

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0806047-9 A2**

(22) Data de Depósito: 06/11/2008
(43) Data da Publicação: 14/09/2010
(RPI 2071)



(51) *Int.Cl.:*
C07D 493/02
A61K 31/35
A61P 35/00

(54) Título: **NOVOS COMPOSTOS DA FAMÍLIA DAS PTEROCARPAQUINONAS, PROCESSO DE PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO OS NOVOS COMPOSTOS DA FAMÍLIA DAS PTEROCARPAQUINONAS, USOS E MÉTODO TERAPÊUTICO**

(73) Titular(es): Universidade Federal do Rio de Janeiro

(72) Inventor(es): Alcides José Monteiro da Silva, Bartira Rossi Bergmann, Chaquip Daher Netto, Eduardo Caio Torres dos Santos, Eduardo Salustiano Jesus dos Santos, Ingrid Goretti Rica, Moises Clemente Marinho Cavalcante, Paulo Roberto Ribeiro Costa, Sergio Henrique Seabra, Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek, Wallace Pacienza Lima

(57) Resumo: NOVOS COMPOSTOS DA FAMÍLIA DAS PTEROCARPAQUINONAS, PROCESSO DE PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO OS NOVOS COMPOSTOS DA FAMÍLIA DAS PTEROCARPAQUINONAS, USOS E MÉTODO TERAPÊUTICO. Esta invenção pertence a área químico-farmacêutica, sendo os novos compostos da família das pterocarpaquinonas de fórmula (I) desta invenção são capazes de serem ativados por redução, gerando espécies alquilantes no meio intracelular, e apresentam efeito citotóxico seletivo, marcadamente para células animais mamíferos humanos e/ou não humanos que dividem constantemente; sendo portanto úteis no tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas ao fenômeno de proliferação celular indesejada bem como. Tais compostos também são efetivos para o tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas à elevação dos níveis TNF- α em animais mamíferos humanos e não humanos; bem como, esta invenção se refere ao processo de produção, a composições farmacêuticas contendo os ditos compostos de fórmula (1); aos usos dos ditos compostos de fórmula (1); ao medicamento contendo tais compostos e métodos de tratamento.



RELATÓRIO DESCRITIVO

NOVOS COMPOSTOS DA FAMÍLIA DAS PTEROCARPAQUINONAS, PROCESSO DE PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO OS NOVOS COMPOSTOS DA FAMÍLIA DAS PTEROCARPAQUINONAS, USOS E MÉTODO TERAPÊUTICO

5 CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção pertence à área químico-farmacêutica, sendo os novos compostos da família das pterocarpaquinonas desta invenção são capazes de serem ativados por redução, gerando espécies alquilantes no meio intracelular, e apresentam efeito citotóxico seletivo, marcadamente para células animais
10 mamíferos humanos e/ou não humanos que dividem constantemente; sendo, portanto úteis no tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas ao fenômeno de proliferação celular indesejada bem como. Tais compostos também são efetivos para o tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas à elevação dos níveis TNF- α em animais mamíferos humanos e
15 não humanos.

Esta invenção também se refere a um processo de produção econômica e ecologicamente viável dos novos compostos da família das pterocarpaquinonas.

O uso destes compostos e as composições farmacêuticas contendo estes
20 compostos também são objetos desta invenção.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O câncer é um grande problema de saúde pública em todo mundo, afetando indiscriminadamente todas as camadas da sociedade. Acomete em torno de sete milhões de pessoas por ano, sendo a segunda causa de morte
25 por doença nos EUA, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), entre 11,4% a 13,7% do total de óbitos no Brasil está diretamente relacionado a neoplasias, sendo o terceiro maior fator de mortalidade no País.

Devido ao grande investimento dos laboratórios farmacêuticos no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento do câncer,
30 uma diversidade de fármacos é disponível para uso clínico. Entretanto, a alta toxicidade em geral associada a essas substâncias e o desenvolvimento de linhagens de células com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (MDR,

do inglês multi drug resistance) exige um esforço contínuo visando o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Em contraste, os avanços terapêuticos têm sido bem mais modestos no que se refere ao combate das parasitoses. Isso reflete a falta de interesse e investimentos do setor privado, já que parasitoses como malária, leishmanioses e doença de chagas, por exemplo, afetam principalmente populações de baixa renda na África, Ásia e América do Sul.

Negligenciadas pelo setor privado, o controle dessas endemias depende, quase que exclusivamente, de iniciativas governamentais (universidades, institutos de pesquisa e laboratórios oficiais), havendo uma grande carência de alternativas para o tratamento quimioterápico. A abordagem terapêutica para estas parasitoses é complicada pelo aparecimento de resistência, tal qual mencionado para os agentes anticancerígenos, havendo também nestes casos a necessidade um esforço contínuo visando o desenvolvimento de novos fármacos.

Cabe colocar em destaque que alguns alvos moleculares são comuns aos agentes anticancerígenos e antiparasitários, tais como o DNA e enzimas da maquinaria de biossíntese do DNA. Entretanto, estas enzimas apresentam pequenas diferenças estruturais (isoformas) em função da espécie, o que torna possível a descoberta de inibidores biosseletivos.

Por outro lado, no caso das doenças parasitárias a biosseletividade também pode ser alcançada pela escolha de alvos biológicos que não se encontram presentes em células humanas, explorando as diferenças da fisiologia destes organismos em relação às células humanas.

Substâncias desenvolvidas para o tratamento do câncer podem encontrar uma aplicação terapêutica como agentes antiparasitários. É o caso da miltefosina, um alquilfosfolípideo desenvolvido e licenciado pelo governo indiano em março de 2002 para o tratamento da leishmaniose visceral por via oral, que encontra-se atualmente em teste clínico de fase IV, envolvendo 1200 pacientes (Sindermann, 2006). Um outro exemplo é a paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, um dos fármacos que vêm sendo testados em

formulações para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea do Novo Mundo. O seu uso tem se mostrado mais eficiente para o tratamento parenteral do que os compostos antimoniais. O caso da artemisinina também merece destaque. A potente ação antimalarial e o novo mecanismo de ação deste terpenóide conduziram à preparação de um grande número de derivados, os quais foram também avaliados como agentes antineoplásicos. A aplicação clínica desses derivados é preconizada tanto para o tratamento da malária quanto de certos tipos de câncer (Vennerstrom, 2005; Posner, 2002; 2003; 2004; 2004; Chen, 96). Finalmente, a atavaquona, uma naftoquinona originalmente investigada por suas propriedades anticancerígenas, vem sendo usada em terapêutica como antiprotozoário. É efetiva no tratamento de pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* e, em associação com o proguanil é usada no tratamento e prevenção da malária. Em associação com a azitromicina, é usada no tratamento da babesiosis. Seu uso para o tratamento de leishmaniose cutânea foi recomendado em publicação recente.

O metotrexato é um inibidor da síntese do ácido fólico. Como o ácido fólico é essencial a síntese da cadeia de DNA, vemos que esta substância vem sendo utilizado na clínica como um fármaco antineoplásico. Entretanto, seu derivado trimetrexato apresenta ação antiparasitária contra *Pneumocystis carinii*.

Inibidores da topoisomerase também são frequentemente utilizados tanto no tratamento de neoplasias, como no tratamento de parasitoses, como é o caso tanto dos antimoniais pentavalentes como da 9- anilinoacridina.

A glutathione (GSH) é uma enzima que protege o *Plasmodium falciparum* do estresse oxidativo de espécies reativas do oxigênio (ERO) (em particular $\cdot\text{OH}$). A manutenção dos níveis intracelulares de GSH depende basicamente da redução do tioperóxido GS-SG para GSH, catalisada pela glutathione redutase (GR). Esta enzima tem sido explorada no desenho de substâncias com ação antimalarial. Foi mostrado que a inibição de glutathione-S-transferases (GST) por agentes antimalariais de natureza quinônica, pode ser usada para inibir a resistência a agentes antineoplásicos.

Em 1863, Virchow descreveu a ocorrência de infiltrado de leucócitos em tecidos neoplásicos e com isso lançou a hipótese de que a origem do câncer estava relacionada com sítios de inflamação crônica (Balkwill and Mantovani, 2001). Desde então, vários estudos têm corroborado esta relação entre câncer e inflamação. Aproximadamente 25% de todos os casos de câncer tem a contribuição de infecção crônica e inflamação (Hussain and Harris, 2007). Inflamação intestinal, por exemplo, está associada com câncer de cólon, Carcinomas de próstata e pâncreas são associados com inflamações em tais órgãos. Fumo e exposição à sílica também estão associados à inflamação pulmonar e carcinoma; muitos agentes infecciosos causam tanto inflamação quanto câncer (Itzkowitz and Yio, 2004; Nelson et al., 2004; Whitcomb, 2004; Lin and Karin, 2007). De fato, a inflamação pode contribuir para cada estágio do desenvolvimento tumoral.(Lin and Karin, 2007). Muitos agentes como vírus e compostos químicos que promovem o processo inflamatório também induzem alterações somáticas. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio induzidas pela inflamação, que servem para combater a infecção, também causam dano ao DNA nas células hospedeiras. Essas alterações, conhecidas como iniciação, podem ser mantidas em um tecido normal até que as células iniciadas sejam estimuladas a crescer, em um processo chamado promoção. Fatores liberados no meio inflamatório podem atuar como promotores, uma vez que esses fatores estimulam a regeneração tecidual, mas também induzem proliferação celular e resistência a apoptose nas células tumorais. Por último, esses mesmos fatores facilitam a invasão e metástase de células tumorais, culminando na progressão, o último estágio da carcinogênese (Coussens and Werb, 2002; Lin and Karin, 2007).

Dentre os fatores inflamatórios que regulam o câncer, citocinas e quimiocinas são os agentes mais importantes envolvidos no desenvolvimento tumoral. Essas moléculas podem atuar como mediadores da relação entre células hospedeiras e tumorais (Kundu e Surh 2008). Os mediadores inflamatórios, como quimiocinas e citocinas, são os responsáveis pelo recrutamento de leucócitos da circulação sanguínea para o foco inflamatório

(Sacca et al., 1997; Yang et al., 1998). Além disso, promovem a expressão de moléculas de adesão no endotélio, que permitem a passagem dos leucócitos para o tecido inflamado (Blease et al., 1998).

5 No processo inflamatório o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória de papel importante na resposta inata de vertebrados (Varfolomeev e AshKenazi, 2004). Há duas décadas, o TNF- α é descrito como o mediador principal da patogênese do choque séptico (Beutler et al., 1985). Esta citocina é um dos produtos mais abundantes secretados por macrófagos, e diversas outras células, como neutrófilos, células Natural Killer (NK) e células T, são capazes
10 de liberá-la quando estimuladas com LPS (Goetz et al., 2004).

O TNF- α é sintetizado na forma de precursor que fica ancorado à membrana plasmática. Para passar a forma ativa, o pró- TNF- α é hidrolizado pela enzima conversora de TNF- α (TACE), uma metaloproteinase, liberando a forma solúvel de 17 KDa (Bárbara et al., 1996; Moss, 1997).

15 Para exercer suas atividades biológicas, o TNF- α precisa se ligar a receptores de membrana. São conhecidos dois receptores distintos capazes de se ligar ao TNF- α com alta afinidade: o TNF-R1 e o TNF-R2. De acordo com Bárbara (1996) e Chen (2002), o TNF-R1 seria o mais ativo e, portanto, inicia a maior parte das respostas biológicas.

20 A ligação do TNF- α ao domínio extracelular do TNF-R1 resulta na sua trimerização, liberando do domínio intracelular (ICD) do TNF-R1 uma proteína conhecida como proteína silenciadora de Domínios de Morte (SODD). O ICD livre então é reconhecido por uma proteína adaptadora do domínio de morte associado ao receptor TNF (TRADD). Esta se liga ao receptor e atrai a proteína
25 que interage com o receptor RIP (Ting et al., 1996), o fator associado ao receptor de TNF (TRAF2) e a proteína com domínio de morte associado ao Fas (FADD) (Chen e Goeddel, 2002).

Dependendo do estímulo, o TNF-R1 pode ativar 3 vias diferentes de sinalização intracelular. Uma delas leva à apoptose por intermédio da FADD,
30 que recruta a enzima caspase-8 para o complexo de receptores TNF,

destravando uma sequência de reações que culmina com a morte celular. Uma segunda sinalização é através da ação do TRAF2 que sinaliza para inibidores de apoptose, como a proteína inibidora celular de apoptose 1 e 2 (cIAP-1 e cIAP-2). Essa via é capaz também de ativar a via das MAP cinase e do NF- κ B.

5 A terceira via está ligada à ativação das enzimas do complexo IKK, responsável pela ativação do NF- κ B (Chen e Goeddel, 2002).

A supressão do TNF- α já é uma ferramenta reconhecida, inclusive na clínica, para o tratamento de doenças inflamatórias. Atualmente, novos compostos vêm sendo sintetizados como análogos da Talidomida, que possui
10 severos efeitos colaterais, como potentes inibidores da expressão de TNF- α , para serem utilizados como antiinflamatórios (Hutchison et al., 2008; Lima et al., 2002).

Apesar de primeiramente ser descoberto como um fator que induz necrose tumoral, daí o seu nome, há alguns anos já se sabe que esse efeito
15 aparentemente antineoplásico na verdade só ocorre quando o TNF- α é administrado localmente e altas concentrações o que acarreta inúmeros efeitos colaterais como febre, anemia, perda de peso e fadiga, tendo sido, portanto descartado como terapia antineoplásica (Slosarek & Balkwill, 2003). Interessantemente, vários trabalhos já associam o TNF- α endógeno como
20 indutor de crescimento tumoral e facilitador da invasão tumoral e metástase sendo o TNF- α responsável por induzir em tumores a produção de fatores de sobrevivência tumoral, por aumentar a mobilidade, invasão tumoral e aumentar a resistência a drogas citotóxicas, dentre outros efeitos que favorecem o estabelecimento e a progressão tumoral (Slosarek et al, 2006; Wu et al, 1999;
25 Shin et al., 2000). Por essas razões, terapias que envolvam a inibição do TNF- α no tratamento de cânceres já estão sendo propostas, inclusive trabalhos mais recentes apontam o tratamento com inibidores de TNF- α uma importante ferramenta na redução de tumores e na inibição de metástases (Waterston et al., 2004; Stasi et al., 2005; Glasmacher et al., 2005).

Além de neoplasias, sabidamente, o TNF encontra-se relacionado a outras doenças tais como artrite reumatóide, espongilite anquilosante, doença de Crohn, psoríase, infecções virais como hepatites e AIDS, além infecções bacterianas como lepra, tuberculose, brucelose, e de parasitoses como tripanossomíases e leishmanioses.

Drigo *et al* em 2006, demonstraram que a progressão da cardiomiopatia associada à doença de Chagas está diretamente relacionada aos níveis séricos do TNF- α nos portadores desta cardiomiopatia que apresentaram parada cardíaca. O uso do Etanercept, um bloqueador do TNF- α , durante a fase crônica da doença de Chagas atenuou o desenvolvimento da cardiomiopatia associada a doença de Chagas (Bilate *et al*, 2007).

Variações polimórficas na região promotora do gene TNFA sendo associadas a formas severas de infecções como malária, meningites, lepra e brucelose humana e bovina (Caballero *et al*, 2000; McGuire *et al*, 1994; Cabrera *et al*, 1995; Nadel *et al*, 1996; Roy *et al* 1997).

Recentemente, da Silva *et al*, desenvolveram uma nova família de compostos químicos denominadas de pterocarpanoquinonas de primeira geração, as quais são constituídas de um esqueleto pentacíclico mostrado na figura 1, onde os anéis A e B (sistema naftoquinônico) substituíram um anel aromático oxigenado presente na estrutura dos pterocarpanos.

A ação citotóxica dessas naftoquinonas pentacíclicas de primeira geração foi avaliada em linhagens de células de câncer de mama (MCF-7) (da Silva, 2002), leucemia (K562, Jurkat, Daudi, Raji, HL-60), inclusive sobre a linhagem Lucena I (fenótipo MDR) (Netto, 2008) e pulmão (A549 e H460, de fenótipo MDR). Os resultados obtidos com as células de fenótipo MDR, mostram que estas substâncias não são substratos para bombas de efluxo presentes nestas células (Litman, 2001; Juranka, 1989). As pterocarpanoquinonas de primeira geração foram avaliadas ainda em *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium falciparum* (cepa resistente à cloroquina) em cultura (Netto, 2008c), mostrando-se bastante efetivas frente a esses protozoários. Em contrapartida,

apresentaram baixa toxicidade (alta biosseletividade) para linfócitos ativados pelo PHA e linfócitos de murinos (da Silva, 2008).

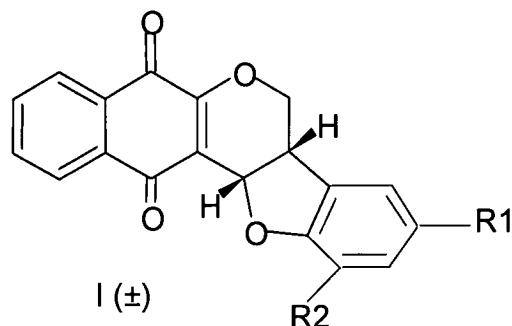
Pterocarpanoquinonas de segunda geração também foram sintetizadas (da Silva, 2008), onde o anel D originalmente de 5 membros foi substituído por um anel de 6 membros. Estas substâncias também apresentaram ação tóxica em linhagens de célula MCF-7 e em *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium falciparum* (cepa resistente à cloroquina) em cultura (Netto, 2008c), mostrando-se também bastante efetivas frente a esses protozoários. Também as pterocarpanoquinonas de segunda geração apresentaram baixa toxicidade (alta biosseletividade) para linfócitos ativados pelo PHA e linfócitos de murinos (da Silva, 2008).

Foi demonstrado (Netto, 2007) que as pterocarpanoquinonas de primeira geração, tal qual a mitomicina e análogos antraciclinas e a kalfungina (uma naftoquinona), são ativadas por redução, sendo capazes de reagir com o tiofenol, usado como modelo de nucleófilos biológicos. Assim, em adição a citotoxicidade apresentada por todas as quinonas, decorrente do mecanismo redox que conduz em última instância ao estresse oxidativo, as pterocarpanoquinonas de primeira geração podem atuar como precursores de intermediários reativos gerados *in situ*. Este possível mecanismo de ação é especialmente interessante no caso de tumores onde a região central, pouco vascularizada, recebe pequeno aporte de oxigênio e é pouco exposta ao estresse oxidativo. Este possível mecanismo de ação pode estar relacionado com a atividade destas moléculas em células resistentes ao estresse oxidativo.

O processo de produção destas pterocarpanoquinonas de primeira e segunda geração é, entretanto, economicamente inviável, pois requer na etapa chave do procedimento sintético uma reação mediada por quantidades estequiométricas de paládio. Outro problema é a utilização de fenóis contendo mercúrio em suas estruturas, fato que torna este processo de produção ambientalmente inadequado e inapropriado para a produção de fármacos.

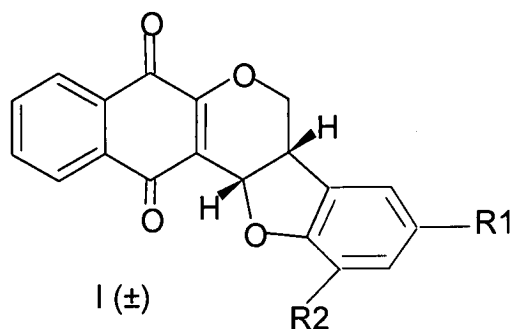
SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É um objeto desta invenção novos compostos da família das pterocarpanoquinonas, de fórmula geral (I):



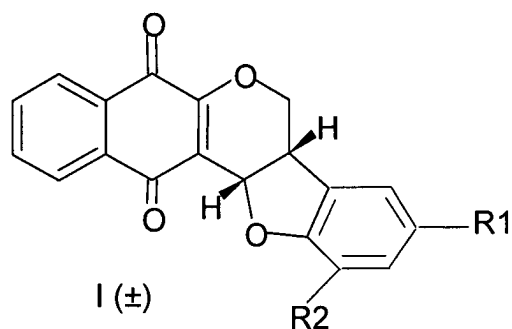
seus sais, solvatos e racematos. Os novos compostos da família das pterocarpanoquinonas possuem a capacidade de serem ativados por redução, gerando espécies alquilantes no meio intracelular, sendo, portanto úteis no tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas ao fenômeno de proliferação celular indesejada bem como, no tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas à elevação dos níveis TNF- α em um animal mamífero humano e/ou não humano.

O segundo objeto desta invenção é o processo de produção de novos compostos da família das pterocarpanoquinonas de fórmula geral (I):



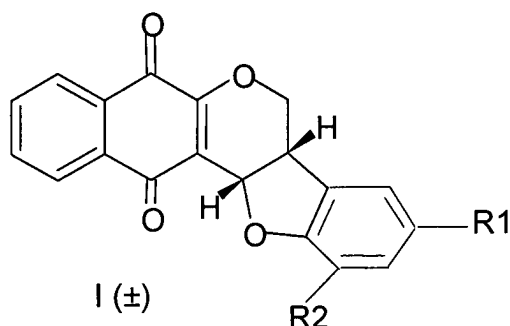
seus sais, solvatos e racematos, de forma economicamente viável e compatível ecologicamente.

Um terceiro objeto desta invenção é uma composição farmacêutica contendo os novos compostos da família das pterocarpanoquinonas de fórmula geral (I):



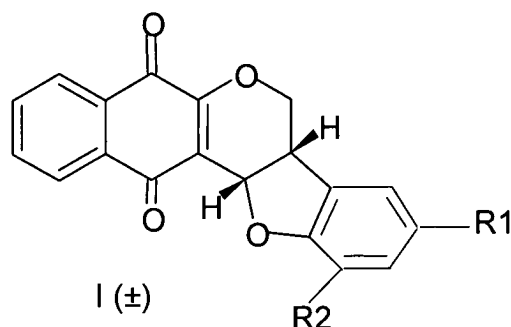
e/ou, seus sais, solvatos e racematos para o tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas ao fenômeno da proliferação celular indesejada, em animais mamíferos humanos ou não humanos.

- 5 O quarto objeto desta invenção trata-se uma composição farmacêutica contendo os novos compostos da família das pterocarpanoquinonas de fórmula geral (I):



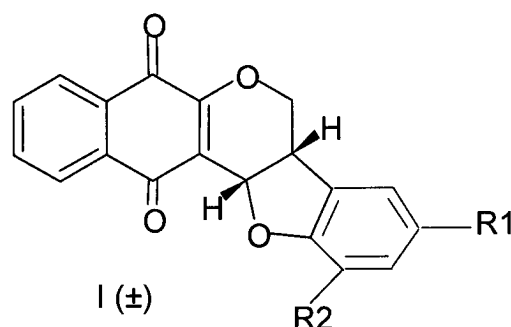
- 10 e/ou, seus sais, solvatos e racematos para o tratamento de doenças e/ou disfunções relativas ao aumento dos níveis do TNF- α , em animais mamíferos humanos ou não humanos.

O quinto objeto desta invenção trata-se do uso dos novos compostos de formula (I):



e/ou, seus sais, solvatos e racematos para a fabricação de um medicamento voltado para o tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas ao fenômeno de proliferação celular indesejada tais como neoplasias e parasitoses em animais mamíferos humanos ou não humanos.

O sexto objeto desta invenção trata do uso dos novos compostos de formula (I):



e/ou, seus sais, solvatos e racematos farmacologicamente aceitáveis, sozinhos ou uma combinação deles, para a fabricação de um medicamento voltado para o tratamento de doenças e/ou disfunções relativas ao aumento dos níveis do TNF- α em animais mamíferos humanos ou não humanos.

É ainda um objeto desta invenção, um medicamento contendo uma quantidade farmacologicamente aceitável de um ou mais dos novos compostos da família das pterocarpanoquinonas de fórmula (I).

O oitavo objeto desta invenção se refere a um método de tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas ao fenômeno de proliferação celular indesejada, tais como neoplasias e parasitoses em animais mamíferos.

O último objeto desta invenção se refere a um método de tratamento de uma doença e/ou disfunção relativa ao aumento dos níveis do TNF- α em animais mamíferos.

FIGURAS

5 Figura 1: Efeito citotóxico do composto LBQ 1 em diferentes linhagens de células neoplásicas, em A = K562, em B = Lucena, em C= Daudi e em D = HL60.

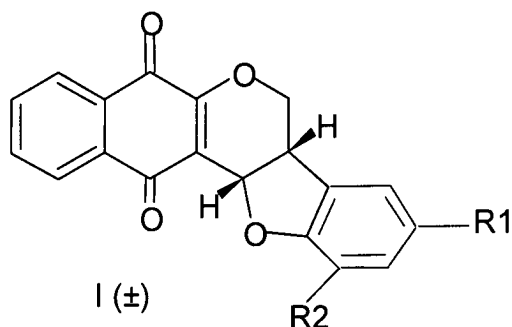
Figura 2: Verificação *in vivo* da eficácia da pterocarpaquinona LQB1 em células de leishmania.

10 Figura 3: Efeito *in vitro* do LQB 1 na inibição da liberação de TNF- α pelo PBMC. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. (# em relação ao grupo controle; § em relação aos grupos incubados com LQB 1, com $p < 0,05$).

Figura 4: Efeito *in vivo* do LQB 1 na inibição da liberação de neutrófilos no LBA. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. (* em relação ao grupo veículo; ** em relação ao grupo incubado com 1mg/Kg (Dose do IC50). $p < 0,05$).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção tem como objetivo descrever novos compostos da família pterocarpanoquinonas, de fórmula geral (I):



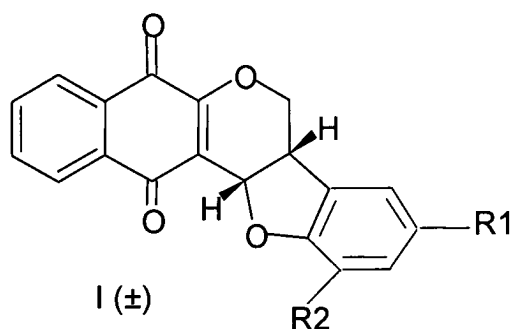
onde:

20 R1 pode ser H; hidroxila; alquil C1 a C8 cíclico ou alifático; aril C3 a C8 cíclico ou alifático; alquenil C3 a C8 cíclico ou alifático; alquenilil C3 a C8 cíclico ou alifático; um grupo éter C2 a C8; formila; metal alcalino; metal alcalino terroso; halogênio; nitro; amino; amina; CO₂R₃; um grupo álcool C1 a C8;

R2 pode ser H; hidroxila; alquil C1 a C8 cíclico ou alifático; aril C3 a C8 cíclico ou alifático; alquenil C3 a C8 cíclico ou alifático; alquenilil C3 a C8 cíclico ou alifático; um grupo éter C2 a C8; formila; metal alcalino; metal alcalino terroso; halogênio; nitro; amino; amina; um grupo álcool C1 a C8; e,

- 5 R3 pode ser H; alquil C1 a C8 cíclico ou alifático; aril C3 a C8 cíclico ou alifático; alquenil C3 a C8 cíclico ou alifático; alquenilil C3 a C8 cíclico ou alifático; metal alcalino; metal alcalino terroso; e halogênio.

Onde o novo composto da família das pterocarpaquinonas de fórmula (I):



- 10 pode se apresentar na forma de seus sais, solvatos e racematos.

Preferencialmente, R1 pode ser H; hidroxila; alquil C1 a C6 cíclico ou alifático; metal alcalino; halogênio; nitro; amino; amina; CO₂R₃; um grupo éter C2 a C6; formila; um grupo álcool C1 a C6; e,

- 15 R2 pode ser H; hidroxila; alquil C1 a C6 cíclico ou alifático; um grupo éter C2 a C6; formila; e,

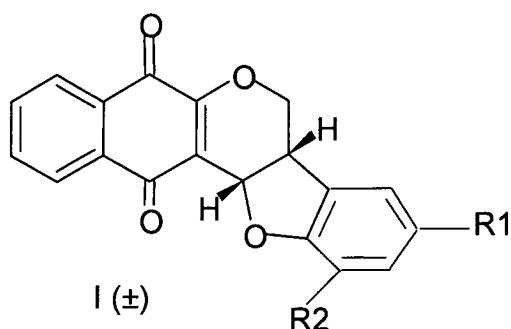
R3 pode ser H; OH; alquil C1 a C3 cíclico ou alifático; metal alcalino e; halogênio.

- 20 Mais preferencialmente ainda, R1 pode ser H; hidroxila; alquil C1 a C6 cíclico ou alifático; nitro; amino; amina; CO₂R₃; um grupo éter C2 a C6; um grupo álcool C1 a C6; formila;

R2 pode ser H; hidroxila; formila; um grupo éter C2 a C6; e,

R3 pode ser H; alquil C1 a C3 cíclico ou alifático; Na; K e; halogênio.

Os ditos compostos da família das pterocarpanoquinonas de fórmula (I):

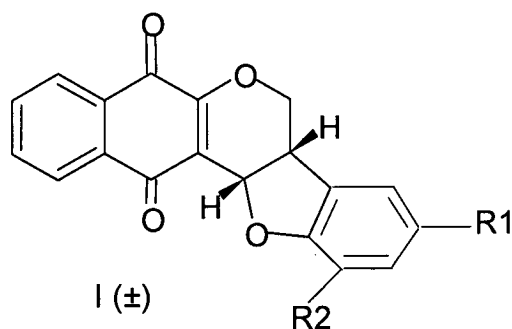


que são objetos desta invenção tem a capacidade de serem ativados por redução, gerando espécies alquilantes no meio intracelular, fato diretamente relacionado a danos tanto na estrutura da molécula de DNA como na

5 maquinaria enzimática responsável pela duplicação do DNA. Desta forma, os ditos compostos da família das pterocarpanoquinonas de fórmula (I) objetos desta invenção promovem a interrupção do ciclo celular, interrompendo assim a proliferação celular de células de animais mamíferos humanos e/ou não humanos que se dividam constantemente, ou seja, células com proliferação

10 indesejada.

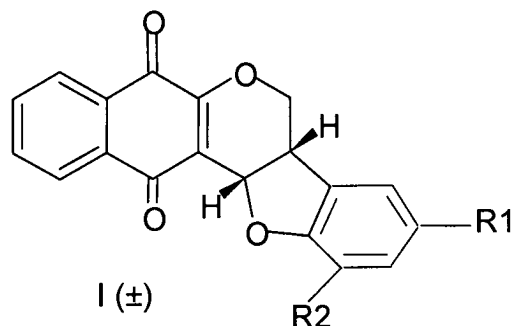
Os novos compostos da família das pterocarpanoquinonas de fórmula (I):



são capazes de apresentam efeito citotóxico seletivo, capaz de interromper o ciclo celular em células que se dividem constantemente, como por exemplo,

15 células neoplásicas e células de parasitos em geral, sem, entretanto, apresentar toxicidade para os linfócitos de animais mamíferos humanos e/ou não humanos ativados pelo PHA, que também encontram-se em rápida proliferação.

Também foi verificado nos testes realizados o efeito que os novos compostos da família das pterocarpanoquinonas de fórmula (I):

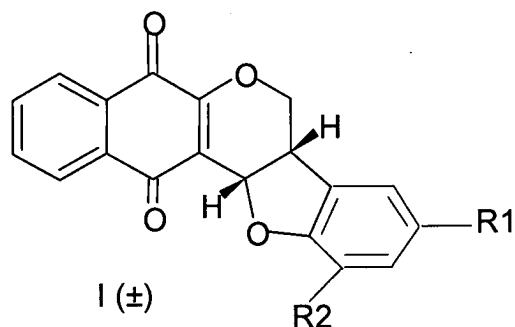


objeto desta invenção possuem de provocar a redução dos níveis do fator de
 5 necrose tumoral alfa (TNF- α) in vivo em animais mamíferos humanos e/ou não
 humanos.

Portanto, os novos compostos da família das pterocarpanoquinonas aqui
 descritos podem ser empregados no tratamento de doenças e/ou disfunções
 relacionadas ao fenômeno de proliferação celular indesejada tais como
 10 neoplasias e parasitoses; bem como, podem ser empregados no tratamento de
 doenças e/ou disfunções relacionadas à elevação dos níveis TNF- α , como, por
 exemplo, doenças e/ou disfunções inflamatórias em geral; preferencialmente,
 em doenças e/ou disfunções inflamatórias reativas provocadas pela infestação
 de parasitos no corpo de um animal mamífero humano e/ou não humano.

15 Somente para efeitos desta invenção, parasitoses são aquelas doenças
 ou disfunções causadas por organismos unicelulares pertencentes aos reinos
 bactéria e protista, em animais mamíferos, humanos ou não humanos.

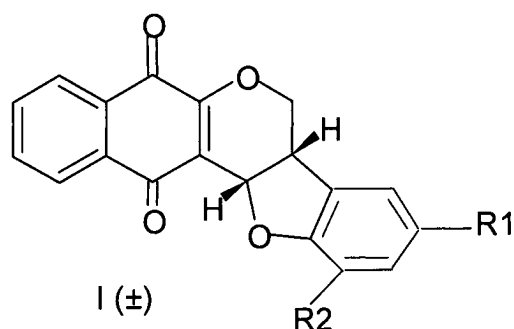
Preferencialmente, os novos compostos de fórmula (I):



podem ser empregados no tratamento de tumores resistentes a múltiplas drogas (MDR) tais como; leucemias; tumores sólidos de órgãos como pulmão; mama; fígado; dentre outros. Ainda preferencialmente, as parasitoses desta invenção são doenças ou disfunções pertencentes ao grupo de doenças ou

5 disfunções que compreende a leishmaniose; malária; doença de chagas; toxoplasmose; lepra; tuberculose; brucelose; dentre outras.

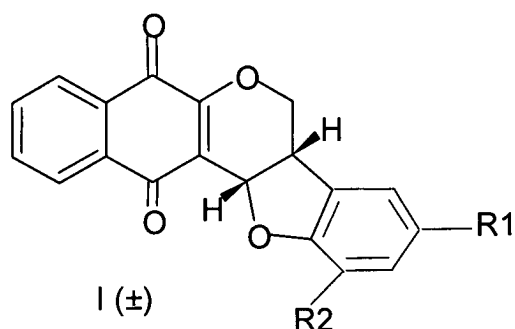
Esta invenção também provê um processo de produção dos novos compostos de formula (I):



10 e/ou seus sais, solvatos e racematos usando procedimento sintético ecologicamente correto e economicamente adequado, visto o uso de catalisadores à base de paládio em quantidades catalíticas e a ausência de reagentes contendo mercúrio.

O processo de produção dos novos compostos da família das

15 pterocarpaquinonas de formula (I):



bem como de seus sais, solvatos e racematos objeto desta invenção, apresenta as etapas de:

a) Síntese do intermediário 1;

- b) Purificação do intermediário 1;
- c) Síntese dos compostos de fórmula (I);
- d) Purificação dos compostos de formula (I).

5 A etapa a) ocorre à partir da reação entre a acroleína e a lausona na presença de um solvente e de uma solução ácida em refluxo durante um período de tempo compreendido entre 2 a 12 horas.

Os solventes que podem ser empregados nesta etapa do processo de obtenção das novas pterocarpaquinonas de fórmula (I) desta invenção são solventes orgânicos tais como: benzeno, acetona, tolueno, metanol, etanol
10 dentre outros, preferencialmente o solvente orgânico empregado é o tolueno; a solução ácida empregada nesta etapa pode conter ácidos orgânicos, tais como o ácido acético, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido fenil borônico, ácido valérico, ácido acrílico, ácido propiônico, ácido benzóico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido teraftálico, ácido fumárico, ácido tricloroacético, ácido
15 tartárico, dentre outros, preferencialmente, a solução ácida empregada nesta etapa é uma solução contendo ao menos ácido acético e ácido fenil borônico; e o período de reação é inferior a 6 horas.

Na etapa b) o produto obtido em a) é concentrado e purificado com o auxílio de agentes extratores da fase orgânica. A concentração pode ser obtida
20 por meios conhecidos pelo homem da arte, como por exemplo, pelo uso de evaporadores rotatórios.

Os agentes extratores empregados na purificação podem ser, por exemplo, éteres, ésteres e álcoois, empregando-se preferencialmente o acetato de etila como agente extratores; em seguida a fase é lavada sucessivamente
25 com um ou mais sais orgânicos e/ou sais inorgânicos, preferencialmente se empregam o bicarbonato de sódio e o cloreto de sódio. Agentes secantes que podem ser empregados são todos aqueles conhecidos pelo homem da arte, como por exemplo o sulfato de magnésio, sulfato de cobre, cloreto de cálcio e a sílica, preferencialmente se emprega nesta invenção o sulfato de sódio.

30 O intermediário 1 produzido de acordo com as etapas a) e b) é a cromenoquinona, que servirá de substrato reacional para o início da etapa c).

A etapa c) ocorre pela reação de oxa-Heck catalítica, envolvendo a cromenoquinona com um fenol *orto*-substituído por halogênio; na presença de um solvente orgânico; um sal de metal e fosfinas na presença de quantidades sub-estequiométricas de um catalisador em período de tempo compreendido entre 1 a 24 horas sob refluxo em atmosfera modificada.

O fenol *orto*-substituído por halogênio preferencialmente empregado nesta invenção é o *orto*-iodo fenol podendo ser substituído ou não substituído nos carbonos 3 e 5 do anel aromático. O solvente orgânico empregado nesta etapa pode ser escolhido do grupo contendo benzeno, acetona, tolueno, metanol, etanol dentre outros, preferencialmente se emprega a acetona como solvente.

Para fins desta invenção, entende-se por quantidade sub-estequiométrica do catalisador, a menor percentagem molar do catalisador necessária para que a reação ocorra com o máximo de rendimento possível.

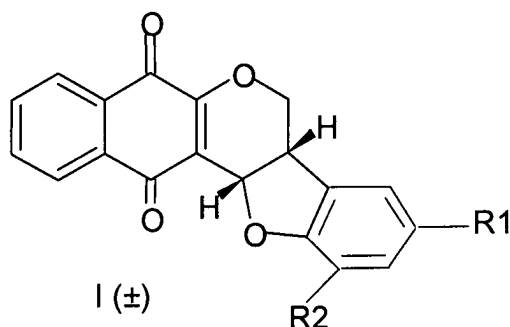
O catalisador empregado por esta invenção é um catalisador contendo paládio, podendo ser cloreto de paládio ou acetato de paládio, preferencialmente é empregado o acetato de paládio como catalisador nesta invenção.

O sal metálico empregado na etapa c) é um sal de metal nobre, preferencialmente, se emprega o carbonato de prata, sob refluxo durante um período compreendido entre 8 a 20 horas, em atmosfera de nitrogênio.

Um segundo período de refluxo pode ser realizado sob as mesmas condições do primeiro refluxo da etapa c) com a adição de uma quantidade adicional do fenol *orto*-substituído por halogênio ao meio reacional, para o aproveitamento máximo da cromenoquinona.

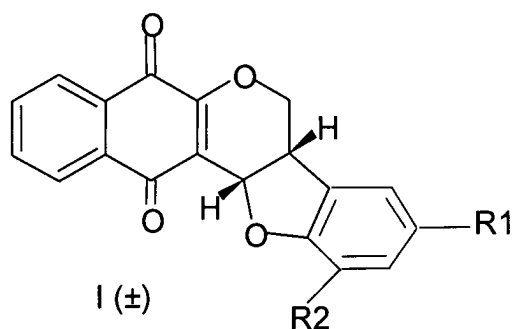
A etapa d) ocorre de maneira análoga a etapa b) resultando na obtenção dos novos compostos da família das pterocarpanoquinonas de fórmula (I) objetos desta invenção.

Um processo de síntese alternativo dos novos compostos de fórmula (I):



desta invenção, ocorre pelo emprego na etapa c) do cromenodimetoxi, que vem a ser a forma reduzida e metilada da cromenoquinona, como ponto de partida. As condições catalíticas empregadas pelo uso do cromenodimetoxi são idênticas as condições empregadas pela cromenoquinona.

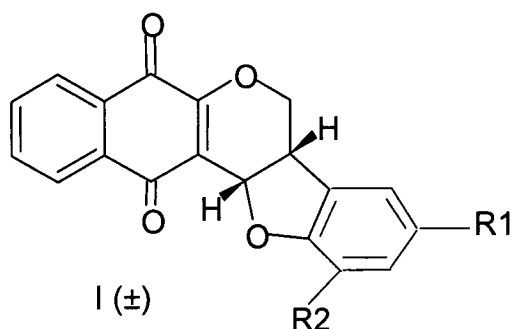
Uma composição farmacêutica contendo os novos compostos de formula



(I)

e/ou seus sais, solvatos e racematos farmacêuticamente aceitáveis, sozinhos ou uma combinação deles, em uma quantidade farmacêuticamente aceitável, além de compostos não ativos farmacêuticamente aceitáveis, voltada para o tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas ao fenômeno da proliferação celular indesejada, em animais mamíferos humanos ou não humanos, é um objeto desta invenção.

Uma composição farmacêutica contendo os novos compostos de formula (I)



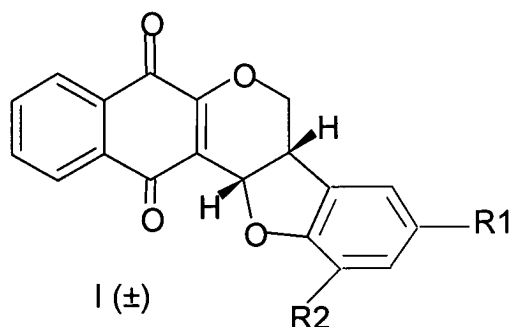
e/ou seus sais, solvatos e racematos farmaceuticamente aceitáveis, sozinhos ou uma combinação deles, em uma quantidade farmaceuticamente aceitável, além de compostos não ativos farmaceuticamente aceitáveis voltada para o
 5 tratamento de doenças e/ou disfunções relativas ao aumento dos níveis do TNF- α em animais mamíferos humanos ou não humanos é um outro objeto desta invenção.

Para esta invenção, temos que uma quantidade farmaceuticamente aceitável dos novos compostos de fórmula (I) está compreendida entre 0,05 μ M
 10 a 1M de um dos novos compostos de fórmula (I); ou uma combinação de diferentes novos compostos da família das pterocarpaquinonas de fórmula (I) desta invenção.

Preferencialmente, entende-se por quantidade farmaceuticamente aceitável, a concentração entre 0,5 a 750 μ M dos compostos de fórmula (I);
 15 mais preferencialmente ainda, a composição farmacêutica contém entre 1 a 450 μ M de um dos novos compostos de fórmula (I); ou uma combinação de diferentes novos compostos da família das pterocarpaquinonas de fórmula (I) desta invenção.

Ainda para fins desta invenção, compostos não ativos farmaceuticamente
 20 aceitáveis podem ser todos aqueles compostos conhecidos pelo homem da arte, que sejam empregados usualmente na indústria farmacêutica, tais como, adjuvantes, diluentes, conservantes, antioxidantes, antimicrobianos, edulcorantes, flavorizantes, dispersantes, dentre outros.

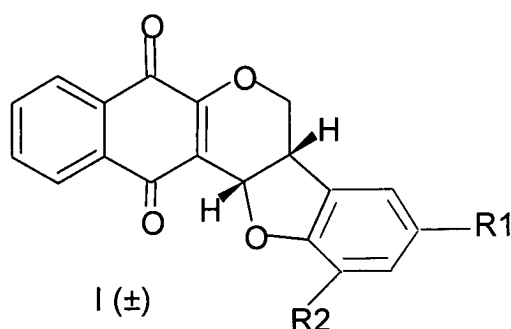
O uso dos novos compostos de fórmula (I):



e/ou seus sais, solvatos e racematos farmaceuticamente aceitáveis, sozinhos ou uma combinação deles para a fabricação de um medicamento voltado para o tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas ao fenômeno de proliferação celular indesejada tais como neoplasias e parasitoses em animais mamíferos humanos ou não humanos é também um objeto desta invenção.

É ainda um objeto desta invenção o uso dos novos compostos de fórmula (I) e/ou seus sais, solvatos e racematos farmaceuticamente aceitáveis farmaceuticamente aceitáveis, sozinhos ou uma combinação deles para a fabricação de um medicamento voltado para o tratamento de doenças e/ou disfunções relativas ao aumento dos níveis do TNF- α em animais mamíferos humanos ou não humanos.

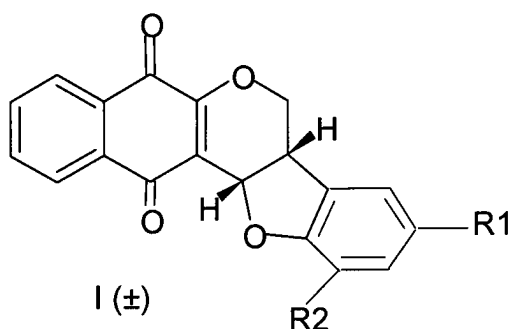
Para esta invenção, o medicamento deve conter uma quantidade farmaceuticamente aceitável de um ou mais dos novos compostos da família das pterocarpaquinonas de fórmula (I):



pode ser encontrado sob todas as formas farmacêuticas conhecidas pelo homem da arte, podendo ser empregado sob a forma líquida, sólida ou semi-sólida, como por exemplo, na forma de soluções, soluções injetáveis, poções,

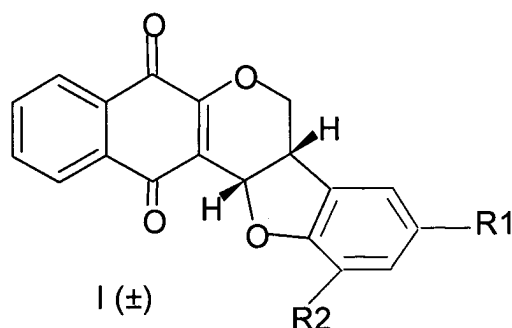
supensões, emulsões, tinturas, elixires, xaropes, pastilhas, comprimidos, tabletes, hóstias, pílulas, pérolas, drágeas, cápsulas, pós, óvulos, cremes, cataplasma, ungüentos, ceratos, linimentos, pastas, loções, pomadas, géis, aerossóis, pensos (adesivos) transdérmicos, ampolas, sprays, além de outras.

- 5 Um método de tratamento de uma doença e/ou disfunção relacionada ao fenômeno de proliferação celular indesejada, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente aceitável dos novos compostos de formula (I):



- 10 e/ou seus sais, solvatos e racematos farmaceuticamente aceitáveis, sozinhos ou uma combinação deles, há um animal mamífero humano ou não humano portador de uma doença e/ou disfunção relacionadas ao fenômeno de proliferação celular indesejada.

- 15 Um método de tratamento de uma doença e/ou disfunção relativa ao aumento dos níveis do TNF- α , compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente aceitável dos novos compostos de formula (I):



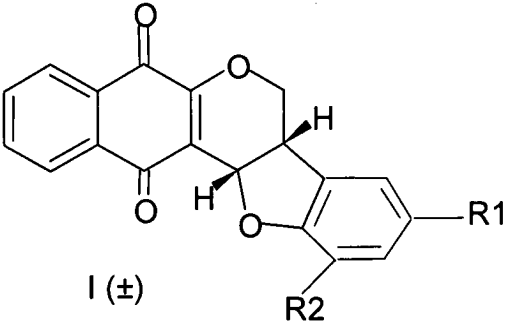
e/ou seus sais, solvatos e racematos farmaceuticamente aceitáveis, sozinhos ou uma combinação deles, há um animal mamífero humano ou não humano

portador de doenças e/ou disfunções relativas ao aumento dos níveis do TNF- α .

As doenças e/ou disfunções relacionadas tanto ao fenômeno de proliferação celular indesejada, como ao aumento dos níveis do TNF- α às quais esta invenção se refere são as neoplasias e parasitoses. Preferencialmente as neoplasias desta invenção são tumores resistente a múltiplas drogas (MDR) tais como leucemias e tumores sólidos de órgãos como pulmão; mama; fígado e outros órgão e tecidos; e as parasitoses são compreendidas do grupo de doenças ou disfunções tais como a leishmaniose; malária; doença de chagas; toxoplasmose; lepra; tuberculose; brucelose dentre outras doenças e/ou disfunções provocadas pela infestação de parasitos no corpo de um animal hospedeiro, podendo ser um animal mamífero humano ou não humano.

Os exemplos abaixo são meramente ilustrativos das concretizações desta invenção, não devendo ser utilizados na limitação dos direitos dos inventores.

Exemplo 1: Novas pterocarpaquinonas de formula (I) produzidas.

Formula (I)			
 I (±)			
Composto	R1	R2	R3
LQB1	H	H	----
LQB2	NO ₂	H	----
LQB3	NH ₂	H	----
LQB4	CO ₂ R ₃	H	CH ₃
LQB5	CO ₂ R ₃	H	H

LQB6	CO ₂ R ₃	H	Na
LQB7	CH ₂ OH	H	-----
LQB8	CHO	H ₃ CO	-----
LQB9	CO ₂ R ₃	H ₃ CO	Na
LQB10	Cl	H	-----
LQB11	Br	H	-----

Exemplo 2: síntese dos compostos de fórmula (I).

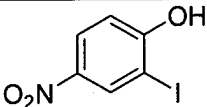
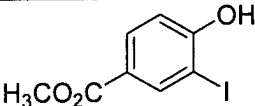
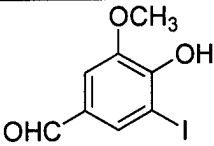
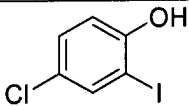
2.1 - Síntese do intermediário 1 (a-desidro-desmetil-lapachona):

Uma solução de lausona (1,0 g, 5,74 mmol), acroleína (13,2 mL), ácido fenil borônico (0,7g, 5,74mmol) e ácido acético glacial (26,4mL) em tolueno (210,0mL) foi refluxada por até 6 horas. A formação do produto foi monitorada por TLC. A mistura reacional foi resfriada, concentrada em evaporador rotatório e extraída com acetato de etila. O extrato orgânico foi lavado sucessivamente com NaHCO₃ e solução saturada de NaCl, seca sob Na₂SO₄ e o solvente evaporado. O material bruto foi purificado em coluna cromatográfica fornecendo um sólido vermelho (0,6 g; 50% de rendimento), pf = 215– 217°C.

2.2 - Síntese de LQBs:

Para a síntese do LQB1 foi empregada uma solução de cromeno quinona (106 mg; 0,5 mmol) em acetona (50 mL), sob agitação, foram adicionados 83mg de o-iodofenol (0,75mmol), 413mg de Ag₂CO₃ (1,5mmol), 26,2mg de PPh₃ (0,1mmol; 20 mol %), e 11,2mg de (AcO)₂Pd (0,05mmol; 10mol%). A mistura reacional foi refluxada por 16 h sob atmosfera de N₂. Após este tempo, a análise por TLC indicou a formação de um produto ligeiramente menos polar que o cromeno quinona, entretanto ainda restava uma quantidade significativa do cromeno quinona. Foram adicionados ao meio reacional mais 83mg (0,75mmol) de o-iodofenol. Esta nova mistura foi refluxada por mais 16h, quando então a análise por TLC indicou o total consumo do cromenoquinona. O solvente foi evaporado em evaporador rotatório, o produto extraído com acetato de etila, a fase orgânica lavada com solução saturada de NaCl e seca sob Na₂SO₄. Após purificação em coluna cromatográfica foram obtidos 62,3mg (0,21mmol) do LBQ1 em 41 % de rendimento. pf: 145°C, m/z 304.

Para síntese dos demais LQBs o processo empregado é o mesmo, a única modificação é o orto-iodo fenol empregado. Conforme descrito, para a síntese dos demais LQBs são empregados O-iodo fenóis substituídos ou não substituídos nos carbonos 3 e 5 do anela aromático. A tabela abaixo exemplifica alguns dos LQBs obtidos, e os O-iodo fenóis empregados em sua síntese.

PRODUÇÃO DE LQBs	
Composto Obtido	orto-iodo fenol empregado
LBQ2	
LBQ4	
LBQ8	
LBQ10	

2.3 - Processo alternativo de Síntese:

A uma solução em agitação do cromenodimetoxi (0,5 mmol) em acetona (50 mL), sob agitação, foram adicionados 83mg de o-iodofenol (0,75mmol), 413mg de Ag_2CO_3 (1,5mmol), 26,2mg de PPh_3 (0,1mmol; 20 mol %), e 11,2mg de $(\text{AcO})_2\text{Pd}$ (0,05mmol; 10mol%). A mistura reacional foi refluxada por 16 h sob atmosfera de N_2 . Após este 16 horas o solvente foi evaporado em evaporador rotatório, o produto extraído com acetato de etila, a fase orgânica lavada com solução saturada de NaCl e seca sob Na_2SO_4 . O produto bruto foi tratado com CAN (1,0mmol) em diclorometano (10mL) como solvente a temperatura ambiente, por um período de 12 horas. Após este tempo o produto foi obtido nas condições descritas acima. Após purificação em coluna

cromatográfica foram obtidos (0,29 mmol) do LBQ1 em 49% de rendimento. pf: 145°C.

Exemplo 3 - Teste clínicos:

3.1 - Câncer

3.1.1 - Linhagens celulares e cultura de células:

Foram utilizadas as linhagens celulares estabelecidas K562, Lucena-1, Daudi, Raji, Jurkat e HL-60. As células são crescidas em garrafas de 25 cm³, em 5mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). O número de células foi contado por microscopia ótica em câmara de Neubauer e ajustado para a concentração de 2x10⁴ células/mL antes dos repiques, realizados duas vezes por semana. Para a linhagem Jurkat, a quantidade de células foi ajustada para 2x10⁵/mL. A linhagem denominada Lucena-1 foi selecionada a partir de uma amostra de K562, que foi exposta a concentrações crescentes de VCR, iniciando-se por 3nM até um máximo de 60nM, a partir da qual as células sobreviventes foram mantidas. Para as culturas de Lucena-1 além do meio de cultura e SFB foi adicionado 60nM de VCR. As culturas são mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C.

3.1.2 - Medida de viabilidade celular:

A fim de se medir a viabilidade celular após incubação com os pterocarpanos sintéticos, as células leucêmicas foram testadas utilizando-se o ensaio colorimétrico com MTT (brometo de 3,4,5-dimetiazol-2-il-2,5-difeniltetrazol) (Mosmann, 1983; Denizot, 1986; Barile, 1994). As placas contendo células, igualmente na concentração de 2x10⁴/mL, foram incubadas na estufa por 72 horas na presença das substâncias. A linhagem Jurkat foi incubada na concentração de 2x10⁵/mL, e os linfócitos do sangue periférico a 10⁶/mL. A solução de MTT foi preparada em uma concentração de 5mg/mL diluído em solução salina, sendo posteriormente adicionado nas células na quantidade de 20mL por poço da placa de ELISA. Foram aguardadas 3 horas após esta incubação e as placas foram então centrifugadas a 1500rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado após a centrifugação. O MTT reage com a desidrogenase mitocondrial reduzindo os sais de tetrazólio, gerando

como resultado cristais de formazan azul-arroxeados que foram então diluídos em 200µL de DMSO.

Após este procedimento a intensidade da coloração formada pôde ser medida em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 490nm. Como
5 branco, descontado dos valores obtidos, foi utilizado apenas meio e 10% SFB, e como controles, somente células na ausência dos compostos. As leituras foram feitas em triplicatas.

3.1.3 - Obtenção de linfócitos ativados de sangue periférico:

O sangue periférico foi obtido de doadores saudáveis com uso de seringa
10 heparinizada, a fim de se impedir a coagulação, e armazenado em tubos de 15mL. A esses tubos foi adicionado histopaque, substância capaz de formar um gradiente de densidade que possibilita a separação dos diferentes tipos celulares do sangue. O sangue com o histopaque foi centrifugado por 30 minutos a 1500rpm. No precipitado são encontradas as hemácias e células
15 polimorfonucleares em sua maioria, enquanto que o sobrenadante é composto basicamente pelo plasma e uma camada de histopaque. Entre essas duas camadas forma-se uma interface da qual podem-se extrair as células mononucleares. Estes foram lavados em PBS e posteriormente ressuspensos em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino. As células
20 mononucleares (80% linfócitos) foram então ajustados para uma concentração de 1×10^6 /mL, correspondente à concentração dessas células circulantes no sangue. A incubação com os compostos se deu na presença de 5mg/mL de fitohemaglutinina (PHA), um conhecido agente mitógeno, já que células em divisão são normalmente mais sensíveis a quimioterápicos em geral.

3.2 – Leishmania:

3.2.1 – Manutenção dos parasitos:

O agente etiológico foi cultivado in vitro segundo técnica descrita por Trager & Jensen (1976) que consiste na manutenção do parasita numa
suspensão de hemácias a 37°C, em condições de esterilidade, em uma
30 atmosfera de 5 a 10% de CO₂ e aproximadamente 5% de O₂.

Soluções com diferentes concentrações (0.1 - 1000 µg-ml) de cada amostra a ser testada foram esterilizadas por irradiação gama. Serão adicionados 100mL de uma suspensão de 2% de hemácias O+ e 0,2% de parasitemia aos poços da placas de cultura. Em seguida serão adicionados 5 10mL das soluções contendo as amostras em teste ou o fármaco de referência. (artesunato, mefloquina ou cloroquina; 50 nM) segundo (Desjardins, 1979) e (Chulay, 1982) . Após 72 horas de incubação a 37O C em atmosfera de 10% de CO2 e aproximadamente 5% de O2, uma pequena alíquota da suspensão será recolhida com auxílio de pipeta Pasteur e colocada em lâmina de vidro 10 para realização de esfregaço a ser corado pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A parasitemia será determinada segundo a seguinte equação:

$$\% P A = \frac{HA}{HC} \times 100$$

PA: Parasitemia

15 HA: Número de hemácias parasitadas tratadas com amostras.

HC: Número de hemácias parasitadas sem tratamento

3.2.2 – Produção de óxido nítrico:

A produção de óxido nítrico foi estimada, indiretamente, medindo-se a concentração de nitrito no sobrenadante das culturas dos macrófagos. Os 20 macrófagos peritoneais murinos serão obtidos e plaqueados em placas de 96 poços. Após a retirada das células não aderentes, os macrófagos serão ou não infectados e as moléculas selecionadas serão adicionadas em diversas concentrações (1 a 100 µM). Após 72h, as placas serão centrifugadas e o sobrenadante será avaliado colorimetricamente quanto a concentração de 25 nitrito adicionando-se reagente de Griess. A absorbância será medida no comprimento de onda de 570nm. A produção de óxido nítrico é um importante mecanismo leishmanicida do macrófago e serve como parâmetro de avaliação do estado de ativação dessas células.

3.2.3 – teste in vitro:

30 Células totais de linfonodos (principalmente linfócitos) de camundongos foram incubadas em placas de 96 poços a 37°C, com as moléculas estudadas

em diversas concentrações (1 a 100 μ M), com o estímulo ou não de concanavalina A. Após 72h, a viabilidade das células será estimada colorimetricamente pela quantidade de lactato desidrogenase (LDH) liberada no sobrenadante das culturas.

5 3.2.4 – teste in vivo:

As moléculas selecionadas foram testadas em um modelo de leishmaniose cutânea experimental murina. Camundongos BALB/c serão infectados na orelha com *L. amazonensis*-GFP e tratados pela via intralesional com as moléculas aprovadas nas etapas anteriores. A eficácia do tratamento
10 foi monitorada por dois parâmetros: a) crescimento da lesão medido com paquímetro, e b) carga parasitária medida por fluorimetria, conforme metodologia previamente estabelecida (Boek, 2006).

3.3 – Toxoplasmose:

3.3.1 – Obtenção de taquizoítas de *Toxoplasma gondii*:

15 Taquizoítas de *T. gondii* (cepa RH) serão mantidos por passagens na cavidade peritoneal de camundongos a cada 2 ou 3 dias. Após esse período, será feito lavado peritoneal injetando 3 ml de solução de Hank. O lavado será centrifugado a 100g por 5 minutos, o sobrenadante coletado e centrifugado a 1000g por 10 minutos. Os parasitas serão ressuspensos em DMEM e
20 contados.

3.3.2 - Macrófagos peritoneais:

Macrófagos peritoneais serão obtidos por lavagem peritoneal de camundongos suíços (CF1) com 5 ml de solução de Hank. Os macrófagos serão plaqueados em lamínulas de vidro em placas de 24 poços. Após 1 hora
25 de aderência a 37°C, as células serão lavadas com solução de Hank a 37°C e cultivadas com "Dulbeccos Modified Eagle's Medium" (DMEM) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂.

3.3.3 - Ativação de macrófagos peritoneais e interação com parasitas:

30 Interações serão feitas com macrófagos residentes ou ativados com 50 U/ml de interferon- γ recombinante de camundongo (IFN- γ ; Sigma) e 100 ng/ml

de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; Sigma). Para comprovação do envolvimento do óxido nítrico (NO) na destruição dos protozoários utilizaremos o ^{NG} monometil L-arginina (LNMA-SIGMA) que bloqueia a produção de NO. Após ativação dos macrófagos, 1 mg/ml de LNMA será acrescida ao meio de cultura.

3.3.4 - Preparo das interações para observação em microscopia óptica:

Após os diferentes pontos de interação, as células serão fixadas em solução de Bouin (70 % solução saturada de ácido Pícrico, 23 % formol e 7 % ácido acético), lavadas, coradas com solução de Giemsa (diluído em água destilada na proporção de 1:10), desidratadas numa série de soluções acetona-xilol, montadas sobre Entellan e observadas em microscópio óptico. As células coradas serão quantificadas da seguinte forma: a) % de macrófagos com parasitas, b) % de macrófagos sem parasitas e c) número de parasitas por macrófago. Esses resultados de quantificação serão usados para analisar o desenvolvimento da infecção e a sobrevivência dos parasitas.

3.3.5 - Preparo das interações para observação em microscopia eletrônica:

Após diferentes pontos de interações com diferentes tratamentos, as células serão fixadas no método karnowski (2,5% de glutaraldeído, 4% de Paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1M). Após a fixação, as células serão lavadas em tampão cacodilato de sódio e então pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1%. Após o processo de fixação, as células serão desidratadas em uma série de concentrações de acetona e em seguida incluídas em resina Epóxi. Após a ultramicrotomia, os cortes serão contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e posteriormente observado em microscopia eletrônica de transmissão.

3.3.6 - Cultivo de LLCMK2:

Cultivo de células fibroblásticas LLCMK2 *in vitro* foi feito com DMEM suplementado com 5 % de Soro Fetal Bovino. As células foram cultivadas em 5% de atmosfera de CO₂.

3.3.7 - Interação Parasito-Célula:

As interações de *Toxoplasma gondii* com Macrófagos ou células fibroblásticas LLCMK2 foram realizadas nos tempos de 1, 24 e 48 horas de interação. Todas as interações foram realizadas na presença ou ausência da droga LQB-118 de acordo com os resultados apresentados.

3.4 – Ação das novas pterocarpaquinonas de fórmula (I) sobre o TNF:

3.4.1 – Inalação de LPS:

Para a inalação de LPS, foi utilizada uma câmara de inalação de vidro com volume de 1 litro, com capacidade para até 8 camundongos. Os camundongos foram colocados nesta câmara e inalaram por cinco minutos os aerossóis produzidos por pressão positiva de 2 mL de uma suspensão de LPS contendo 0,5 mg/mL, preparado em salina fisiológica (NaCl 0,9%). Os animais do grupo controle inalaram apenas salina fisiológica.

3.4.2 - Tratamento com LQB:

Grupos de animais foram tratados com LQB dissolvido em salina fisiológica com 10% de etanol (veículo), nas doses de 1, 10 e 100 mg/Kg. As substâncias foram administradas em um volume de 200 µL por via intraperitoneal (i.p.) 1 hora antes da inalação de LPS. Em paralelo, grupos de animais foram tratados com 200 µl do veículo.

3.4.3 - Lavado Broncoalveolar (LBA):

Três horas após a inalação de LPS, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, suas traquéias foram expostas, canuladas e os pulmões foram lavados com salina fisiológica para um volume final de 1,5 mL em tubos mantidos a 4°C (Figura 10). Uma alíquota de 300 µL do lavado foi utilizada para a contagem e identificação das células e o restante foi centrifugado a 1.500 x g por 10 minutos (SORVALL, EUA). O sobrenadante foi estocado a -20°C para posterior dosagem de citocinas.

3.4.4 - Contagem de células:

O número total de células foi determinado em um contador de células do tipo Coulter Counter (Coulter Eletronics Inc. - EUA). A identificação dos diferentes tipos de células presentes no LBA foi feita após citocentrifugação de

200 μ L de LBA a 80 x g por 1 minuto (Shandon - EUA). As lâminas preparadas a partir da citocentrifugação foram coradas com o kit Diff-Quick (SHANDON, EUA).

Foram contadas cerca de 200 células em cada lâmina. A identificação do tipo celular foi baseada conforme as descrições morfológicas descritas por Stevens e Lowe (1995).

3.4.5 - Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humano:

Células mononucleares foram obtidas a partir do sangue periférico de doadores sadios, por centrifugação com gradiente de Ficoll. 20 mL de sangue periférico foram cuidadosamente colocados em 16 mL de Ficoll seguido de centrifugação a 1500 x g por 30 minutos. Depois de recolhido, o PBMC foi lavado duas vezes com salina fisiológica e ressuspensionado em meio de cultura RPMI 1640 contendo estreptomicina 0,1 mg/mL, penicilina 100 U/mL, suplementado com 10% de SFB.

3.4.6 - INCUBAÇÃO COM LPS *in vitro*:

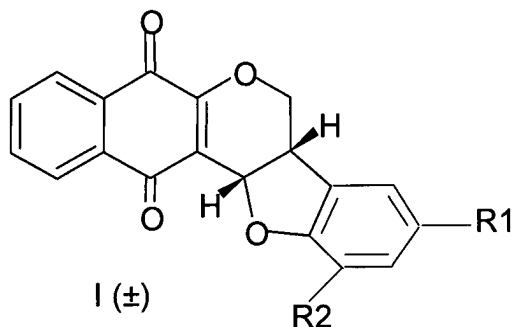
O PBMC ressuspensionado em RPMI foi semeado em placa de 24 poços (8 x 10⁵ células/poço). As células foram incubadas com LPS na concentração de 2 μ g/mL a 37°C em 4% de CO₂ por 2 horas. Após a incubação com LPS, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 14000 x g por 1 minuto para descartar qualquer célula eventual. O sobrenadante foi estocado a -20°C para posterior dosagem de citocinas.

3.4.7 - Incubação com LQB *in vitro*:

Os grupos de células tratadas receberam, concomitantemente com estímulo de LPS, LQB diluído em 0,5% DMSO (veículo) nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 μ M. Um grupo de células recebeu apenas o veículo.

REIVINDICAÇÕES

1. Novos compostos da família das pterocarpanoquinonas de fórmula geral (I):



, em que:

- 5 R1 pode ser H; hidroxila; alquil C1 a C8 cíclico ou alifático; aril C3 a C8 cíclico ou alifático; alquenil C3 a C8 cíclico ou alifático; alquenilil C3 a C8 cíclico ou alifático; um grupo éter C2 a C8; formila; metal alcalino; metal alcalino terroso; halogênio; nitro; amino; amina; CO₂R₃; um grupo álcool C1 a C8;
- R2 pode ser H; hidroxila; alquil C1 a C8 cíclico ou alifático; aril C3 a C8 cíclico ou alifático; alquenil C3 a C8 cíclico ou alifático; alquenilil C3 a C8 cíclico ou alifático; um grupo éter C2 a C8; formila; metal alcalino; metal alcalino terroso; halogênio; nitro; amino; amina; um grupo álcool C1 a C8; e,
- 10 R3 pode ser H; alquil C1 a C8 cíclico ou alifático; aril C3 a C8 cíclico ou alifático; alquenil C3 a C8 cíclico ou alifático; alquenilil C3 a C8 cíclico ou alifático; metal alcalino; metal alcalino terroso e halogênio; e seus sais; solvatos e racematos.
2. Novos compostos da família das pterocarpanoquinonas, de acordo com a reivindicação 1, onde:
- R1 pode ser H; hidroxila; alquil C1 a C6 cíclico ou alifático; metal alcalino; halogênio; nitro; amino; amina; CO₂R₃; um grupo éter C2 a C6; formila; um grupo álcool C1 a C6; e,
- 20 R2 pode ser H; hidroxila; alquil C1 a C6 cíclico ou alifático; um grupo éter C2 a C6; formila; e,
- R3 pode ser H; OH; alquil C1 a C3 cíclico ou alifático; metal alcalino e halogênio.
- 25

3. Novos compostos da família das pterocarpanoquinonas, de acordo com a reivindicação 1 onde:

R1 pode ser H; hidroxila; alquil C1 a C6 cíclico ou alifático; nitro; amino; amina; CO₂R₃; um grupo éter C2 a C6; um grupo álcool C1 a C6; formila;

5 R2 pode ser H; hidroxila; formila; um grupo éter C2 a C6; e,

R3 pode ser H; alquil C1 a C3 cíclico ou alifático; Na; K e halogênio.

4. Novos compostos da família das pterocarpanoquinonas, de acordo com as reivindicações 1 a 3, compreendendo a capacidade de serem ativados por redução, gerando espécies alquilantes no meio intracelular.

10 5. Novos compostos da família das pterocarpanoquinonas, de acordo com as reivindicações 1 a 3, compreendendo a capacidade de capazes de apresentar efeito citotóxico seletivo em animais mamíferos humanos e/ou não humanos.

6. Novos compostos da família das pterocarpanoquinonas, de acordo com a reivindicação 5 compreendendo a capacidade de interromper a proliferação
15 celular de células que se dividem constantemente.

7. Novos compostos da família das pterocarpanoquinonas, de acordo com as reivindicações 1 a 3 compreendendo a capacidade de provocar a redução dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) in vivo em animais mamíferos humanos e/ou não humanos.

20 8. Novos compostos da família das pterocarpanoquinonas, de acordo com a reivindicação 1 compreendendo a capacidade de serem empregados no tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas ao fenômeno de proliferação celular indesejada; bem como, poderem ser empregados no tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas à elevação dos níveis
25 TNF- α , em um animal mamífero humano e/ou não humano hospedeiro.

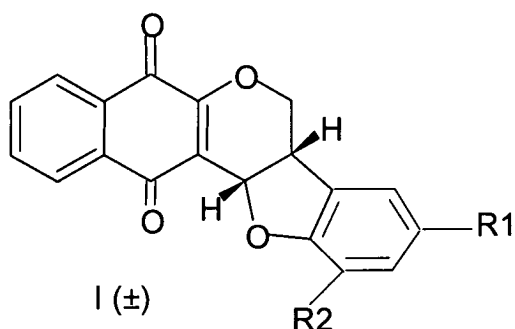
9. Novos compostos da família das pterocarpanoquinonas, de acordo com a reivindicação 8 onde, as doenças e/ou disfunções relacionadas ao fenômeno de proliferação celular indesejada são neoplasias e parasitoses.

10. Novos compostos da família das pterocarpanoquinonas, de acordo com a
30 reivindicação 9, em que, as parasitoses são preferencialmente doenças ou disfunções pertencentes ao grupo de doenças ou disfunções que compreende

a leishmaniose; malária; doença de chagas; toxoplasmose; lepra; tuberculose; brucelose; dentre outras.

11. Novos compostos da família das pterocarpanoquinonas, de acordo com a reivindicação 9, em que, preferencialmente, as neoplasias são tumores resistentes a múltiplas drogas (MDR); tais como leucemias; tumores sólidos de

12. Processo de produção do composto de fórmula (I),



, compreendendo as etapas de: citar

as etapas de:

- a) Síntese do intermediário 1;
- b) Purificação do intermediário 1;
- c) Síntese dos compostos de fórmula (I);
- d) Purificação dos compostos de formula (I).

13. Processo de acordo com a reivindicação 12, compreendendo na etapa a) a reação entre a acroleína e a lausona na presença de um solvente orgânico e de uma solução ácida, em refluxo durante um período de tempo compreendido entre 2 a 12 horas.

14. Processo de acordo com a reivindicação 13, onde na etapa a) preferencialmente se emprega o tolueno como solvente.

15. Processo de acordo com a reivindicação 13, onde a solução ácida da etapa a) pode conter ácidos orgânicos, tais como o ácido acético, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido fenil borônico, ácido valérico, ácido acrílico, ácido propiônico, ácido benzóico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido teraftálico, ácido fumárico, ácido tricloroacético, ácido tartárico, dentre outros.

16. Processo de acordo com a reivindicação 15, em que, preferencialmente é empregada uma solução contendo ao menos ácido acético e ácido fenil borônico.

5 17. Processo de acordo com a reivindicação 13, compreendendo um período de reação inferior a 6 horas.

18. Processo de acordo com a reivindicação 12, compreendendo na etapa b) a concentração e purificação da cromenoquinona.

10 19. Processo de acordo com a reivindicação 12, onde, a etapa c) tem início pela reação entre a cromenoquinona e um fenol *orto*-substituído por halogênio; na presença de um solvente orgânico; um sal de metal e fosfinas na presença de quantidades sub-estequiométricas de um catalisador em período de tempo compreendido entre 1 a 24 horas sob refluxo em atmosfera modificada.

15 20. Processo de acordo com a reivindicação 19, onde preferencialmente é empregado um *orto*-iodo fenol substituído ou não substituído nos carbonos 3 e 5 do anel aromático.

21. Processo de acordo com a reivindicação 19, compreendendo preferencialmente o uso da acetona como solvente.

20 22. Processo de acordo com a reivindicação 19, compreendendo o emprego de uma quantidade sub-estequiométrica do catalisador a base de paládio para acelerar esta etapa da reação.

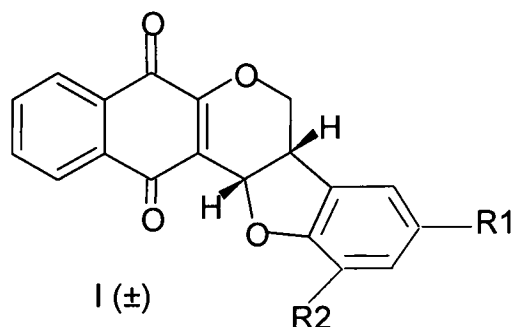
23. Processo de acordo com a reivindicação 19, compreendendo o emprego do carbonato de prata como sal metálico preferencialmente empregado.

24. Processo de acordo com a reivindicação 19, em que a reação ocorre entre 8 a 20 horas, em atmosfera de nitrogênio.

25 25. Processo de acordo com a reivindicação 19, compreendendo o emprego opcional de um segundo período de refluxo, pela a adição de uma quantidade adicional do fenol *orto*-substituído por halogênio ao meio reacional.

26. Processo de acordo com a reivindicação 19, onde a etapa d) ocorre de maneira análoga a etapa b).

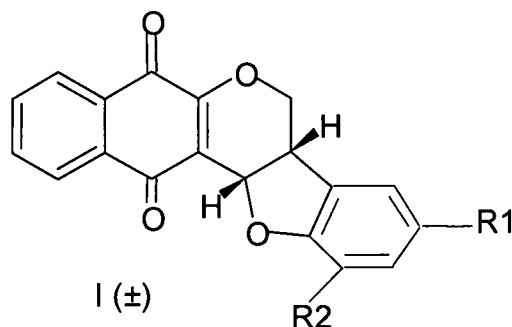
30 27. Composição farmacêutica contendo os novos compostos da família das pterocarpaquinonas de fórmula (I):



e/ou seus sais, solvatos e racematos farmaceuticamente aceitáveis, sozinhos ou uma combinação deles; em uma quantidade farmaceuticamente aceitável; além de compostos não ativos farmaceuticamente aceitáveis, voltada para o

5 tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas ao fenômeno da proliferação celular indesejada, em animais mamíferos humanos ou não humanos, é um objeto desta invenção.

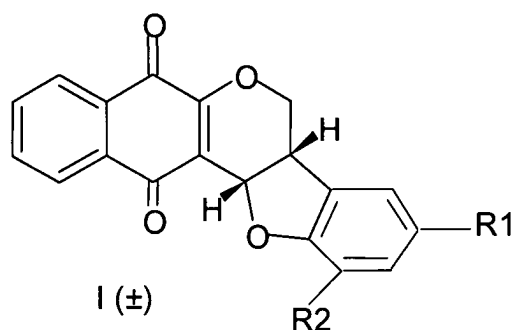
28. Composição farmacêutica contendo os novos compostos de formula (I):



10 e/ou seus sais, solvatos e racematos farmaceuticamente aceitáveis, sozinhos ou uma combinação deles, em uma quantidade farmaceuticamente aceitável, além de compostos não ativos farmaceuticamente aceitáveis voltada para o tratamento de doenças e/ou disfunções relativas ao aumento dos níveis do

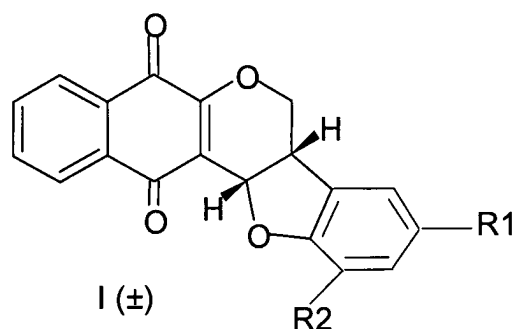
15 TNF- α em animais mamíferos humanos ou não humanos é um outro objeto desta invenção.

29. Uso dos novos compostos de formula (I):



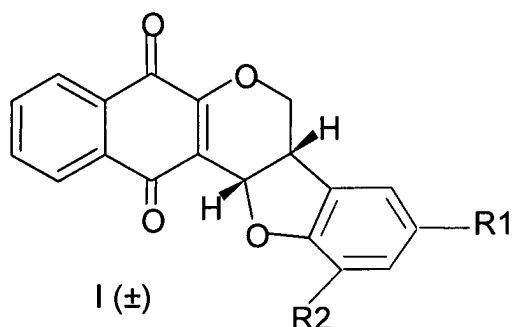
e/ou seus sais, solvatos e racematos farmaceuticamente aceitáveis, sozinhos ou uma combinação deles para a fabricação de um medicamento voltado para o tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas ao fenômeno de proliferação celular indesejada tais como neoplasias e parasitoses em animais mamíferos humanos ou não humanos é também um objeto desta invenção.

30. Uso dos novos compostos de fórmula (I):



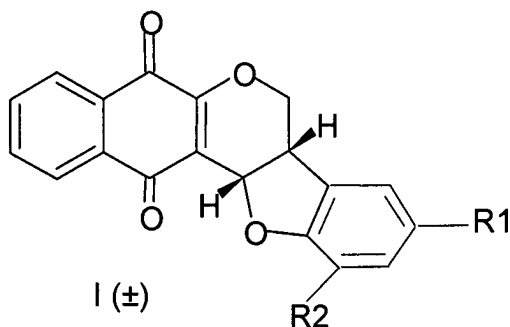
e/ou seus sais, solvatos e racematos farmaceuticamente aceitáveis farmaceuticamente aceitáveis, sozinhos ou uma combinação deles para a fabricação de um medicamento voltado para o tratamento de doenças e/ou disfunções relativas ao aumento dos níveis do TNF- α em animais mamíferos humanos ou não humanos.

31. Medicamento compreendendo uma quantidade farmaceuticamente aceitável de um ou mais dos novos compostos da família das pterocarpanoquinonas de fórmula (I):



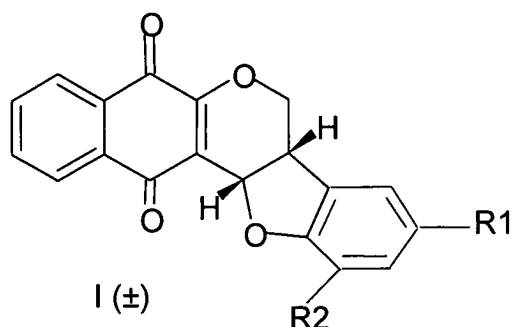
podendo ser encontrado nas formas farmacêuticas de: soluções, soluções injetáveis, poções, suspensões, emulsões, tinturas, elixires, xaropes, pastilhas, comprimidos, tabletes, hóstias, pílulas, pérolas, drágeas, cápsulas, pós, óvulos, cremes, cataplasma, ungüentos, ceratos, linimentos, pastas, loções, pomadas, géis, aerossóis, pensos (adesivos) transdérmicos, ampolas, sprays, além de outras.

32. Método de tratamento de uma doença e/ou disfunção relacionada ao fenômeno de proliferação celular indesejada, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente aceitável dos novos compostos de formula (I):



e/ou seus sais, solvatos e racematos farmacêuticamente aceitáveis, sozinhos ou uma combinação deles, há um animal mamífero humano ou não humano portador de uma doença e/ou disfunção relacionadas ao fenômeno de proliferação celular indesejada.

33. Método de tratamento de uma doença e/ou disfunção relativa ao aumento dos níveis do TNF- α , compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente aceitável dos novos compostos de formula (I):



e/ou seus sais, solvatos e racematos farmaceuticamente aceitáveis, sozinhos ou uma combinação deles, há um animal mamífero humano ou não humano portador de doenças e/ou disfunções relativas ao aumento dos níveis do TNF- α .

34. Método de tratamento, de acordo com as reivindicações 32 e 33, no qual, as doenças e/ou disfunções relacionadas ao fenômeno de proliferação celular indesejada são neoplasias e parasitoses.

35. Método de tratamento, de acordo com a reivindicação 34, onde as neoplasias são tumores resistente a múltiplas drogas (MDR) tais como leucemias e tumores sólidos de órgãos como pulmão; mama; fígado e outros órgão e tecidos.

36. Método de tratamento, de acordo com a reivindicação 34, onde as parasitoses são compreendidas do grupo de doenças ou disfunções tais como a leishmaniose; malária; doença de chagas; toxoplasmose; lepra; tuberculose; brucelose dentre outras doenças e/ou disfunções provocadas pela infestação de parasitos no corpo de um animal hospedeiro, podendo ser um animal mamífero humano ou não humano.

FIGURA 1

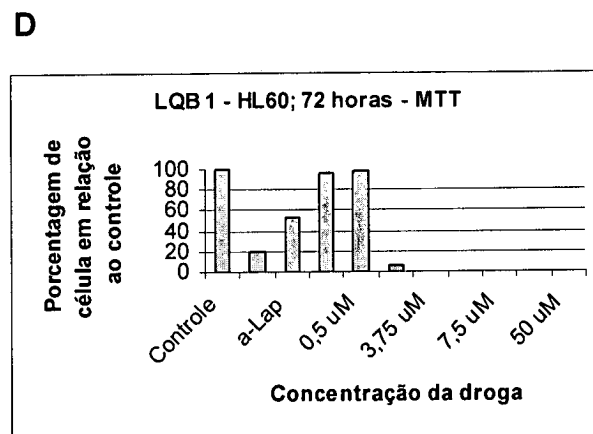
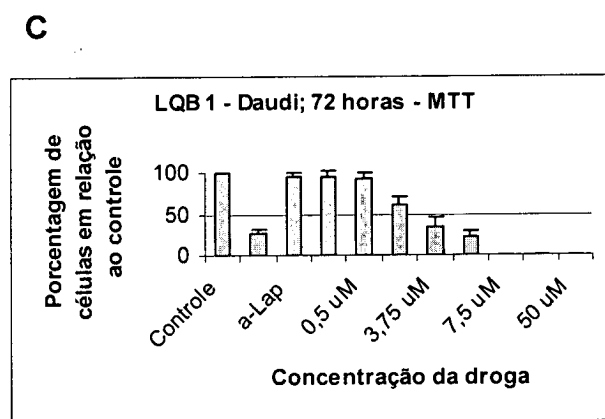
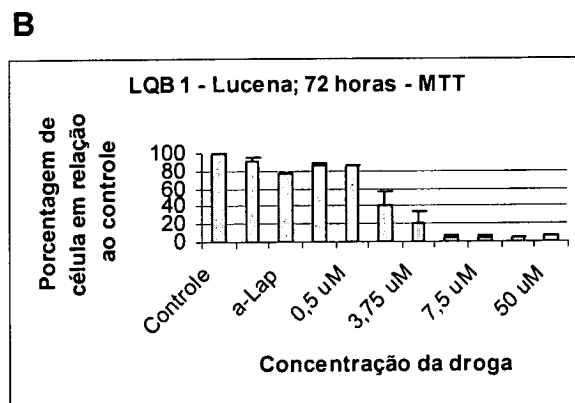
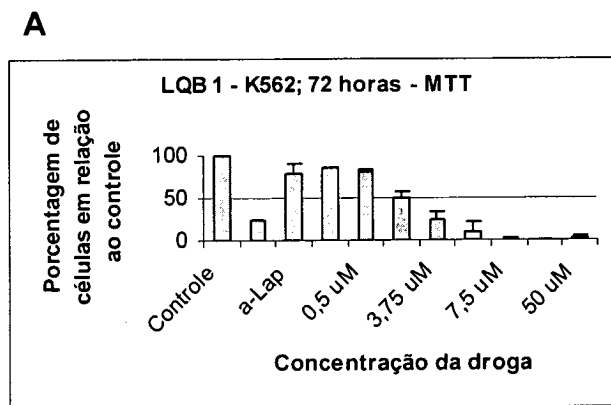


FIGURA 2

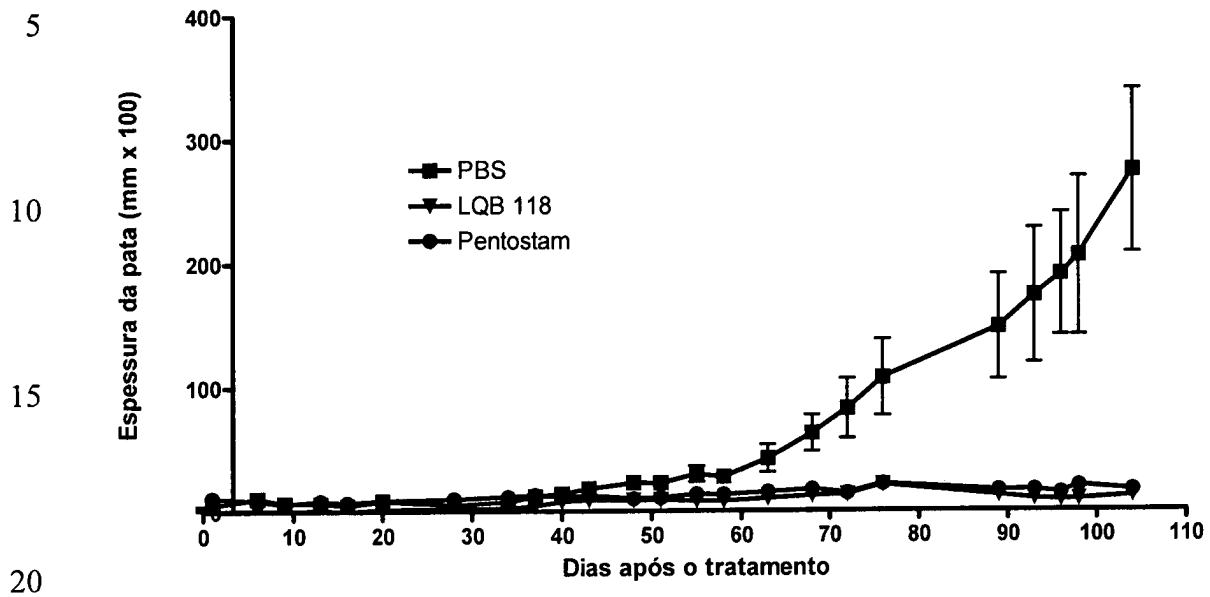


FIGURA 3

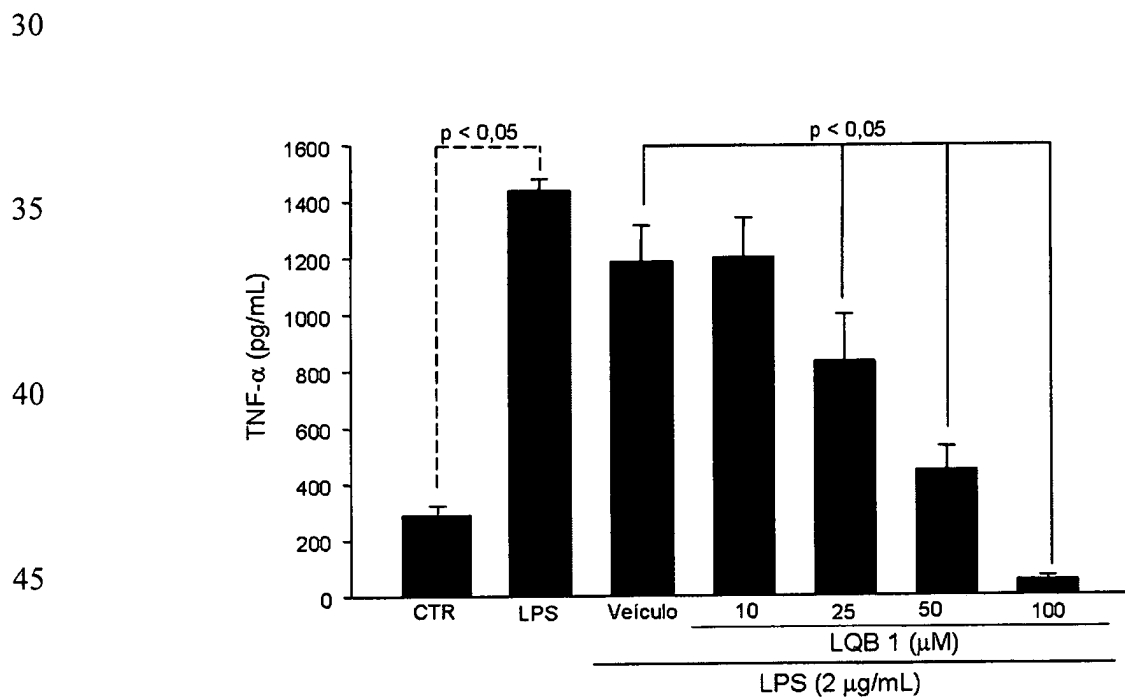
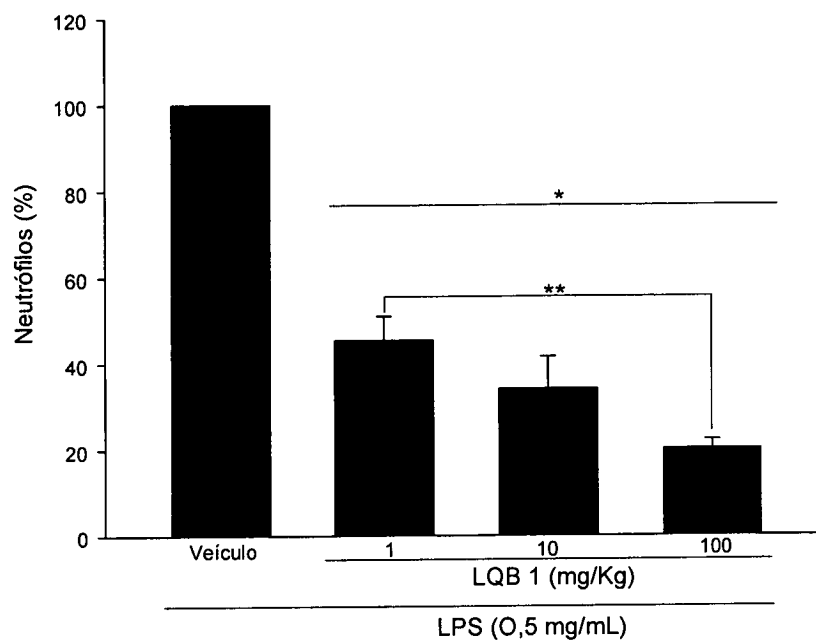


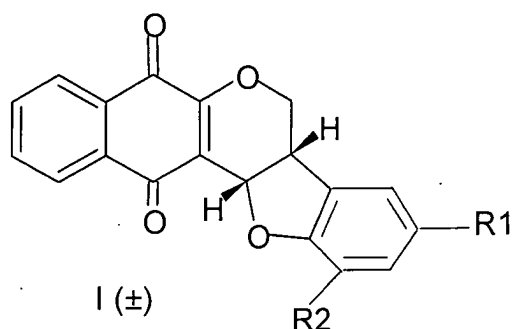
FIGURA 4



RESUMO

NOVOS COMPOSTOS DA FAMÍLIA DAS PTEROCARPAQUINONAS, PROCESSO DE PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO OS NOVOS COMPOSTOS DA
5 FAMÍLIA DAS PTEROCARPAQUINONAS, USOS E MÉTODO TERAPÊUTICO

Esta invenção pertence a área químico-farmacêutica, sendo os novos compostos da família das pterocarpaquinonas de fórmula (I)



10

desta invenção são capazes de serem ativados por redução, gerando espécies alquilantes no meio intracelular, e apresentam efeito citotóxico seletivo, marcadamente para células animais mamíferos humanos e/ou não humanos que dividem constantemente; sendo portanto úteis no tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas ao fenômeno de proliferação celular indesejada bem como. Tais compostos também são efetivos para o tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas à elevação dos níveis TNF- α em animais mamíferos humanos e não humanos; bem como, esta invenção se refere ao processo de produção, a composições farmacêuticas contendo os ditos
15 compostos de fórmula (I); aos usos dos ditos compostos de fórmula (I); ao
20 medicamento contendo tais compostos e métodos de tratamento.