



Modalidade e n.º (11) 100.526 T		T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
Requerente (71): CLAUDIO D'ARRIGO, italiano, industrial, residente em Via Elea, I-00183 Roma RM, Itália,				
Inventores (72):				
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)	
Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido		
29.05.1991	IT	RM91A000372		
Epígrafe: (54) "AGENTES QUIMIOTERAPÊUTICOS DE ORIGEM VEGETAL COM ACTIVIDADE ANTINEOPLÁSI- CA, POSSUINDO SELECTIVIDADE ELEVADA E TOXICIDADE BASTANTE REDUZIDA E PRO- CESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO"				
Resumo: (máx. 150 palavras) (57) <p>A invenção refere-se a princípios activos que pos- suem actividade antineoplásica extraídos de plantas da famí- lia das Pittosporacea e refere-se também às composições far- macêuticas que incorporam pelo menos uma das substâncias ou composições existentes nesses extractos. Em relação a outros fármacos conhecidos anti-tumorais, estes fármacos quimiotera- pêuticos antineoplásicos exibem maior selectividade relati- vamente a células degeneradas e possuem um nível inferior de interferência com o metabolismo das células saudáveis. A presente invenção abrange também o processo para a extrac-</p>				

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS



Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido (22)	Classificação Internacional (51)
-----------------------	-----	---------------------	----------------------------------

Resumo (continuação) (57)

ção e para a separação dos componentes dos extractos e refe-
re-se ainda à sua utilização para a preparação de fármacos
antineoplásicos ou de fármacos para o tratamento de outras
patologias.

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBRÉADAS

☐ Agente Oficial da Propriedade Industrial



"AGENTES QUIMIOTERAPÊUTICOS DE ORIGEM VEGETAL COM ACTIVIDADE ANTINEOPLÁSICA POSSUINDO SELECTIVIDADE ELEVADA E TOXICIDADE BASTANTE REDUZIDA E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO"

Descrição

A presente invenção refere-se a substâncias e composições que possuem actividade antineoplásica extraídas de plantas da família das Pittosporacea, às preparações farmacêuticas que incorporam pelo menos uma dessas substâncias e às composições e aos processos para a sua extracção e, respectivamente, formulação.

Pelo menos sob o ponto de vista teórico sabe-se que uma das linhas mais promissoras de investigação que é de fácil aplicação na pesquisa para eliminar doenças neoplásicas reside na quimioterapia antitumoral. Os agentes anti-proliferativos que até ao momento presente foram isolados são provenientes de origens bastante diferenciadas e possuem características químicas bastante heterogéneas. Entre esses agentes anti-proliferativos encontram-se também algumas substâncias extraídas de plantas, tais como por exemplo colchicina e vincalécoblastina, sendo a primeira extraída de *Colchicum Autumnale* e a segunda extraída de *Vinca Rosea*. Embora essas substâncias anti-proliferativas exibam mais ou menos uma determinada actividade específica antitumoral, a sua selectividade para determinadas células degeneradas é geralmente bastante fraca. Sendo assim, o perigo proveniente da

possibilidade de poderem interferir com o metabolismo das células saudáveis constitui um obstáculo importante à sua utilização vulgarizada.

Surpreendentemente descobriu-se agora que a presente invenção permite ultrapassar as limitações referidas antes proporcionando um agente quimioterapêutico antineoplásico com base em princípios activos de origem vegetal e os quais são dotados de actividade antitumoral altamente selectiva e que possuem níveis de toxicidade muito inferiores aos de outros fármacos antitumorais.

O objectivo principal da presente invenção reside sobretudo num processo para a obtenção de substâncias e/ou composições que possuem uma determinada actividade antineoplásica, caracterizado pelo facto de se submeter partes e/ou produtos derivados de plantas da família das Pittosporaceae, em qualquer fase do seu desenvolvimento ou maturidade, essencialmente às operações seguintes:

a) a extracção dos componentes por maceração no seio de um dissolvente orgânico;

b) remexer e agitar facultativamente a solução contendo o extracto com outro dissolvente, que seja pelo menos parcialmente miscível com o primeiro, de modo a conseguir-se uma distribuição dos componentes do extracto pelas fases formadas;

c) tratamento facultativo de cada fase, independentemente umas das outras, com pelo menos outro líquido orgânico que possua propriedades dissolventes para pelo menos um dos componentes

do extracto, seguindo-se a filtração de qualquer suspensão que se tenha formado e a recolha da fase sólida e purificação ulterior;

d) separação facultativa dos componentes existentes em cada fase líquida;

e) recolha dos componentes separadas que possuam actividade antineoplásica e recolha daqueles que não possuam qualquer actividade antineoplásica.

Os extractos podem ser secos e purificados antes de se realizar qualquer outro passo do processo.

As plantas da família das Pittosporaceae são preferencialmente do género *Pittosporum*. Sendo assim, essas plantas podem ser seleccionadas, por exemplo, entre o grupo constituído por *Pittosporum undulatum*, *Pittosporum coriaceum*, *Pittosporum viridicolor*, *Pittosporum rhombipholium*, *Pittosporum eugenoides*, *Pittosporum crossifolium* e *Pittosporum Tobira* e as suas combinações.

O dissolvente pode ser um álcool. Obtém-se bons resultados utilizando o álcool etílico.

A proporção em volume entre o dissolvente orgânico e as partes das plantas que devem ser submetidas ao tratamento está compreendida preferencialmente entre 1:10 e 10:1.

Os tempos de tratamento estão compreendidos de preferência entre 5 minutos e 3 meses. As temperaturas de tratamento podem variar de preferência entre 5°C e 100°C.

A separação dos componentes do extracto pode efectuar-se de preferência por técnicas cromatográficas. Foram conseguidos



bons resultados recorrendo à cromatografia em coluna de gel de sílica ou recorrendo à cromatografia de coluna líquida preparativa de alta pressão (HPLC).

A extracção pode ser efectuada utilizando etanol e recolhendo os componentes que possuam tempos de retenção na cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em torno dos valores 1,157, 1,545, 1,883, 2,051, 2,273, 2,572 e 2,743.

Faz-se observar que os ensaios analíticos por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), tanto neste caso como nos casos seguintes, foram efectuados utilizando um cromatógrafo Perkin-Elmer da série 250 com uma coluna de tipo 125 mm* 4 mm RP 18 sendo a fase móvel constituída por uma mistura de metanol/água (80:20) e para um comprimento de onda igual a 210 nm.

Após a extracção com etanol a solução assim obtida pode ser agitada com clorofórmio obtendo-se duas fases, sendo uma delas a fase constituída por álcool/clorofórmio de cor verde intensa e sendo a outra uma fase aquosa de cor amarela alaranjada. Neste caso os componentes que possuem alguma actividade antineoplásica encontram-se na fase álcool/clorofórmio. A recolha dos componentes que possuem actividade antineoplásica efectua-se por técnicas cromatográficas após a secagem da fase álcool/clorofórmio e depois de se ter dissolvido esse soluto novamente em metanol. Efectuando a cromatografia da solução metanólica com recurso à técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) obtém-se os componentes que possuem tempos de retenção em torno dos valores 1,969, 2,296 e 2,756.

A solução álcool/clorofórmio pode ser concentrada por evaporação e é possível adicionar-se-lhe álcool isopropílico para formar uma suspensão que se submete a filtração, secando-se a fase sólida a quente e triturando-se homogeneamente num almofariz para formar um pó. Depois de se ter dissolvido novamente numa mistura de etanol/água é possível proceder à sua purificação por cromatografia de coluna sobre carvão activado. As duas fracções no estado sólido (impura e pura) dissolvidas numa mistura de etanol/água ou apenas em metanol podem ser submetidas e cromatografia de acordo com a técnica de HPLC, recolhendo-se os componentes com tempos de retenção em torno dos valores 1,157, 1,545 e 2,264.

A presente invenção refere-se também às substâncias e composições de per si, caracterizada pelo facto de ser possível obtê-las utilizando o processo descrito antes.

Constitui também um objectivo da presente invenção proporcionar substâncias e composições que possuam alguma actividade antineoplásica, caracterizadas pelo facto de ser possível obtê-las utilizando o processo descrito antes.

As substâncias e composições que possuem essa actividade antineoplásica podem ser tratadas para formarem sais, compostos ou complexos com o intuito de fazer com que sejam solúveis em água.

A presente invenção refere-se também às composições farmacêuticas, caracterizadas pelo facto de pelo menos um dos seus princípios activos ser uma substância ou uma composição selec-

cionada entre o grupo de substâncias ou composições que possuem actividade antineoplásica e que são obtidas pelo processo descrito antes, ou uma sua combinação.

Essas preparações farmacêuticas podem ser seleccionadas entre o grupo constituído por soluções aquosas para utilização parentérica, cápsulas para utilização oral, supositórios para utilização rectal, óvulos para utilização vaginal, unguentos, pomadas, cremes e geles.

A solução aquosa pode ser apresentada em boiões. Cada boião contém entre 0,1 e 2,5 g de princípio activo e de preferência contém entre 0,1 e 1,5 g e mais preferencialmente contém entre 0,2 e 1,0 g de princípio activo.

No caso de uma composição farmacêutica sob a forma de uma cápsula, cada uma dessas cápsulas contém entre 0,2 e 2,0 g de princípio activo e de preferência contém entre 0,8 e 1,2 g de princípio activo.

No caso de uma composição farmacêutica sob a forma de um supositório para utilização rectal, cada um desses supositórios contém entre 0,2 e 2,5 g de princípio activo e de preferência contém entre 0,3 e 1,0 g ou entre 1,2 e 1,7 g de princípio activo.

No caso de uma composição farmacêutica sob a forma de um óvulo para utilização vaginal, cada um desses óvulos contém entre 0,1 e 2,5 g de princípio activo e de preferência entre 0,5 e 2,5 g e ainda mais preferencialmente entre 0,3 e 1,7 g de princípio activo.

No caso de uma composição farmacêutica sob a forma de um unguento, pomada, creme ou gel, o excipiente local contém entre 0,5 e 12% de princípio activo e de preferência contém entre 3 e 7% de princípio activo.

Além disso, a presente invenção refere-se também à utilização dos componentes que é possível obter pelos processos de extracção, separação e recolha referidos antes, quer isoladamente quer em combinação, para a preparação de fármacos para o tratamento de diversas patologias diferentes das patologias neoplásicas.

Até este momento os objectivos da presente invenção foram descritos de uma forma geral. Tomando em consideração e como referência os exemplos adiante descritos proporciona-se uma descrição mais pormenorizada que permite clarificar em extensão características, vantagens e métodos exploratórios da presente invenção.

EXEMPLO 1

Método para a extracção e purificação dos princípios activos

Triturou-se finamente 1 Kg de frutos ainda não amadurecidos de *Pittosporum Tobira* e com o produto obtido preparou-se uma infusão à temperatura ambiente com uma quantidade de álcool etílico a 95^o suficiente para cobrir os frutos triturados (aproximadamente 1 : 1 em volume). Deixou-se a mistura em infusão du-

rante pelo menos 30 dias e depois filtrou-se. Introduziu-se uma quantidade de 1 000 ml do extracto alcoólico obtido conforme descrito antes num funil separador conjuntamente com um volume igual de clorofórmio. Depois de se ter agitado diversas vezes ocorreu a separação a qual ficou completa depois de decorridas 24 horas de mistura: na parte inferior do funil depositou-se uma solução de álcool/clorofórmio de cor verde intensa; na parte superior do funil formou-se uma solução aquosa de cor amarela alaranjada (fracção laranja solúvel = FSL) contendo substâncias solúveis em água extraídas da água inicialmente presente no fruto. Essa FSL encontra-se presente numa quantidade de aproximadamente 20% em volume e é praticamente constituída apenas por componentes que possuem tempos de retenção (TR) em HPLC correspondentes a 1,141 (3,45% da área), 1,440 (24,46% da área) e 1,593 (61,93% da área). A substância dessa FSL, que representa aproximadamente 73% em peso da substância seca do extracto alcoólico total, é formada por um pó amarelo esbranquiçado o qual não só é completamente inactivo sobre tumores experimentais como também auxilia realmente a sua evolução, fazendo com que essa seja mais rápida. Esta substância é removida. Depois evapora-se a solução constituída por álcool/clorofórmio residual à temperatura de 30°C num evaporador rotativo e seca-se. Obtém-se deste modo uma substância amorfa de cor verde escura a qual depois de ter sido novamente dissolvida em metanol (1 mg/ml) e analisada por técnicas de HPLC demonstra possuir uma notável concentração de picos activos com tempos de retenção variáveis desde 1,969 (7,83% da área)



até 2,296 (40,12% da área) ou até 2,756 (1,47% da área).

EXEMPLO 2

Método para a purificação dos princípios activos

Evaporou-se a solução constituída por álcool/clorofórmio obtida após as operações efectuadas no Exemplo 1 (constituída pelo total do extracto alcoólico menos a FSL) contida num balão, num evaporador rotativo, à temperatura de 45^o C, até se conseguir uma concentração com um volume de aproximadamente 30 ml (aproximadamente 1/35 do extracto alcoólico total inicial). Neste ponto da experiência introduziu-se no balão uma quantidade de álcool isopropílico igual a 30% do volume inicial total do extracto alcoólico (300 ml). Forma-se assim uma suspensão, como parte das substâncias obtidas no extracto alcoólico total menos a FSL, a qual é solúvel tanto em etanol como em metanol mas que já não é solúvel em isopropanol.

Filtra-se a suspensão assim obtida rapidamente sobre papel de filtro. O precipitado que fica depositado sobre o papel é submetido a secagem à temperatura de 45^oC. Depois de seco tritura-se finamente num almofariz de porcelana. Obtém-se deste modo cerca de 1500 mg de um pó amarelo esverdeado. Dissolve-se esse pó (daqui em diante designado por CIDI) em metanol e examina-se pelo método habitual de HPLC, verificando-se que possui tempos de retenção (TR) correspondentes a 1,157 (78,83% da área), 1,545

(16,25% da área) e 2,264 (4,91% da área).

Em alternativa, utilizando uma coluna de microesferas Sulpelcosil LC-NH₂-5 com a fase móvel constituída por CH₃CN/H₂O (3:1) com um débito de 1,5 ml/minuto e com detecção de UV a 217 nm, determinou-se os seguintes valores para os tempos de retenção TR: 1,889 (concentração 53,88); 2,640 (20,89); 3,145 (4,61); 3,420 (5,08); 3,942 (6,16); 4,722 (4,53); 5,255 (3,253); 6,287 (0,90) e 6,982 (0,66).

Utilizando uma coluna de partículas irregulares Chromopack-Lichrosorb RP 18-calibre 10/ μ , com o mesmo eluente, débito e marcador, obteve-se os picos seguintes: 1,460 (concentração 65,98); 1,965 (20,87); 2,535 (1,86); 2,704 (2,05); 3,097 (1,74); 3,395 (3,38); 4,324 (0,85); 4,609 (0,93); 9,597 (0,88); 10,017 (1,42).

Ao efectuar-se a calcinação a substância CIDI apresenta um resíduo correspondente a 3,17%. A análise elementar para valores percentuais relativos ao peso (sem levar em consideração o resíduo) proporciona os valores seguintes: C 54,25%; H 7,58%; O 38,17% a que corresponde uma fórmula empírica mínima próxima de C₁₅H₂₅O₈ e cujo ponto de fusão com decomposição (PF) está compreendido entre 196 e 222°C. O espectro de infravermelhos (espectrofotómetro de IV Perkin-Elmer Mod. 683) em meio de KBr e para a concentração de 1 mg/100 mg mostra as seguintes bandas observáveis:

3 400 cm⁻¹ com alongamento no sentido do grupo OH associado;
2960 cm⁻¹ com alongamento assimétrico no sentido do grupo CH₃;



2920 cm^{-1} com alongamento assimétrico no sentido do grupo CH_2 ;
1720 cm^{-1} com alongamento assimétrico no sentido do grupo $\text{C}=\text{O}$;
1610 cm^{-1} com alongamento assimétrico no sentido do grupo $\text{C}=\text{O}$ do radical COO^- ; 1460 cm^{-1} encurvando-se no sentido do grupo CH_3 ;
1380 cm^{-1} encurvando-se no sentido do grupo CH_3 (típico do radical OCOCH_3); 1250 cm^{-1} encurvando-se no sentido do grupo OH ; 1150, 1080 e 1040 cm^{-1} com alongamento no sentido do grupo $\text{C}=\text{O}$.

Espectro de UV (espectrofotômetro de UV Perkin-Elmer mod. Lambda 5):

1) Solução em $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (4:1), concentração correspondente a $6 \cdot 10^{-2}$ mg/ml;

absorção máxima a 202 nm; a absorção diminui rapidamente até aos 260 nm, permanece constante na região compreendida entre 260 e 330 nm e depois volta a diminuir;

2) Solução em $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (3:1); concentração correspondente a $6 \cdot 10^{-2}$ mg/ml;

a absorção diminui rapidamente na região compreendida entre 200 e 260 nm, permanece praticamente constante na região compreendida entre 260 e 330 nm e depois volta a diminuir.

O pó da substância CIDI é insolúvel em acetona, benzeno, clorofórmio, éter etílico, éter de petróleo, álcool etílico e álcool isopropílico; é solúvel em metanol e em água.

A solução aquosa da substância CIDI possui um pH com um valor de 6,5.

Valor da DL_{50} em murganhos Cr1: CD-1 (ICR) BR é de 1274,9 mg/Kg (limites de confiança 1041,2-1561,0 mg/Kg) por via oral e

é de 25 mg/Kg (limites de confiança 23,0-27,2 mg/Kg) por via intraperitoneal.

EXEMPLO 3

Outro método de purificação dos princípios activos

Dissolveu-se uma quantidade de 10g de pó da substância CIDI, obtido de acordo com o processo dos exemplos 1 e 2, em 1000 ml de uma solução constituída por álcool etílico e por água (4:1) obtendo-se uma solução a 1%, de cor verde. Preparou-se uma coluna cromatográfica com um diâmetro de 4,5 cm dotada com um separador poroso. Nesse separador introduziu-se uma camada de algodão e sobre ela colocou-se uma camada de areia com aproximadamente 3 cm de espessura. Depois verteu-se-lhe em cima uma suspensão contendo 35 g de carvão activado em etanol. Depois de o carvão activado estar bem compactado faz-se passar a solução do pó da substância CIDI (solubilizado conforme descrito antes) através de uma coluna cromatográfica. Depois de toda a solução da substância CIDI ter passado através da coluna cromatográfica procedeu-se à lavagem dessa coluna fazendo passar por ela 1000 ml apenas de dissolvente (mistura de álcool etílico e de água na proporção de 4:1).

Obtém-se deste modo uma solução límpida e incolor que se concentra até ao limite máximo num evaporador rotativo à temperatura de 45°C.

Observa-se a cristalização após a adição de álcool isopropílico. Após a secagem, novamente num evaporador rotativo, e trituração num almofariz obtém-se um pó branco que será de aqui em diante designado como substância CIDI pura. A substância CIDI pura corresponde a 60% em peso da substância CIDI inicial.

O pó dessa substância CIDI pura dissolvido em metanol e examinado pelo método habitual da HPLC exhibe dois tipos principais com valores TR correspondentes a 1,131 (87,54% da área) e 1,551 (6,16% da área).

Por outro lado, a HPLC com detecção de UV a 217 nm, fase móvel constituída por $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (3:1), com um débito de 1,5 ml/minuto proporciona os seguintes valores dos TR (picos principais):

1) em coluna de microesferas Supercosil LC-NH₂ - calibre 5μ : 1,885 (conc. 19,60); 16,259 (conc. 67,51);

2) em coluna de partículas irregulares Chrompack-Lichrosorb RP18- calibre 10μ : 1,617 (conc. 87,74); 1,985 (3,69) e 2,134 (2,20).

A substância CIDI pura é um produto sólido de cor branca solúvel em água que submetido a calcinação deixa um resíduo correspondente a 3,05%.

A análise elementar proporciona os seguintes valores percentuais em peso (sem levar em consideração o resíduo): C 48,82%, H 7,06%, O 44,12% com uma fórmula empírica mínima próxima de $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$ e cujo o ponto de fusão com decomposição (PF) se situa entre 205 e 255°C.

O espectro de IV é praticamente idêntico ao que se obtve com o produto CIDI original.

Espectro de UV (espectrofotômetro UV-Perkin-Elmer mod. Lambda 5):

1) solução em $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1), concentração correspondente a $6 \cdot 10^{-2}$ mg/ml:

absorção máxima a 203 nm; a absorção diminui rapidamente, não se observando praticamente nenhuma absorção a 260 nm;

2) solução em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (3:1), concentração correspondente a $6 \cdot 10^{-2}$ mg/ml:

a absorção diminui rapidamente na região compreendida entre 200 e 260 nm, depois permanece constante a um nível próximo de zero.

A solubilidade da substância CIDI pura é idêntica à da substância CIDI original e o valor do pH da solução aquosa também é o mesmo.

O valor de DL_{50} para administração intraperitoneal de substância CIDI pura em murganhos Crl: CD-1 (ICR) BR é de 20,2 mg/Kg (limites de confiança 17,8-22,0 mg/Kg).

Espectros de RMN da substância CIDI original e da substância CIDI pura:

Os espectros de RMN foram determinados com um aparelho Bruker AC 200 a 200 MHz (protão) e a 50 MHz (carbono). As amostras foram preparadas dissolvendo 90 mg do produto em 0,6 ml de DMSO- d_6 com adição de 10 mg de sal sódico do ácido 3-(trimetil-silil)-propano-sulfônico (DSS) como padrão interno.

Para os espectros de RMN-¹H foram acumulados 1000 transientes utilizando um impulso de 30°; procedeu-se a uma multiplicação de tipo Gaussiano dos valores FID para se aumentar a resolução. A permuta dos prótons móveis foi efectuada por adição de D₂O + CF₃COOH.

Para os espectros de RMN-¹³C foram acumulados 6 200 transientes no caso da substância CIDI impura e 14 900 transientes no caso da substância CIDI pura utilizando um impulso a 90° com desacoplamento heteronuclear em CPD.

A partir dos exames dos espectros de RMN-¹H deduz-se a presença de vários prótons móveis na região entre 3 e 5 ppm. Nota-se a presença de diversos prótons de natureza alquílica, diminuindo esses prótons alquílicos nas regiões de menor concentração. É eventualmente possível a presença de alguns prótons de natureza vinílica e a ausência de prótons de natureza aromática. Os espectros de RMN-¹³C confirmam os resultados anteriores, com a presença de um grande número de átomos de carbono de natureza alquílica mais ou menos substituídos. Nota-se a presença de alguns picos na região vinílica e a presença de alguns picos na região carbonílica, sendo os grupos carbonilo de tipo ácido ou de tipo éster.

O exame dos espectros não evidência quaisquer diferenças substanciais entre as duas misturas. Admite-se que seja possível uma diferença nos valores percentuais dos diversos componentes.

EXEMPLO 4

Método para a separação cromatográfica dos princípios activos

Submeteu-se a solução em álcool/clorofórmio, obtida em conformidade com o Exemplo 1, a secagem num evaporador rotativo e dissolveu-se novamente numa pequena quantidade de metanol (100 ml). Utilizando esta solução efectuou-se a separação cromatográfica tanto em coluna de gel de sílica como em coluna de HPLC preparativa realizada cuidadosamente. Obteve-se deste modo fracções puras as quais, conforme especificado antes, correspondem aos picos 1,157; 1,545; 1,883; 2,051, 2,273; 2,572 e 2,743.

EXEMPLO 5

Ensaios para evidenciar a actividade antineoplásica tanto in vitro como in vivo

As substâncias e/ou as composições obtidas em conformidade com os Exemplos anteriores, tanto as que são solúveis em água com as que são solubilizadas utilizando agentes tensio-activos (polisorbato 80 ou Geronol) demonstram possuir uma notável actividade antineoplásica conjuntamente com níveis aceitáveis de toxicidade e na ausência de actividade imunossupressora. Demonstrou-se a notável actividade selectiva antineoplásica sobre células tumorais, a um nível histológico, tanto in vitro como

in vivo, através das alterações evidentes que ocorreram nas células tumorais, as quais parecem aumentar de volume, conglutina-se, demonstram extroversão e desgaste da membrana celular, um citoplasma extremamente vacuolar e espumoso com hipocromia da cromatina nuclear e nucléolos pálidos. A prova evidente de que estas substâncias possuem elevada selectividade reside no facto de todas as lesões anteriormente enumeradas não ocorrerem de forma nenhuma nas células normais que foram submetidas ao mesmo tratamento.

As substâncias anteriormente referidas foram testadas in vivo para a determinação da sua actividade antineoplásica sobre murghanos da estirpe Suíça Sa 180 utilizando-se geralmente uma dose compreendida entre 2 e 25 mg/Kg/dia, de acordo com a substância utilizada, administrada por via intraperitoneal durante 8 dias consecutivos, com início no dia em que se efectuou o transplante. Em comparação com uma taxa média de sobrevivência correspondente a 25,8 dias para os animais de controlo, observou-se a rejeição do tumor em 90% dos animais tratados, os quais foram considerados conseqüentemente como sobreviventes definitivos.

Para aplicação terapêutica, as substâncias de acordo com a presente invenção, os seus sais, compostos ou complexos, são utilizadas preferencialmente em solução aquosa para injeção intramuscular, endovenosa ou endocavitária.



R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Processo para a preparação de composições e/ou substâncias que possuem uma actividade antineoplásica, caracterizado pelo facto de se submeter partes e/ou produtos derivados de plantas da família Pittosporaceae, qualquer que seja o seu estado de desenvolvimento ou de maturidade, aos procedimentos seguintes:

- a) extracção dos componentes por maceração no seio de um dissolvente orgânico;
- b) agitação ou sacudidura facultativas da solução contendo o extracto conjuntamente com um outro dissolvente, pelo menos parcialmente miscível com o primeiro, de modo a distribuir os componentes do extracto pelas fases formadas;
- c) tratamento facultativo de cada fase, independentemente uma da outra, com pelo menos um outro líquido orgânico que possua propriedades características de um dissolvente para pelo menos um dos componentes existentes no extracto, seguindo-se a filtração de qualquer suspensão que possa eventualmente ter-se formado e a subsequente dissolução da fase sólida num dissolvente adequado;



- d) separação facultativa dos componentes existentes em cada fase líquida; e
- e) recolha dos componentes separados que possuam actividade antineoplásica e recolha daqueles que não possuem qualquer actividade antineoplásica; secando-se e purificando-se facultativamente esses extractos antes de os submeter a qualquer outro passo ulterior do processo.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de as plantas pertencerem ao género *Pittosporum*.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de as plantas serem seleccionadas entre o grupo constituído por *Pittosporum undulatum*, *Pittosporum coriaceum*, *Pittosporum viridicolor*, *Pittosporum rhombifolium*, *Pittosporum eugenoides*, *Pittosporum crossifolium* e *Pittosporum Tobira*, e as suas combinações.

4.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de se escolher o dissolvente no grupo dos álcoois.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 4, caraç



terizado pelo facto de o álcool ser o etanol.

6.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de a proporção em volume entre o dissolvente orgânico e as partes vegetais que se pretende tratar estar compreendida entre 1:10 e 10:1.

7.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de o tempo de tratamento estar compreendido entre 5 minutos e 3 meses.

8.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de a temperatura de o tratamento estar compreendida entre 5°C e 100°C.

9.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de a separação dos componentes do extracto se efectuar por técnicas cromatográficas.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto de a separação dos componentes do extracto se efectuar numa coluna de gel de sílica.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 9, caracu



terizado pelo facto de a separação dos componentes do extracto se efectuar numa coluna preparativa de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

12.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de a extracção se efectuar utilizando etanol e por os componentes que possuem tempos de retenção distribuídos em torno dos valores 1,157, 1,545, 1,883, 2,051, 2,273, 2,572 e 2,743 serem separados utilizando uma técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e depois recolhidos.

13.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de a extracção se efectuar utilizando etanol, agitando-se a solução obtida com clorofórmio para proporcionar duas fases, sendo uma delas a fase álcool/clorofórmio de cor verde intensa e sendo a outra uma fase aquosa de cor amarela alaranjada, estando os compostos que possuem actividade antineoplásica contidos na fase de cor verde intensa.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de a separação dos componentes que possuem actividade antineoplásica se efectuar por técnicas cromatográficas após secagem da fase álcool/clorofórmio seguida de nova



solubilização do soluto em metanol.

15.- Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo facto de a separação dos componentes que possuem actividade antineoplásica se efectuar segundo uma técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e por se proceder à recolha dos componentes que possuem tempos de retenção distribuídos em torno dos valores 1,969, 2,296 e 2,756.

16.- Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de se evaporar a fase álcool/clorofórmio até ficar reduzida a cerca de 1/35 em volume do volume correspondente à solução alcoólica inicial e por se adicionar álcool isopropílico para formar uma suspensão que é submetida a filtração, aquecendo-se a fase sólida obtida até à secura e triturando-se para proporcionar um pó esverdeado.

17.- Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo facto de se fazer passar a fase sólida dissolvida numa mistura de álcool etílico/água (4:1) através de uma coluna de cromatografia sobre carvão activado obtendo-se uma solução límpida e incolor a qual ao ser concentrada, cristaliza por adição de álcool isopropílico e depois procede-se à secagem para proporcionar um pó branco o qual, submetido a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) exhibe dois pi-



cos principais a que correspondem valores TR (tempos de retenção) de 1,131 (87,54% de área) e 1,551 (6,16% de área).

18.- Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 e 17, caracterizado pelo facto de se separarem os componentes do sólido dissolvido em metanol por técnicas de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), recolhendo-se os componentes que têm tempos de retenção distribuídos em torno dos valores 1,157, 1,545 e 2,264.

19.- Substâncias e composições, caracterizadas pelo facto de ser possível obtê-las utilizando processos de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 18.

20.- Substâncias e composições que possuem actividade antineoplásica, caracterizadas pelo facto de ser possível obtê-las utilizando processos de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 18.

21.- Substâncias e composições que possuem actividade antineoplásica de acordo com a reivindicação 20, caracterizadas por serem obtidas sob uma forma seleccionada entre o grupo constituído por sais, compostos, complexos e suas combinações, com o objectivo de as tornar solúveis em água.

...



22.- Composição farmacêutica, caracterizada pelo facto de conter, como pelo menos um dos seus princípios activos, substâncias e composições seleccionadas entre o grupo de produtos que possuem actividade antineoplásica obtidos pelos processos de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 18.

23.- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo facto de ser preparada sob a forma de uma solução aquosa para utilização parentérica.

24.- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo facto de ser preparada sob a forma de cápsulas para utilização oral.

25.- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo facto de ser preparada sob a forma de supositórios para utilização rectal.

26.- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo facto de ser preparada sob a forma de óvulos para utilização vaginal.

27.- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo facto de ser preparada sob a forma de um unguento, uma pomada, um creme ou um gel.

28.- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo facto de estar contida em boiões, contendo cada boião 0,1 a 2,5 g de princípio activo.

29.- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo facto de cada boião conter de preferência entre 0,1 e 1,5 g e mais preferencialmente entre 0,2 e 1,0 g de princípio activo.

30.- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo facto de ser preparada sob a forma de cápsulas, contendo cada cápsula 0,1 a 2,0 g de princípio activo.

31.- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo facto de cada cápsula conter entre 0,8 e 1,2 g de princípio activo.

32.- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo facto de ser preparada sob a forma de supositórios para utilização rectal, contendo cada supositório 0,2 a 2,5 g de princípio activo.

33.- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 32, caracterizada pelo facto de cada supositório con

ter entre 0,3 e 1,0 g ou entre 1,2 e 1,7 g de princípio activo.

34.- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo facto de ser preparada sob a forma de óvulos para utilização vaginal, contendo cada óvulo 0,1 a 2,5 g de princípio activo.

35.- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo facto de cada óvulo conter de preferência entre 0,5 e 2,5 g e mais preferencialmente entre 0,3 e 1,7 g de princípio activo.

36.- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo facto de ser preparada sob a forma de um unguento, uma pomada, um creme ou um gel e com um excipiente para utilização tópica, contendo 0,5 a 12% de princípio activo.

37.- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 36, caracterizada pelo facto de o excipiente para utilização tópica conter entre 3 e 7% em peso de princípio activo.

...



38.- Utilização dos componentes que é possível obter pelos processos de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 18, quer individualmente quer em combinação, para a preparação de fármacos para o tratamento de patologias diferentes das patologias neoplásicas.

○ Agente Oficial da Propriedade Industrial



R E S U M O

"AGENTES QUIMIOTERAPÊUTICOS DE ORIGEM VEGETAL COM ACTIVIDADE ANTINEOPLÁSICA, POSSUINDO SELECTIVIDADE ELEVADA E TOXICIDADE BASTANTE REDUZIDA E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO"

A invenção refere-se a princípios activos que possuem actividade antineoplásica extraídos de plantas da família das Pittosporaceae e refere-se também às composições farmacêuticas que incorporam pelo menos uma das substâncias ou composições existentes nesses extractos. Em relação a outros fármacos conhecidos anti-tumorais, estes fármacos quimioterapêuticos antineoplásicos exibem maior selectividade relativamente a células degeneradas e possuem um nível inferior de interferência com o metabolismo das células saudáveis. A presente invenção abrange também o processo para a extração e para a separação dos componentes dos extractos e refere-se ainda à sua utilização para a preparação de fármacos antineoplásicos ou de fármacos para o tratamento de outras patologias.

Agente Oficial da Propriedade Industrial

