tratamento	Dose (mg/kg)	%PPB máx.	Mortalidade	%IVT±EP
Controlo	/	3	/	/
ST1926	15, po	14	0/8	**38±8
Taxol	15, ip	4	0/8	0
1926+ Tax	15, po 15, ip	16	0/8	**°56±6
**P<0.01 vs controlo; °P<0.05 vs ST1926 (Mann-Whitney).				

O ST 1926 demonstrou uma actividade anti-tumoral significativa para uma dose de 15 mg/kg, p.o., de acordo com o regime qdx3x3w (quadro 8).

Quadro 8

<u>Actividade anti-tumoral de ST1926 (qdx3x3w) para carcinoma de células não pequenas do pulmão NCI-H460</u>				
Tratamento	Dose (mg/kg)	%PPB máx.	Mortalidade	%IVT±EP
Controlo	/	3	/	/
ST1926	15, po	4	0/8	*52±7
*P<0.05 vs controlo (Mann-Whitney).				

Citotoxicidade de ST 1879 para a linha de células endoteliais microcirculares da glândula adrenal de bovinos (BMEC)

Utilizou-se a linha de células endoteliais BMEC, preparada previamente a partir de glândulas adrenais de bovino obtidas no momento, do seguinte modo. Removeu-se as glândulas a partir dos animais, imediatamente após o seu sacrifício, e armazenou-se em gelo até ao seu transporte para o laboratório. Sob condições estéreis (numa hote para condições de perigo biológico), lavou-se as glândulas com uma solução de betadine durante 5 minutos e depois lavou-se com 2 litros de PBS estéril. Cortou-se então as glândulas em fragmentos, com cerca de 2 mm, com bisturis descartáveis estéreis e transferiu-se para tubos de poliestireno Falcon que continham PBS (30 mL por glândula). Após centrifugação a 600 r.p.m. numa centrifugadora refrigerada a 4°C, decantou-se o sobrenadante. Colocou-se novamente em suspensão os grânulos num volume igual (em relação ao volume do precipitado) de collagenase A (Boehringer Mannheim) a 0,12% e manteve-se a incubar a 37°C durante 2 horas, sob agitação. Após sucessivas filtrações através de filtros (Sigma), em primeiro lugar com uma malha 200 e depois com malha 100, adicionou-se o sobrenadante a uma solução de 15% de DMEM-PBS para inibir a acção da collagenase A. Centrifugou-se a solução a 1000 r.p.m. à temperatura ambiente e colocou-se novamente em suspensão o precipitado em meio DMEM que continha 20% de FBS, 50 µg/mL de extracto de cérebro de bovino (BBE), 50 µg/mL de heparina (Sigma), 0,5% v/v de gentamicina (Sigma), 1% v/v de L-glutamina e deixou-se desenvolver em pratos de Petri gelatinizados com 1 % de gelatina (gelatina suína, Sigma).

Depois de se atingir a confluência, caracterizou-se as células com marcadores endoteliais, tais como factor VIII.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando células BMEC. Deixou-se desenvolver as células num volume de 200 μ L em placas com 96 cavidades e manteve-se a incubar durante 24 horas a 37°C. No dia seguinte, adicionou-se o composto de ensaio ST 1879 a concentrações decrescentes compreendidas entre 200 μ M e 1,55 μ M. Manteve-se as células a incubar durante mais 24 horas a 37°C sob uma atmosfera humedecida que continha 5% de CO₂. No 3º dia, removeu-se o meio por efusão das placas e efectuou-se as lavagens das placas no 3º dia por efusão e adição de 300 μ L de PBS, 4 vezes. Após a lavagem, adicionou-se 200 μ L/cavidade do meio utilizado para o desenvolvimento em placas com gelatina, descrito antes. No 5º dia, removeu-se o meio por efusão das placas e tratou-se as células com uma solução de 15% de TCA arrefecido durante 1 hora. Lavou-se as cavidades três vezes com água por imersão das placas e removeu-se por efusão. Adicionou-se a cada cavidade 200 μ L de base Tris 10 mM e manteve-se as placas em sob agitação pelo menos durante 20 minutos. Determinou-se a densidade óptica utilizando um espectrofotómetro 'Multiskan' a 540 nm.

Determinou-se a sobrevivência das células por incubação com ST 1879 durante 24 horas e decorridas 48 após a remoção do composto. A incubação com o produto durante 24 horas permitiu inibir a proliferação celular, de um modo dependente da concentração. O quadro 5 mostra os valores CI50 (concentração de produto que inibe 50% da sobrevivência das células) calculados. O ST 1879 demonstrou uma citotoxicidade fraca igual a 105 μ M e uma concentração

não tóxica igual a 25 μM , a qual tem sido utilizada para estudar o efeito de ST 1879 na migração de células endoteliais (ver o quadro 9).

Quadro 9

Citotoxicidade celular de ST1879 para células endoteliais		
Linha celular	IC ₅₀ ±DP (μM)	CI ₀
BMEC	105±14	25 μM

Quimiotaxia de células endoteliais BMEC

Para se avaliar o efeito de ST 1879 na quimiotaxia de células endoteliais, foi utilizada uma câmara Boyden, constituída por uma câmara com duas cavidades, uma por baixo e a outra por cima, separadas por um filtro de polycarbonato com um tamanho de poro definido de 8 μm . Na cavidade inferior foi introduzido o factor quimioatractor, 1% de FBS em DMEM, e na cavidade superior foram introduzidas as células endoteliais microcirculares sub-renais de bovino (BMEC), numa suspensão em DMEM que continha 1% de albumina do soro de suíno isente de ácidos gordos. A capacidade do ST 1879 para inibir a migração celular através do filtro de polycarbonato na direcção do factor quimioatractor foi avaliada quantitativamente por contagem do número de células presentes no lado inferior do filtro. As percentagens de migração apresentadas no quadro 8 foram calculadas de acordo com a fórmula: $(\text{tratada} - \text{controlo}/\text{controlo}) \times 100$. O ST 1926 demonstrou inibição de quimiotaxia de células BMEC para o estimulante quimioatractor FCS, para concentrações iguais a 50 μM e 25 μM (quadro 10).

Quadro 10

<u>Inibição da migração de células BMEC induzida por ST1879</u>		
Linha celular	% de inibição da migração	
	50 μ M	25 μ M
BMEC	91% (6,1 células \pm 2,4 vs 72,1 \pm 7,4 células no controle)	42.7% (41,3 células \pm 10,2 vs 72,1 \pm 7,4 células no controle)

Efeito de ST 1879 na diferenciação de células HUVEC em matrigel

O ensaio de diferenciação de células endoteliais em matrigel é um ensaio normalmente utilizado para avaliar a actividade anti-angiogénica de um produto. O matrigel é um extracto membranar basal reconstituído proveniente de tumores, constituído principalmente por laminina e colagénio IV, sobre o qual as células endoteliais se organizam em estruturas tridimensionais semelhantes a capilares. A intensidade da rede é mensurável por meio de contagem microscópica de "nódulos", definidos como os pontos de intersecção a partir dos quais saem duas ou mais estruturas tubulares, ou por meio de um sistema de imagem computadorizado capaz de calcular a percentagem de área ocupada pelas estruturas capilares.

Colocou-se matrigel a 4°C (Becton-Dickinson) em placas com 24 cavidades e deixou-se gelificar a 37°C numa incubadora durante 30 minutos. Colocou-se em suspensão células endoteliais de cordão umbilical humano HUVEC (Clonetics) em 500 μ L de meio de cultura, na presença ou na

ausência de ST 1879 à concentração não tóxica de 25 μM e colocou-se em placas com matrigel. Após 5 horas de incubação, fixou-se as células com uma solução de 4% de paraformaldeído em PBS. Quantificou-se os resultados por contagem ao microscópio do número de nódulos/campo para três campos independentes e expressou-se sob a forma de percentagens em relação ao controlo positivo.

O ST 1879 apresentou uma inibição de 61% da diferenciação das células endoteliais em matrigel para uma concentração de 25 μM (quadro 11).

Quadro 11

Inibição da diferenciação celular HUVEC induzida por ST1879	
Linha celular	% de inibição de diferenciação em matrigel
HUVEC	ST1879 (25 μM)=61% (8,2 nódulos vs 21,2 nódulos no controlo)

Citotoxicidade celular de ST 1879 e de ST 1898 para linhas celulares tumorais humanas

Utilizou-se a linha celular de leucemia promielocítica aguda humana NB4 para se efectuar os testes de citotoxicidade, a qual foi mantida em meio RPMI 1640 que continha 10% de soro fetal de vitelo (FCS) e 1% de glutamina.

Também foram utilizadas outras duas linhas celulares de tumores sólidos.

1. Carcinoma da próstata humano PC3. Manteve-se esta linha celular em meio RPMI 1640 que continha 10% de FCS, 1% de piruvato de sódio e 1% de glutamina.

2. Adenocarcinoma do cólon humano LoVo. Manteve-se esta linha celular em meio de HAM F-12 que continha 10% de FCS e 1% de glutamina.

Os testes de citotoxicidade foram realizados utilizando 10000 células NB4/cavidade. Deixou-se desenvolver as células num volume de 250 µL em placas com 96 cavidades e manteve-se a incubar durante 24 horas a 37°C. No dia seguinte, adicionou-se o composto de ensaio ST 1879 a concentrações crescentes e manteve-se as células a incubar durante mais 24 horas a 37°C, sob uma atmosfera humedecida que continha 5% de CO₂. No 3º dia, removeu-se o meio por centrifugação da placa a 1600 x g durante 10 minutos e decantou-se o sobrenadante. Adicionou-se 250 µL de PBS; depois centrifugou-se as placas novamente a 1600 x g durante 10 minutos e decantou-se o sobrenadante. Adicionou-se 200 µL/cavidade de meio RPMI 1640 que continha 10% de FCS e manteve-se as placas a incubar a 37°C durante mais 48 horas. No 5º dia, centrifugou-se novamente as placas a 1600 x g durante 10 minutos, removeu-se o meio por efusão das placas e adicionou-se 200 µL de PBS e 50 µL de TCA arrefecido a 80%. Manteve-se então as placas a incubar em gelo pelo menos durante uma hora. Removeu-se o TCA por efusão; lavou-se três vezes as placas por imersão em água destilada e secou-se em primeiro lugar com papel e depois com uma corrente de ar quente. Adicionou-se a cada cavidade 200 µL de sulforodiamina B a 0,4% em ácido acético a 1%. Manteve-se as placas a incubar à temperatura ambiente durante mais 30 minutos. Removeu-se a sulforodiamina B por efusão, lavou-se três vezes as placas por imersão em ácido acético a 1% e depois secou-se em primeiro lugar sobre papel absorvente e depois com uma corrente de ar quente.

Adicionou-se a cada cavidade 200 μ L de base Tris 10 mM e agitou-se as placas pelo menos durante 20 minutos. Determinou-se a densidade óptica utilizando um espectrofotómetro 'Multiskan' a 540 nm.

Para as linhas celulares aderentes PC3 e LoVo, utilizou-se o mesmo procedimento, embora as lavagens das placas no 3º dia tenha sido efectuadas por efusão e por adição de PBS três vezes e não por centrifugação a 1600 x g. De igual modo, no 5º dia, o sobrenadante foi removido por efusão das placas.

Determinou-se a sobrevivência de células por incubação com ST 1879 ou ST 1898 durante 24 horas e decorridas 48 horas da remoção do composto. A incubação com o produto durante 48 horas foi suficiente para inibir a proliferação celular, de um modo dependente da concentração. O quadro 10 mostra os valores CI50 (concentração de produto que inibe em 50% a sobrevivência de células), calculados para cada linha celular estudada. O ST 1879 demonstrou uma citotoxicidade superior para as células LoVo (CI50 = 5,2 μ M) em relação ao calculado para a linhagem PC3 de carcinoma da próstata (CI50 = 13,6 μ M) e para a linhagem NB§ promielocítica humana (58,5 μ M). O ST 1898 também demonstrou ser mais activo para o carcinoma do cólon LoVo (ver o quadro 12).

Quadro 12

Citotoxicidade celular de ST1879 e ST1898		
Composto testado	Linha celular	CI ₅₀ ±DP (µM)
ST1879	NB4	58,5±3,2
ST1879	PC3	13,6±2,1
ST1879	LoVo	5,2±0,9
ST1898	NB4	8,8±0,6
ST1898	PC3	1,7±0,2
ST1898	LoVo	0,38±0,02

Efeitos pró-diferenciadores de ST 1879 e de ST 1898 em células NB4

Colocou-se células NB4 em placas com uma densidade de 150000 células/mL em meio RPMI 1640 que continha 10% de soro fetal. Tratou-se então as células com ST 1879 ou com ST 1898 em concentrações decrescentes compreendidas entre 0,4 µM e 0,01 µM e manteve-se numa incubadora durante três dias sem se modificar o meio. Para se medir o efeito de diferenciação, recolheu-se 500000 células de cada amostra, centrifugou-se e colocou-se novamente em suspensão em meio RPMI 1640 que continha 10% de soro, 1 mg/mL de nitro-azul de tetrazólio (NBT) e 100 ng de PMA (acetato de forbol-miristilo). Manteve-se a incubar as células, colocadas novamente em suspensão tal como descrito antes, a 37°C durante 60 minutos. Depois de se terminar a incubação, centrifugou-se as células e colocou-se novamente em suspensão o precipitado em suspensão em 1 mL de PBS que continha 10% de Triton x100. Submeteu-se as amostras a ultra-sons até se dar a citólise e depois leu-se utilizando um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm. As amostras que continham células diferenciadas apresentaram

uma coloração púrpura ao passo que as amostras de controlo e/ou as que não continha células diferenciadas permaneceram brancas ou com uma coloração muito menos intensa. A acção pró-diferenciadora de ST 1879 ou de ST 1898 foi avaliada em termos de CA50 (concentração de activação para 50% de diferenciação celular), tal como a seguir descrito. O ST 1898 demonstrou uma boa capacidade pró-diferenciadora, conforme verificado pelo valor de CA50 igual a 19 nM (quadro 13).

Quadro 13

<u>Efeito de pró-diferenciador de ST1879 e ST1898 sobre células NB4</u>	
Produto	CA50 (nM±DP)
ST1879	55 ± 9
ST1898	19 ± 0,8

Actividade angiostática de ST 1879, ST 1926 e ST 1898 no modelo de membrana corioalantóica de galinha (CAM)

A membrana corioalantóica de galinha é uma membrana muito vascularizada em que os vasos surgem ao 4º dia de desenvolvimento, desenvolvem um sistema arteriovenoso ao 8º dia de desenvolvimento e proliferam activamente até ao 11º dia.

O objectivo do estudo foi seguir o desenvolvimento dos vasos na CAM em condições basais e na presença de um indutor bFGF (factor de crescimento de fibroblastos básico) de vasoproliferação. Neste estudo foram utilizados ovos embrionários de galinha no estado inicial do seu desenvolvimento. No 3º dia de desenvolvimento, foi realizada uma operação para se abrir as cascas para se

tornar os vasos da CAM visíveis. Administrou-se o tratamento ao 9º dia de desenvolvimento por meio da aplicação de um fragmento de gelatina estéril ('GELFOAM', Pharmacia Upjohn), com cerca de 1 mm³, à superfície da CAM, sobre o qual se administrou bFGF (50 ng/embrião) ou os produtos em questão, durante 3 dias consecutivos.

A avaliação do efeito da molécula sobre a vasoproliferação foi obtida por comparação entre os vasos no instante sem tratamento com estes dos instantes finais (12º dia).

OS resultados encontram-se apresentados no quadro 14 seguinte. Os três produtos demonstraram possuir actividade angiostática no modelo de membrana corioalantóica de galinha para concentrações compreendidas entre 0,25 e 0,5 µg/embrião (quadro 14).

Quadro 14

<u>Actividade angiostática de ST1879, ST1926, ST1898</u>					
Tratamento	Concentração (µg/embrião)	n	9º dia (T0)	12º dia (72 horas)	Δvasos
bFGF	0,05	7	5±1	19±1	15±1
bFGF+1879	0,05+0,5	6	4±1	8±1	4±1 (-73%)
bFGF	0,05	6	3±1	22±1	19±1
bFGF+1926	0,05+0,25	8	3±1	12±2	9±2 (-53%)
bFGF	0,05	4	3±1	28±2	24±1
bFGF+1898	0,05+0,25	6	3±1	10±1	7±1 (-71%)
Os resultados são a média ± EP do número de vasos por esponja.					

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pelo requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o IEP não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- WO 9703682 A [0023]

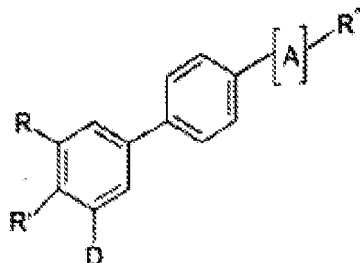
Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção

- **M.Sporn; A.Roberts; D.Goodman.** *The Retinoids*. Raven Press, 1994 [0003]
- **P.Chambon.** *FASEB J.*, 1996, vol. 10, 940-54 [0003]
- **van Hinsbergh VW; Collen A; Koolwijk P.** *Ann. Oncol.*, 1999, vol. 10 (4), 60-3 [0011]
- **Buolamwini JK.** *Curr. Opt. Chem. Biol.*, Agosto de 1999, vol. 3 (4), 500-9 [0011]
- **Ray JM.; Stetler-Stevenson WG.** *Eur. Respir. J.*, 1994, vol. 7 (11), 2062-72 [0015]
- **Stetler-Stevenson WG; Liotta LA; Kleiner DE Jr.** *FASEB J.*, Dezembro de 1993, vol. 7 (15), 1434-4 [0015]
- **Koch AE.** *Arthritis and Rheumatism*, 1998, vol. 41, 951-962 [0017]
- *Histol Histopathol*, Outubro de 1999, vol. 14 (4), 1287-94 [0020]
- *Br. J. Dermatol.*, Dezembro de 1999, vol. 141 (6), 1054-60 [0020]

- *Planta Med.*, Dezembro de 1998, vol. 64 (8), 686-95 [0020]
- *Cancer Research*, 2002, vol. 62 (8), 2430-6 [0023]
- *Blood*, 2000, vol. 95, 2672-82 [0023]
- *Leukemia*, 1999, vol. 13, 739-49 [0023]
- *Cancer Letters*, 1999, vol. 137, 217-2 [0023]
- *J. Med. Chem.*, 1995, vol. 38, 4993-5006 [0023]
- *Clin. Cancer Res*, 1999, vol. 5, 2304-10 [0024]
- *Eur. J. Pharmacol.*, 1993, vol. 249, 113-6 [0024]
- **Miyaura-Suzuki**. *Chem. Rev.*, 1995, vol. 95, 2457-83 [0045]
[0047]
- **Wittig**. *Org. Reactions*, vol. 14 [0046]
- *Org. Reactions*, vol. 25 [0046]
- **Knoevenagel**. *Org. Reactions*, vol. 15 [0046]
- **Henry**. *Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie*, vol. 10/1, 250 [0046]
- **Darzens**. *Org. Reactions*, vol. 5 [0046]
- **Heck**. *Org. Reactions*, vol. 27 [0048]
- **Charpentier et al.** *J. Med. Chem.*, 1995, vol. 38, 4993-5006 [0049]
- *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, vol. 81, 4256 [0050]
- *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, vol. 103, 5813 [0050]
- **Yang**. *J. Org. Chem.*, 1995, vol. 60, 3887-9 [0050]
- **De Luca et al.** *J. Org. Chem.*, 2001, vol. 66, 2534 [0052]
- **Sangmam**. *Synth. Commun*, 1998, vol. 28, 2945-58 [0053]
- **Charpentier et al.** *J. Med. Chem.*, 1995, vol. 38, 4993-5006 [0055]
- *Neoplasia*, 2001, vol. 6, 535-546 [0145]
- **Drewinko et al.** *Cancer Biochem. Biophys.*, 1976, vol. 1, 187-195 [0148]

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de fórmula estrutural (I)



em que:

o símbolo R representa cicloalquilo, adamantilo em que pelo menos um dos grupos CH pode ser substituído com C-halogéneo ou C-alquilo e um dos grupos CH₂ pode ser substituído por O, S, CH-halogéneo, CH-arilo, CH-heteroarilo, CH-arilalquilo, CH-heteroarilalquilo;

o símbolo R' representa OR''', OCOR''', COR^{IV};

o grupo R'-D representa O-(CH₂)_n-O; em que o símbolo n = 1-3;

o símbolo D representa H, OH, O-alquilo, (CH₂)_n-NH₂, (CH₂)_n-NH-alquilo, (CH₂)_n-OH, em que o símbolo n = 1-4;

o símbolo R'' representa tetrazol, SO₃H, NHSO₃H, CHO, COOH, COO-alquilo, CONHOH, CONH-arilo, CONH-C₆H₄OH, CH₂OR'''; PO₃H₂; CO(CH₂)_n-arilo, em que o símbolo n = 0-4;

o símbolo R''' representa H, alquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, SO₃H, D- ou L-glicosilo α ou β;

o símbolo R^{IV} representa H, OH, OR''';

o símbolo [A] representa [C(R^V, R^{VI})-C(R^{VII}, R^{VIII})]_n, [C(R^{IX})=C(R^X)]_n, [C≡C]_n, em que o símbolo n = 0-3;

os símbolos R^V, R^{VI}, R^{VII} e R^{VIII} representam H, alquilo, halogéneo, OH, OR''', NO₂, NH₂, arilo, -O-, -CH₂-, CX₂- (em que o símbolo X representa halogéneo), -CH(R''')-;

os símbolos R^{IX} e R^X representam H, OH, halogéneo, alquilo, arilo, CN, NO_2 , $COOR''$.

2. Compostos de fórmula: 2-[4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil)]-ciclopropanocarboxilato de metilo; ácido 2-(4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil)]-ciclopropanocarboxílico; ácido cis-2-(4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil)]-ciclopropanocarboxílico; ácido trans-2-(4-(3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil)]-ciclopropanocarboxílico.

3. Composição farmacêutica que compreende um composto de acordo com a reivindicação 1 ou 2 como ingrediente activo e pelo menos um excipiente e/ou diluente farmacêuticamente aceitável.

4. Utilização dos compostos de acordo com a reivindicação 1 ou 2 para a preparação de um medicamento.

5. Utilização de acordo com a reivindicação 4 para a preparação de um medicamento para o tratamento de patologias associadas a angiogénese alterada.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que a patologia é seleccionada entre o conjunto constituído por: patologia artrítica, tumores, metástases, retinopatia diabética, psoríase, inflamação crónica e aterosclerose.

7. Utilização de acordo com a reivindicação 6, em que a patologia é retinopatia diabética.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 6, em que a patologia é psoríase.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 6, em que a patologia é uma doença inflamatória crónica.

10. Utilização de acordo com a reivindicação 6, em que a patologia é aterosclerose.

11. Utilização de acordo com a reivindicação 6 para o tratamento de patologias artríticas.

12. Utilização de acordo com a reivindicação 4 para a preparação de um medicamento que possui actividade anti-tumoral.

13. Utilização de acordo com a reivindicação 12, em que a actividade anti-tumoral tem uma natureza citotóxica.

14. Utilização de acordo com a reivindicação 12, em que a actividade anti-tumoral tem uma natureza apoptótica.

15. Utilização de acordo com a reivindicação 12, em que a actividade anti-tumoral tem uma natureza anti-angiogénica.

16. Utilização de acordo com a reivindicação 4 para a preparação de um medicamento útil para a prevenção e para o tratamento de metástases tumorais.

17. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações 12 a 16, em que tumor é seleccionado entre o

conjunto constituído por: sarcoma, carcinoma, carcinóide, tumor ósseo, tumor neuro-endócrino, leucemia linfóide, leucemia mielóide, leucemia monocítica, leucemia megacariocítica ou doença de Hodgkin.

18. Utilização de acordo com a reivindicação 17, em que o tumor é uma leucemia promielocítica aguda.

19. Combinação constituída por um ou vários compostos de acordo com a reivindicação 1 ou 2 e um ou vários fármacos anti-cancro conhecidos.

20. Combinação de acordo com a reivindicação 19, em que o fármaco anti-cancro é seleccionado entre o conjunto constituído por: agentes alquilantes, inibidores da topoisomerase, agentes antitubulina, compostos intercalantes, anti-metabolitos, produtos naturais, tais como alcalóides de vinca, epipodofilotoxinas, antibióticos, enzimas, taxanos, compostos cito-diferenciadores, inibidores de fosfotirosina-cinase, tais como Iressa ou Glivec, TRAIL (ligando indutor de apoptose associada ao factor de necrose tumoral), agonistas dos receptores de DR4 ou de DR5 (locais de TRAIL), compostos para terapia anti-tumoral imunológica, vacinas anti-tumorais ou interferão α , β , γ .

21. Composição farmacêutica que compreende a combinação de acordo com a reivindicação 19 e um ou vários excipientes ou veículos farmacologicamente aceitáveis.

22. Utilização da combinação de acordo com a reivindicação 19 para a preparação de um medicamento para o tratamento de tumores.

23. Utilização de acordo com a reivindicação 23, **caracterizada pelo facto de** o composto de acordo com a reivindicação 1 ou 2 estar presente como coadjuvante do fármaco anti-cancro.

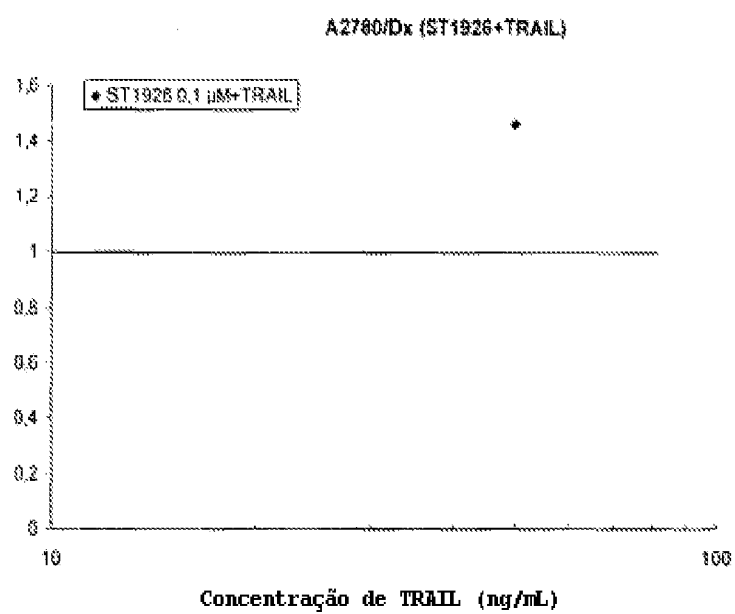
Figura 1

Figura 2